



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 11 793 T2** 2004.08.12

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 100 830 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 11 793.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP99/05416**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 944 302.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/06605**

(86) PCT-Anmeldetag: **28.07.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **10.02.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **23.05.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **01.10.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.08.2004**

(51) Int Cl.7: **C07K 19/00**

**C12N 15/62, C12N 15/85, C12N 5/10,
A61K 38/17, G01N 33/53, A61K 31/70**

(30) Unionspriorität:
98114082 28.07.1998 EP

(73) Patentinhaber:
Micromet AG, 81477 München, DE

(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

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

(72) Erfinder:
**KUFER, Peter, D-85368 Moosburg, DE; DREIER,
Torsten, D-81369 München, DE; BAEUERLE, A.,
Patrick, D-82131 Gauting, DE; BORSCHERT,
Katrin, D-97074 Würzburg, DE; ZETTL, Florian,
D-87435 Kempten, DE**

(54) Bezeichnung: **HETEROMINIKÖRPER**

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

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine multifunktionale Verbindung, herstellbar in einer Säuger-Wirtszelle als ein sekretierbares und voll funktionales Heterodimer aus zwei Polypeptidketten, wobei eine der Polypeptidketten als einzigste konstante Domänenregion einer schweren Immunglobulinkette die C_{H1}-Domäne umfaßt und die andere Polypeptidkette die konstante C_L-Domäne einer leichten Immunglobulinkette umfaßt, wobei die multifunktionale Verbindung weiterhin, fusioniert an die konstante(n) Domänenregion(en), mindestens zwei und bis zu vier (Poly)peptide mit unterschiedlichen Rezeptor- oder Ligandenfunktionen umfaßt, wobei weiterhin mindestens zwei der unterschiedlichen (Poly)peptide keine intrinsische Affinität füreinander haben und wobei die Polypeptidketten über die konstanten Domänenregionen verbunden sind. Vorzugsweise liegen die Domänen mit einer Rezeptor- oder Ligandenfunktion in Form eines scFv-Fragments vor und/oder sind immunmodulierende Effektormoleküle. Besonders bevorzugt umfaßt das scFv-Fragment die V_H- und die V_L-Regionen des murinen anti-17-1A-Antikörpers M79, die V_H- und die V_L-Regionen des anti-Lewis-Y-Antikörpers, wie in **Fig. 6** gezeigt, oder die V_H- und die V_L-Regionen des anti-CD3-Antikörpers TR66 und/oder umfaßt das immunmodulierende Effektormolekül Cytokine oder Chemokine. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Polynucleotide, welche die Polypeptidketten codieren, sowie Vektoren, umfassend diese Polynucleotide, und damit transformierte Wirtszellen sowie die Verwendung der vorstehenden Ausführungsformen zur Herstellung der multifunktionalen Verbindungen. Zusätzlich werden pharmazeutische und diagnostische Zusammensetzungen bereitgestellt, die die vorstehend beschriebenen multifunktionalen Verbindungen, Polynucleotide oder Vektoren umfassen. Beschrieben wird auch die Verwendung der vorstehend erwähnten multifunktionalen Verbindung zur Verhinderung und/oder Behandlung eines malignen Zellwachstums, das mit Malignitäten hämatopoetischer Zellen oder soliden Tumoren in Beziehung steht.

[0002] Mitte der 1980er ist das Konzept der bispezifischen Antikörper entwickelt worden. Mit Hilfe von bispezifischen Antikörpern können unterschiedliche Antigene, Rezeptoren oder Liganden vernetzt werden, die physiologisch nicht miteinander in Wechselwirkung treten, wodurch neue Mittel für das Eingreifen in Krankheitsprozesse, zur Rekrutierung von cytotoxischen Effektorzellen zum Abtöten von Zielzellen, z. B. Tumorzellen oder virusinfizierte Zellen, oder zur Erleichterung der Eliminierung von Krankheitserregern aus dem Körper bereitgestellt werden.

[0003] Für kleine bispezifische Antikörperkonstrukte wird allgemein angenommen, daß sie ein großes diagnostisches und therapeutisches Potential besitzen. Im Gegensatz zu bispezifischen Ausführungsformen ganzer Immunglobulinmoleküle (Merchant, *Nature Biotechnology* 16 (1998), 677–681) von denen erwartet wird, dass sie die in vivo-Eigenschaften und insbesondere die lange Serumhalbwertszeit ihrer natürlichen monospezifischen Gegenstücke aufweisen, werden kleine bispezifische Antikörperkonstrukte aufgrund ihres verringerten Molekulargewichts für Anwendungen bevorzugt, die verbesserte Bioverteilungseigenschaften erforderlich machen. Außerdem ist angenommen worden, daß kleine bispezifische Antikörper in erheblich besseren Ausbeuten herstellbar sind als bispezifische Ausführungsformen, die auf ganzen Immunglobulinen basieren. Demgemäß sind mehrere rekombinante Verfahren zur Herstellung solcher bispezifischen Antikörperfragmente entwickelt worden, um die geringen Ausbeuten herkömmlicher Verfahren zu überkommen (Carter, *J. Hematother.* 4 (1995), 463–470).

[0004] Bispezifische Antikörperfragmente gemäß dem Stand der Technik konnten üblicherweise nicht glycosyliert werden, da sie keine Glycosylierungsstellen besitzen. Demgemäß haben sich die Produktionsverfahren auf *E. coli* als Expressionswirt konzentriert, obwohl die funktionale Expression von Antikörperderivaten in *E. coli* in Abhängigkeit von der erfolgreichen Translokation der entsprechenden Polypeptidketten in den periplasmatischen Raum und von der strukturellen Komplexität des rekombinanten Proteins schwierig sein kann. So zeigte sich, daß bispezifische einkettige Antikörper, die aus vier variablen Ig-Regionen in einer einzigen Polypeptidkette bestehen, nicht als funktionale Proteine im Periplasma von *E. coli* exprimierbar sind. Im Gegensatz dazu können bispezifische einkettige Antikörper als voll funktionale, rekombinante Proteine innerhalb des sekretorischen Weges von Säugerzellen exprimiert werden, wodurch die Reinigung aus dem Kulturüberstand ermöglicht wird (Mark, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995), 7021–7025).

[0005] Im allgemeinen können Strategien zur Expression von bispezifischen Antikörpern in Zwei-Wirt- und Ein-Wirt-Systeme eingeteilt werden (Carter, *J. Hematother.* 4 (1995), 463–470). In Zwei-Wirt-Systemen werden die zwei unterschiedlichen Spezifitäten getrennt exprimiert und gereinigt und anschließend in vitro kombiniert, um bispezifische Heterodimere zu bilden. In Ein-Wirt-Systemen wird der bispezifische Antikörper entweder in der einkettigen Form exprimiert, oder zwei unterschiedliche Polypeptidketten bilden während der Expression in der gleichen Wirtszelle Heterodimere. Grundsätzlich werden Ein-Wirt-Systeme stärker bevorzugt als Zwei-Wirt-Systeme, da die zusätzlichen in vitro-Schritte, die bei den Zwei-Wirt-Systemen erforderlich sind, meist die Herstellungskosten erhöhen, die Ausbeute verringern und die erreichbare Reinheit der erhaltenen bispezifischen Antikörper begrenzen. Natürlich wird die funktionale Expression von bispezifischen Antikörperderivaten in einem geeigneten Ein-Wirt-System auch gegenüber herkömmlichen Verfahren bevorzugt, die auf einer nichtfunktionalen Expression, gefolgt durch eine vollständige Denaturierung des rekombinanten Proteins

und eine anschließende Umfaltung, beruhen. Demgemäß werden effiziente Verfahren für die funktionale Expression von bispezifischen Antikörpern in Ein-Wirt-Systemen im Vergleich zu anderen Verfahren besonders bevorzugt.

[0006] Zusätzlich zur funktionalen Expression von bispezifischen einkettigen Antikörpern in Säugerzellen ist das einzige Ein-Wirt-System, das vorwiegend bispezifische Antikörperfragmente erzeugt und sich für die Produktionssteigerung als geeignet erwiesen hat, die Expression von Diabody im Periplasma von *E. coli*, die auf der bevorzugten Dimerisierung von zwei unterschiedlichen Polypeptidketten basiert (Hollinger, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 6444–6448). Jüngst veröffentlichte bispezifische Miniantikörper, die auch im Periplasma von *E. coli* exprimiert werden (Müller, FEBS Letters 422 (1998), 259–264), haben dennoch deren Eignung für eine Produktionssteigerung gezeigt. Was die funktionale Expression von kleinen bifunktionalen Antikörperkonstrukten anbetrifft, die mindestens einen Nicht-Immunglobulinanteil umfassen, erfüllen nur Säuger-Wirtszellen die Expressionsanforderungen völlig. Dies ist darauf zurückzuführen, daß Nicht-Immunglobulinanteile wie die extrazellulären Domänen von zellulären Rezeptoren oft glycosyliert sind und häufig Ig-Antigen-Bindungsstellen hinsichtlich der strukturellen Komplexität übertreffen. Im Gegensatz zu Säugersystemen erfüllen *E. coli*-, Hefe- oder Baculovirus-Systeme diese Anforderungen nicht oder nur teilweise.

[0007] Zum Beispiel kommen viele der N-verknüpften Kohlenhydrate von Wirbeltier-Glycoproteinen nicht in *E. coli* vor (z. B. Sialsäure). Solche Kohlenhydrate haben wichtige Funktionen bei der Zell-Zell-Erkennung, Adhäsion und Proteinfunktion. Zusätzlich ist die O-Glycosylierung, die auch in *E. coli* vorkommt, grundsätzlich verschieden zu O-Glycosylierungsprozessen in Säugern, da unter anderem unterschiedliche Kohlenhydrate angehängt werden.

[0008] Wie durch Andere gezeigt worden ist (Gerstmayer, J. Immunol. 158 (1997), 4584–4590), ist eine geeignete Form für die Expression solcher bifunktionaler Antikörperkonstrukte, umfassend Nicht-Immunglobulinanteile, in höheren Wirtszellen die einkettige Form. Während die einkettige Form eine Reihe von wesentlichen Vorteilen besitzt, nimmt man im allgemeinen an, daß viele der darin enthaltenen Nicht-Immunglobulinanteile den nativen N-Terminus innerhalb von bifunktionalen einkettigen Molekülen benötigen, um ihre Funktion beizubehalten. Als Folge davon muß die Ig-Antigen-Bindungsstelle innerhalb einer solchen einzelnen Kette am C-Terminus eingebaut werden. Jedoch geht in solchen Konstrukten die Antigen-Bindungsaktivität in der C-terminalen Position oft verloren (vgl. Beispiel 8). Dies trifft selbst dann zu, wenn das vorteilhafte Säuger-Expressionssystem verwendet wird. Daher kam man zu dem Schluß, daß der Einketten-Ansatz keine allgemein verwendbare Form für die funktionale Expression von bifunktionalen Antikörperkonstrukten bereitstellt.

[0009] Demgemäß war das technische Problem, das der vorliegenden Erfindung zugrunde liegt, die Entwicklung einer Molekülform für die funktionale Expression von bi- oder multifunktionalen Antikörperkonstrukten, die für Kombinationen eines bestimmten scFv-Antikörperfragments, gegebenenfalls in Kombination mit verschiedenen Nicht-Immunglobulinanteilen, allgemein verwendbar ist. Die Lösung dieses technischen Problems wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen erreicht.

[0010] Demgemäß betrifft die vorliegende Erfindung eine multifunktionale Verbindung, herstellbar in einer Säuger-Wirtszelle als ein sekretierbares und voll funktionales Heterodimer aus zwei Polypeptidketten, wobei eine der Polypeptidketten als einzige konstante Domänenregion einer schweren Immunglobulinkette die C_{H1}-Domäne umfaßt und die andere Polypeptidkette die konstante C_L-Domäne einer leichten Immunglobulinkette umfaßt, wobei die Polypeptidketten weiterhin, fusioniert an die konstanten Domänenregionen, mindestens zwei und bis zu vier (Poly)peptide mit unterschiedlichen Rezeptor- oder Ligandenfunktionen umfassen, wobei weiterhin mindestens zwei der unterschiedlichen (Poly)peptide keine intrinsische Affinität füreinander haben und wobei die Polypeptidketten über die konstanten Domänen verbunden sind.

[0011] Der Begriff "multifunktionale Verbindung", so wie hierin verwendet, kennzeichnet eine Verbindung, die zwei Polypeptidketten umfaßt, wobei die Verbindung mindestens zwei funktionale Domänen umfaßt, die unterschiedliche Funktionen vermitteln. Solche multifunktionalen Verbindungen schließen z. B. bi-, tri- oder tetraspezifische Heterominkörper ein. Der Begriff "Heterominkörper" bezeichnet ein Heterodimer aus zwei unterschiedlichen Polypeptidketten, wobei die Domänen, welche die Heterodimerisierung vermitteln, ausschließlich aus den konstanten Immunglobulin-Domänenregionen C_{H1} und C_L bestehen.

[0012] Der Begriff "Domänen mit einer Rezeptor- oder Ligandenfunktion" in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung kennzeichnet funktionale Domänen, umfassend eine dreidimensionale Struktur, die in der Lage ist, spezifisch an ein Molekül zu binden oder damit in Wechselwirkung zu treten. Solche Moleküle können, aber sind nicht darauf begrenzt, Peptide oder Polypeptide und deren posttranslationalen Modifikationen sein. Diese posttranslationalen Modifikationen umfassen, aber sind nicht darauf begrenzt, Glycosylierungen (Nund/oder O-Glycosylierungen), Tyrosin-Sulfatierung, Phosphorylierung und/oder Prolin-Hydroxylierung.

[0013] Der Begriff "unterschiedliche (Poly)peptide haben keine intrinsische Affinität füreinander" bedeutet in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung, daß die unterschiedlichen (Poly)peptide natürlicherweise nicht die Tendenz haben, sich unter physiologischen Bedingungen zusammenzulagern, wie es zum Beispiel bei V_H- und V_L-Ketten der Fall ist.

[0014] Der Begriff "voll funktional" bedeutet in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung, daß die er-

findungsgemäßen Verbindungen, die durch Säuger-Wirtszellen in den Kulturüberstand sezerniert werden, im Gegensatz zu z. B. Proteinen, die als Einschlußkörper in *E. coli* exprimiert werden, keine Proteinfaltung nach der Reinigung erfordern. Alle Untereinheiten der erfindungsgemäßen Verbindungen sind richtig gefaltet und zeigen folglich ihre spezifischen Funktionen einfach dadurch, daß sie in Säuger-Wirtszellen exprimiert und durch diese sezerniert werden.

[0015] Folglich stellt die vorliegende Erfindung eine multifunktionale Verbindung bereit, die zwei unterschiedliche Polypeptidketten umfaßt, wobei die wirksame Heterodimerisierung der Polypeptidketten während des Expressions- und des Sekretionsprozesses in Säuger-Wirtszellen durch die Wechselwirkung der vorstehend spezifizierten konstanten Domänenregionen einer leichten und einer schweren Immunglobulinkette vermittelt wird.

[0016] Die Heterodimerisierung von konstanten Immunglobulindomänen ermöglicht die Wechselwirkung von mindestens zwei zusätzlichen, unterschiedlichen (Poly)peptidketten, die daran fusioniert sind und keine intrinsische Affinität füreinander haben, in einem einzigen Säuger-Expressionssystem, wodurch weiterhin eine relevante posttranslationale Modifikation ermöglicht wird und eine sekretierbare Verbindung mit einer höheren strukturellen Komplexität erhalten wird.

[0017] Die Domänen der erfindungsgemäßen multifunktionalen Verbindung mit einer Rezeptor- oder Ligandenfunktion können entweder an den C- oder den N-Terminus der einen oder der beiden konstanten Immunglobulindomänen gebunden sein. Daher stellt die vorliegende Erfindung multifunktionale Verbindungen bereit, die bi-, tri- oder tetrafunktionale Moleküle umfassen können, wobei jede der Rezeptor- oder Ligandenfunktionen an entweder den C- oder den N-Terminus der konstanten Immunglobulindomänen gebunden sein kann.

[0018] Die Bindung der funktionalen Domänen an die konstanten Immunglobulindomänen kann z. B. mittels der Gentechnik, wie in den Beispielen beschrieben, bereitgestellt werden. Verfahren zur Herstellung von fusionierten oder funktionell verbundenen Polypeptidketten und zur deren Expression in Säugerzellen sind auf dem Fachgebiet gut bekannt (z. B. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

[0019] Wie vorstehend ausführlich beschrieben worden ist, wurde festgestellt, daß die Lösung für die verschiedenen Probleme, die gemäß dem Stand der Technik behandelt werden, eine Molekülform ist, die aus zwei unterschiedlichen Polypeptidketten besteht, wobei eine Polypeptidkette die C_{H1}-Domäne einer schweren Immunglobulinkette enthält, und die andere Polypeptidkette die konstante Domäne einer leichten Immunglobulinkette enthält, wodurch eine wirksame Heterodimerisierung der Polypeptidketten während des Expressions- und des Sekretionsprozesses in Säuger-Wirtszellen vermittelt wird. Diese Molekülform stellt im Gegensatz zur einkettigen Form gemäß dem Stand der Technik vorteilhafterweise zwei N-terminale Positionen bereit, und es wurde gezeigt, daß sie durch Säuger-Wirtszellen wirksam in den Kulturüberstand sezerniert wird, wo sie als voll funktionales und hinreichend glycosyliertes, heterodimeres Protein vorliegt, das einfach gereinigt werden kann.

[0020] Außerdem stellt die erfindungsgemäße Molekülform zusätzlich zwei C-terminale Positionen bereit, die durch weitere Proteindomänen besetzt werden können, wobei eine multifunktionale Verbindung erhalten wird, die mehr als zwei unterschiedliche funktionale Einheiten trägt. In dem Fall, daß zwei unterschiedliche (Poly)peptide, die keine Tendenz haben, sich unter den vorstehend angeführten Bedingungen zusammenzulagern, an die N-Termini der konstanten Domänenregionen fusioniert sind, kann an jedem C-Terminus der konstanten Domänenregionen eine V_H- bzw. eine V_L-Region gefunden werden. Die Identifizierung von geeigneten Heterodimerisierungsdomänen, die die vorstehend erwähnten Kriterien erfüllen, war keine einfache Aufgabe, da Strategien zum Erhalt einer bevorzugten Heterodimerisierung in Ein-Wirt-Expressionssystemen, vorzugsweise mit zwei unterschiedlichen Rezeptoren oder Liganden, die keine intrinsische Affinität füreinander haben, unter Verwendung von Heterodimerisierungsdomänen bisher scheiterten oder noch entwickelt werden mußten. Es wurde zum Beispiel gezeigt, daß Heterodimerisierungsdomänen auf der Basis von Leucin-Reißverschlüssen die Heterodimerisierung in Ein-Wirt-Expressionssystemen von Polypeptidketten, die eine intrinsische Tendenz, wenn auch eine sehr schwache, zu einer Heterodimerisierung miteinander aufweisen (Chang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994), 11408–11412; Kalandadze, *J. Biol. Chem.* 271 (1996), 20156–20162), wie die α - und β -Ketten von T-Zell-Rezeptoren oder MHC-Klasse II-Moleküle, erleichtern können. Jedoch werden im Fall von zwei unterschiedlichen Proteinen, die keine intrinsische Affinität füreinander haben oder eine gewisse intrinsische Affinität füreinander haben, aber keine Heterodimerisierungspräferenz zeigen, wie zum Beispiel die zwei unterschiedlichen Antigen-Bindungsstellen innerhalb von heterodimeren bispezifischen Antikörpern, die auf jun- und fos-Domänen basieren, in Ein-Wirt-Expressionssystemen quantitativ Homodimere anstelle von Heterodimeren hergestellt (de Kruijff, *J. Biol. Chem.* 271 (1996), 7630–7634). Solche jun- und fos-Homodimere konnten *in vitro* dissoziiert, gemischt und Bedingungen, die die Reassoziierung ermöglichen, unterworfen werden, wobei sich herausstellte, daß vorwiegend jun-fos-Heterodimere erhalten werden (Kostelny, *J. Immunol.* 148 (1992), 1547–1553). Ein in der Natur vorkommendes Beispiel einer Protein-Heterodimerisierung findet man bei Immunglobulinen, wo sich schwere und leichte Ketten zusammenlagern, um die Antigen-Bindungsstellen zu bilden. In dem Antikörpermolekül wird die Heterodimerisierung der variablen Domänenregionen V_L und V_H, die eine intrinsische Affinität füreinander haben, durch die konstanten Domänenregi-

onen C_L und C_{H1} ermöglicht. So war es nicht überraschend, daß C_L und C_{H1} auch die Dimerisierung von scFv-Fragmenten unterstützen konnten (Müller, FEBS Letters 422 (1998), 259–264), da scFv-Fragmente bekanntermaßen auch Dimere miteinander bilden, selbst ohne die Unterstützung von speziellen Dimerisierungsdomänen (Korff, Eur. J. Biochem. 221 (1994), 151–157; Griffiths, EMBO J. 12 (1993), 725–734). Die autochthone Dimerisierung von scFv-Fragmenten ist höchstwahrscheinlich auf die Disruption von hydrophoben Mustern an der Grenzlinie von variablenkonstanten Domänen eines Antikörpers zurückzuführen, wodurch Reste, die normalerweise in intakten Immunglobulinen oder in Fab-Fragmenten abgeschirmt sind, dem Lösungsmittel ausgesetzt werden (Nieba, Protein Eng. 10 (1997), 435–444). So war gemäß dem Stand der Technik bekannt, daß C_L - und C_{H1} -Domänen ähnlich wie jun- und fos-Domänen den autochthonen Dimerisierungsprozeß von Polypeptiden mit einer intrinsischen Affinität füreinander unterstützen, wodurch die Bildung von Heterodimeren gegenüber Homodimeren begünstigt wird. Der Ansatz der vorliegenden Erfindung ermöglicht jedoch die Heterodimerisierung von zwei unterschiedlichen (Poly)peptidketten, die keine intrinsische Affinität füreinander haben, in einem Ein-Wirt-Expressionssystem, wobei die (Poly)peptide an die konstanten Domänenregionen fusioniert sind.

[0021] So wurde überraschend festgestellt, daß C_L - und C_{H1} -Domänen (ausschließlich allein) ausreichende Dimerisierungskräfte bereitstellen können, die in der Lage sind, unterschiedliche Rezeptoren oder Liganden (z. B. CD80 und das M79scFv-Fragment, vgl. Beispiel 1) zu verknüpfen, die sich normalerweise gar nicht autochthon zusammenlagern oder die aus sterischen und thermodynamischen Gründen in einem gewissen Umfang selbst gegen eine Heterodimerisierung beständig sein können. Daher ermöglicht der Ansatz der vorliegenden Erfindung die Heterodimerisierung von zwei unterschiedlichen (Poly)peptidketten, die keine intrinsische Affinität füreinander haben, in einem Ein-Wirt-Expressionssystem, wobei die (Poly)peptide an die konstanten Domänenregionen fusioniert sind. Es ist besonders bedeutsam, daß dieser Ansatz die funktionalen Expressions- und Sekretionsanforderungen von Säuger-Wirtszellen erfüllt, wodurch auf der Basis einer Heterodimerisierung multifunktionale (wie bi-, tri- oder tetrafunktionale) Verbindungen ermöglicht werden, die glycosyliert sein können und eine höhere strukturelle Komplexität aufweisen können. Die Identifizierung von Oligomerisierungsdomänen, die im allgemeinen die Expressions- und Sekretionsanforderungen von Säuger-Wirtszellen erfüllen, war keineswegs selbstverständlich, da sich herausstellte, daß die praktische Brauchbarkeit solcher Domänen in bakteriellen Expressionssystemen nichts über ihre Eignung in Säuger-Wirtszellen aussagt. Die in Beispiel 9 gezeigten Ergebnisse veranschaulichen diesen allgemeinen Widerspruch.

[0022] Erfindungsgemäß wurde überraschend festgestellt, wie in den Beispielen gezeigt, daß die als "Heterominikörper" bezeichnete, erfindungsgemäße Molekülform in der Lage ist, viele verschiedene und eine unterschiedliche Anzahl (bis zu 4) von Polypeptiden mit einer Rezeptor- oder Ligandenfunktion, fusioniert an den N- und/oder C-Terminus von C_L oder C_{H1} , zu tragen, ohne daß die Herstellbarkeit als sekretierbares und voll funktionales Molekül in Säuger-Wirtszellen verloren geht.

[0023] Bifunktionale Antikörperderivate, die in den Beispielen 1–4 (entsprechende Ausführungsformen davon werden nachstehend auch beschrieben) und in Übereinstimmung mit der erfindungsgemäßen Molekülform hergestellt werden, bestehen aus einem scFv-Antikörperfragment, das gegen ein Tumor-assoziiertes Antigen, z. B. 17–1A oder Lewis-Y, gerichtet ist, und dem extrazellulären Teil von Zellrezeptoren (z. B. CD80, CD86, CD58, CD54), die vorwiegend auf Antigen präsentierenden Zellen, z. B. dendritische Zellen, exprimiert werden und für ihre T-Zellen co-stimulierende und/oder Adhäsionsfunktion bekannt sind. Eines dieser bifunktionalen Antikörperderivate, Heterominikörper M79scFvCK/CD80– C_{H1} , wurde umfassend auf seine funktionale Aktivität getestet. Es wurde gezeigt, daß das rekombinante Molekül an sein natives Zielantigen 17–1A auf intakten Zellen bindet, und es wurde überraschend festgestellt, daß es anschließend nicht nur ein notwendiges co-stimulierendes Signal für naive T-Lymphocyten auf Grund seines CD80 (B7-1)-Arms bereitstellt, sondern auch eine ausreichende Co-Stimulierung vermittelt, um naive $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen zu primen, die gleichzeitig das erste Aktivierungssignal über einen bispezifischen einkettigen anti-17-1A × anti-CD3-Antikörper (Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021–7025), auch als M79scFv-antiCD3scFv bezeichnet, erhalten. Die Priming-Ereignisse konnten durch die Umschaltung des T-Zell-Oberflächenphänotyps von naiven T-Lymphocyten ($CD45RA^+RO^-$) zu demjenigen von geprimten T-Lymphocyten ($CD45RA^-RO^+$) eindeutig gezeigt werden und durch die Bestimmung der charakteristischen Cytokine im Überstand der T-Zellen bestätigt werden. Die abschließliche Sekretion von INF- γ , aber nicht von IL-5 und IL-4, durch in vitro geprimte $CD4^+$ -T-Lymphocyten zeigte interessanterweise außerdem, daß der Heterominikörper M79scFvCK/CD80CH1 selektiv das Priming und die Differenzierung von $CD4^+$ -T-Zellen, die den TH1-Phänotyp zeigen, vermittelt, wobei angenommen wird, daß auf diese Weise die zelluläre Immunantwort gegen Tumorzellen in vivo vorteilhafterweise verlängert wird. Für andere bifunktionale, tumorspezifische B7 (CD80 oder CD86)-Konstrukte, die in der Literatur beschrieben sind, ist bisher niemals gezeigt worden, daß sie eine ausreichende Co-Stimulierung für das Priming von naiven T-Zellen bereitstellen (Gerstmayer, J. Immunol. 158 (1997), 4584–4590; Challita-Eid, J. Immunol. 160 (1998), 3419–3426). Es wird in Betracht gezogen, daß solche co-stimulierenden Heterominikörper-Konstrukte in vivo allein oder in Kombination mit einem bispezifischen Antikörper, der unabhängig von dem clonotypischen T-Zell-Rezeptor das primäre T-Zell-Aktivierungssignal bereitstellt, verwendet werden können. Es

wird ferner in Betracht gezogen, daß eine solche Kombination durch die strukturelle Kombination von Merkmalen beider Moleküle innerhalb einer multifunktionalen Verbindung gemäß der erfindungsgemäßen Molekülform, wie in Beispiel 7 beschrieben und in **Fig. 23** dargestellt, erhalten werden kann.

[0024] Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung eine multifunktionale Verbindung, die aus zwei Polypeptidketten besteht, wobei eine der Polypeptidketten als einzige konstante Domänenregion einer schweren Immunglobulinkette die C_{H1} -Domäne umfaßt, und die andere Polypeptidkette die konstante C_L -Domäne einer leichten Immunglobulinkette umfaßt, wobei die Polypeptidketten weiterhin, fusioniert an die konstanten Domänenregionen, mindestens zwei (Poly)peptide mit unterschiedlichen Rezeptor- oder Ligandenfunktionen umfassen, wobei ferner mindestens zwei der unterschiedlichen (Poly)peptide keine intrinsische Affinität füreinander haben und wobei die Polypeptidketten über die konstanten Domänen verknüpft sind. Vorteilhafterweise ist die multifunktionale Verbindung in einer Säuger-Wirtszelle als ein sekretierbares und voll funktionales Heterodimer herstellbar.

[0025] In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt die erfindungsgemäße multifunktionale Verbindung mindestens drei funktionale Domänen mit einer Rezeptor- oder Ligandenfunktion, wobei ein trispezifischer Heterominkörper bereitgestellt wird.

[0026] In einer stärker bevorzugten Ausführungsform umfaßt die erfindungsgemäße multifunktionale Verbindung vier Domänen mit einer Rezeptor- oder Ligandenfunktion, wobei für eine multifunktionale Verbindung/einen Heterominkörper gesorgt wird, die/der in allen vier Positionen Effektordomänen aufweist. Eine solche multifunktionale Verbindung kann bi-, trioder tetraspezifisch sein.

[0027] Die vorliegende Erfindung betrifft in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform auch die erfindungsgemäße multifunktionale Verbindung, wobei mindestens zwei Domänen mit einer Rezeptor- oder Ligandenfunktion N-terminal an die konstanten C_{H1} - oder C_L -Domänen gebunden sind. Zusätzlich betrifft die vorliegende Erfindung in einer noch weiteren bevorzugten Ausführungsform die erfindungsgemäße multifunktionale Verbindung, wobei mindestens zwei Domänen mit einer Rezeptor- oder Ligandenfunktion C-terminal an die C_{H1} - oder C_L -Domänen gebunden sind. In diesem Fall müssen C_{H1} und/oder C_L , die keine Rezeptor- oder Ligandenregionen an ihrem N-Terminus tragen, ein N-terminales Leaderpeptid tragen, das vorzugsweise von einer schweren oder leichten Immunglobulinkette stammt, um die Sekretion durch Säuger-Wirtszellen zu ermöglichen.

[0028] Alle der vorstehenden Ausführungsformen ziehen multifunktionale Verbindungen/Heterominkörper in Betracht, wobei zwei oder mehrere funktionale Domänen/Effektordomänen N- oder C-terminal an die gleiche konstante (C) Domäne fusioniert sind. Zum Beispiel, falls jede N- und/oder C-terminale Position der C-Domänen durch eine Effektor-/funktionale Domäne besetzt ist, dann können eine oder mehrere zusätzliche Effektor-/funktionale Domänen an jede der Effektordomänen in dieser Position fusioniert sein. Ein Beispiel dieses Konstrukt-Typs ist in **Fig. 52** bereitgestellt.

[0029] Falls Polypeptide mit Rezeptor- oder Ligandenfunktionen aus den extrazellulären Teilen von integralen Transmembranproteinen vom Typ I oder Typ II bestehen, wird bevorzugt, daß extrazelluläre Teile von Typ I-Proteinen an den N-Terminus von C_L oder C_{H1} fusioniert sind, während extrazelluläre Teile von Typ II-Proteinen vorzugsweise an den C-Terminus von C_L oder C_{H1} fusioniert sind.

[0030] Polypeptide mit einer Rezeptor- oder Ligandenfunktion sind vorzugsweise an den N- oder C-Terminus von C_L oder C_{H1} über Ig-Hinge-Regionen oder flexible Peptidlinker, z. B. über einen Glycin-Serin-Linker, fusioniert, um die Funktionalität der Polypeptide sicherzustellen. Linker unterschiedlicher Art oder Länge können ohne übermäßige Mühe identifiziert werden, um die volle funktionale Aktivität von spezifischen Polypeptiden zu erhalten.

[0031] In einer noch anderen bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung die erfindungsgemäße multifunktionale Verbindung, wobei mindestens eine der Domänen mit einer Rezeptor- oder Ligandenfunktion in Form eines scFv-Fragments oder eines funktionalen Teils davon vorliegt.

[0032] Die erfindungsgemäße multifunktionale Verbindung, wobei mindestens eine der Domänen mit einer Rezeptor- oder Ligandenfunktion ein T-Zellen co-stimulierender Ligand, eine Antigen-Bindungsregion, spezifisch für ein Tumor-assoziiertes Antigen, oder eine proteinartige Verbindung ist, die das primäre Aktivierungssignal für T-Zellen bereitstellt, ist noch eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung.

[0033] Eine hinreichende Aktivierung, die das Priming von naiven T-Zellen zur Folge hat, ist für primäre Immunantworten entscheidend und hängt von zwei Signalen ab, die von professionellen APCs (Antigen-präsentierenden Zellen) wie dendritische Zellen stammen. Das erste Signal ist antigenspezifisch und wird normalerweise durch die Stimulierung des clonotypischen T-Zell-Antigen-Rezeptors vermittelt, der durch das prozessierte Antigen, das im Zusammenhang mit MHC-Klasse I- oder MHC-Klasse II-Molekülen präsentiert wird, induziert wird. Jedoch ist dieser primäre Reiz nicht ausreichend, um die Antworten von naiven T-Zellen zu primen, und ein zweites Signal ist erforderlich, das durch die Wechselwirkung von spezifischen T-Zell-Oberflächenmolekülen, die an co-stimulierende Ligandenmoleküle auf Antigen-präsentierenden Zellen binden, bereitgestellt wird, wobei ferner die Proliferation von geprimten T-Zellen begünstigt wird. Der Begriff "T-Zellen costimulierender Ligand" verweist daher im Hinblick auf die vorliegende Erfindung auf Moleküle, die in der Lage

sind, das Priming von naiven T-Zellen in Kombination mit dem primären Reiz zu unterstützen, und die Vertreter der B7-Proteinfamilie, einschließlich B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86), einschließen, aber nicht darauf begrenzt sind.

[0034] Eine Antigen-Bindungsregion, spezifisch für ein Tumor-assoziiertes Antigen, kennzeichnet Antikörperfragmente, die gegen ein auf dem Fachgebiet bekanntes Tumor-assoziiertes Antigen, z. B. 17-1A oder Lewis-Y, Muc1, erbB2 oder s-Tn, gerichtet sind.

[0035] Im Hinblick auf die vorliegende Erfindung können "proteinartige Verbindungen, die das primäre Aktivierungssignal für T-Zellen bereitstellen", anti-CD3-scFv-Fragmente, anti-T-Zell-Rezeptor-scFv-Fragmente oder Superantigene umfassen, aber sind nicht darauf begrenzt. Superantigene binden in einer MHC-unabhängigen Weise direkt an die variablen Regionen bestimmter Unterfamilien von T-Zell-Rezeptoren, wodurch das primäre T-Zell-Aktivierungssignal übermittelt wird.

[0036] Außerdem betrifft die Erfindung in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform die erfindungsgemäße multifunktionale Verbindung, wobei das scFv-Fragment oder der funktionale Teil davon die V_H - und die V_L -Regionen des murinen anti-17-1A-Antikörpers M79 (Göttlinger, Int. J. Cancer 38 (1986), 47), die V_H - und die V_L -Regionen des anti-Lewis-Y-Antikörpers, wie in **Fig. 6** dargestellt, die V_H - und die V_L -Regionen des anti-CD3-Antikörpers TR66 (Traunecker, EMBO J. 10 (1991), 3655) und/oder die V_H - und die V_L -Regionen des menschlichen anti-Mensch-EpCAM-Antikörpers, wie in **Fig. 55** gezeigt (basierend auf dem entsprechenden menschlichen anti-Mensch-EpCAM-Antikörper "HD70", wie in WO 98/46645 beschrieben) umfaßt.

[0037] In einer stärker bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung die erfindungsgemäße multifunktionale Verbindung, wobei der T-Zellen co-stimulierende Ligand ein Zelloberflächenmolekül oder ein Fragment davon ist, das auf Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) exprimiert wird.

[0038] In einer noch mehr bevorzugten Ausführungsform umfaßt die erfindungsgemäße multifunktionale Verbindung eine Antigen-präsentierende Zelle, die eine dendritische Zelle ist.

[0039] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung außerdem die erfindungsgemäße multifunktionale Verbindung, wobei das Zelloberflächenmolekül auf einer APC ein T-Zellen co-stimulierender Faktor wie B7-1 (CD80) oder B7-2 (CD86) oder ein Adhäsionsprotein wie LFA-3 (CD58), ICAM-1 (CD54), ICAM-2 oder ICAM-3 oder wie der CD137-Ligand ist.

[0040] Die erfindungsgemäße multifunktionale Verbindung, wobei mindestens eine der Domänen mit einer Rezeptor- oder Ligandenfunktion ein immunmodulierendes Effektormolekül oder ein Fragment davon ist, ist eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung. Ein immunmodulierendes Effektormolekül beeinflusst positiv und/oder negativ das humorale und/oder zelluläre Immunsystem, besonders dessen zelluläre und/oder nichtzelluläre Komponenten, dessen Funktionen und/oder dessen Wechselwirkungen mit anderen physiologischen Systemen.

[0041] In einer noch mehr bevorzugten Ausführungsform ist das immunmodulierende Effektormolekül gewählt aus der Gruppe, bestehend aus Cytokinen, Chemokinen, Makrophagen-Migrationshemmfaktor (MIF; wie beschrieben unter anderem bei Bernhagen, Mol. Med. 76 (3-4) (1998), 151-161, oder Metz, Adv. Immunol. 66 (1997), 197-223), T-Zell-Rezeptoren und löslichen MHC-Molekülen. Solche immunmodulierenden Effektormoleküle sind auf dem Fachgebiet gut bekannt und sind unter anderem beschrieben bei Paul, "Fundamental Immunology", Raven Press, New York (1989). Insbesondere sind bekannte Cytokine und Chemokine beschrieben bei Meager, "The Molecular Biology of Cytokines" (1998), John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, West Sussex, England; Bacon, Cytokine Growth Factor Rev. 9(2) (1998), 167-173; Oppenheim, Clin. Cancer Res. 12 (1997), 2682-2686; Taub, Ther. Immunol. 1(4) (1994), 229-246; oder Michiel, Semin. Cancer Biol. 3(1) (1992), 3-15.

[0042] Besonders bevorzugt werden Cytokine, die gewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus Interleukin(en), Interferon(en), TNF(s) und VEGF (Veikkola, Semin. Cancer Biol. 9(3), 211-220), wobei das (die) Interleukin(e) IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17 und IL-18 umfaßt (umfassen), aber nicht darauf begrenzt ist; wobei das (die) Interferone) IFN- γ sowie IFN- β und IFN- α umfaßt (umfassen); und wobei der (die) TNF(s) Vertreter der Lymphotoxin-Superfamilie wie TNF- α und TNF- β umfaßt (umfassen) (Gruss, Int. J. Clin. Lab. Res. 26(3) (1996), 143-159). Andere geeignete Cytokine sind auf dem Fachgebiet gut bekannt und umfassen unter anderem GM-CSF, G-CSF und M-CSF. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das immunmodulierende Effektormolekül ein Chemokin und ist gewählt aus der Gruppe, bestehend aus IL-8, Eotaxin, GRO α , GRO β , GRO γ , IP-10, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , NAP-2, RANTES, I309, Lymphotactin, SDF-1 und C5a.

[0043] Im Schutzzumfang der vorliegenden Erfindung sind außerdem multifunktionale Verbindungen eingeschlossen, wobei die Domänen unter anderem verschiedene immunmodulierende Effektormoleküle umfassen, gegebenenfalls in Kombination mit Domänen, die in Form eines scFv-Fragments vorliegen. Besonders bevorzugt werden multifunktionale Verbindungen, die einen Heterominkörper mit C-terminal gebundenen Cytokinen wie IL-2 und GM-CSF und N-terminal gebundenen scFvs, die zum Beispiel EpCAM erkennen, wie in den beigefügten Beispielen veranschaulicht, umfassen können. Diese Moleküle sind nicht auf die Aktivierung von Effektorzellen begrenzt, die speziell durch ein einzelnes Cytokin aktiviert werden. Durch Addition von zwei funk-

tionalen Domänen mit einer Ligandenfunktion und umfassend zwei verschiedene Cytokine kann diese multifunktionale Komponente in der Aktivierung eines größeren Spektrums von Effektorzellen in einer Tumorumgebung nützlich sein. Auf diese Weise können die Effektorzellen stimuliert werden, um eine Immunantwort gegen (umgebende) Tumorzellen und/oder Zellen, die durch ein malignes Zellwachstum betroffen sind, hervorzurufen. Diese Konstrukte behalten ihre geeigneten biologischen Aktivitäten bei, wie in dem beigefügten Beispiel 11 veranschaulicht, und können Anwendung finden in der Therapie und/oder bei der Verhinderung eines malignen Zellwachstums.

[0044] In einer noch anderen bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die erfindungsgemäße multifunktionale Verbindung, wobei mindestens eine der Domänen mit einer Rezeptor- oder Ligandenfunktion ein FAS-Ligand (CD95L) oder ein Fragment davon ist. Der FAS-Ligand (CD95L) ist auf dem Fachgebiet gut bekannt und ist unter anderem beschrieben bei Janeway und Travers, "Immunologie", Spektrum Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford (1997).

[0045] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung außerdem die erfindungsgemäße multifunktionale Verbindung, wobei die Domäne(n) mit einer Rezeptor- oder Ligandenfunktion ein Wachstumsfaktor oder ein Fragment davon ist (sind). Der Wachstumsfaktor kann außerdem ein modifizierter Wachstumsfaktor mit einer Bindungsaktivität für seinen relevanten Faktor sein, aber kann auch als ein Antagonist wirksam sein. Da viele Tumoren oder andere Zellen (die ein Ziel (Ziele) für die hierin beschriebenen multifunktionalen Verbindungen sein können) Rezeptoren für Wachstumsfaktoren auf ihrer Oberfläche exprimieren, kann diese Molekülart bei der zielgerechten Hinleitung nützlich sein. Wachstumsfaktoren umfassen, aber sind nicht begrenzt auf, EGF (epidermalen Wachstumsfaktor)-Liganden der ErbB-Rezeptorfamilie, MSH und Interleukin 1 (IL-1). Außerdem sind Wachstumsfaktoren und Modifikationen davon auf dem Fachgebiet gut bekannt und unter anderem beschrieben bei Gullick, *Cancer Surv.* 27 (1996), 339–349; Siegall, *Recent Results Cancer Res.* 140 (1996), 51–60; Carithers, *Chem. Biol.* 3(7) (1996), 537–542; oder Bresnihan, *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 24(3) (1998), 615–628.

[0046] Zusätzlich betrifft die vorliegende Erfindung in einer besonders bevorzugten Ausführungsform die erfindungsgemäße multifunktionale Verbindung, wobei die Domäne(n) mit einer Rezeptor- oder Ligandenfunktion ein Angiogenese-Inhibitor (wie unter anderem definiert bei Malonne, *Clin. Exp. Metastasis* 17(1) (1999), 1–14; Veikkola, *Semin. Cancer Biol.* 9(3) (1999), 211–220; Desa, *J. Immunother.* 22(3) (1999), 186–211; Strohmeyer, *Anticancer Res.* 19(2C) (1999), 1557–1561; Folkman, *Nat. Med.* 1(1) (1995), 27–31) oder ein Fragment davon ist (sind).

[0047] Vorzugsweise umfaßt die erfindungsgemäße multifunktionale Verbindung funktionale Domänen mit einer Rezeptor- oder Ligandenfunktion, die aus einem Säuger stammen. Besonders bevorzugt sind die funktionalen Domänen menschlichen Ursprungs.

[0048] Die erfindungsgemäße multifunktionale Verbindung, wobei die konstante Domäne eine leichte Immunglobulinkette vom κ -Typ ist, ist ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Gegebenenfalls kann die konstante Domäne einer leichten Immunglobulinkette vom λ -Typ sein.

[0049] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die erfindungsgemäße multifunktionale Verbindung, wobei die konstanten Immunglobulindomänen und die vorstehend beschriebenen funktionalen Rezeptor-Liganden-Domänen durch einen Polypeptidlinker verknüpft sind. Dieser Polypeptidlinker, angeordnet zwischen den Immunglobulindomänen und den funktionalen Rezeptor-Liganden-Domänen, umfaßt vorzugsweise mehrere, hydrophile, peptidgebundene Aminosäuren, die kovalent an diese Domänen gebunden sind.

[0050] In einer stärker bevorzugten Ausführungsform umfaßt der Polypeptidlinker eine Ig-Hinge-Region oder eine Vielzahl von Glycin-, Alanin- und/oder Serinresten.

[0051] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Ig-Hinge-Region eine IgG-Hinge-Region.

[0052] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die IgG-Hinge-Region die obere Hinge-Region des menschlichen IgG₃.

[0053] Vorzugsweise umfaßt die erfindungsgemäße multifunktionale Verbindung eine multifunktionale Verbindung, wobei die funktionalen Domänen mit einer Rezeptor- oder Ligandenfunktion GM-CSF, IL-2 und/oder ein oder mehrere scFv-Fragmente, umfassend die V_H- und die V_L-Regionen des menschlichen anti-Mensch-EpCAM-Antikörpers, wie in **Fig. 55** gezeigt, umfassen. Vorzugsweise sind der GM-CSF und das IL-2 C-terminal gebunden an die C_H- oder C_L-Domänen, und das eine oder die mehreren scFv-Fragmente, umfassend die V_H- und die V_L-Regionen des menschlichen anti-Mensch-EpCAM-Antikörpers, sind N-terminal an die konstanten C_{H1}- oder C_L-Domänen gebunden.

[0054] Besonders bevorzugt sind der GM-CSF und das IL-2 menschlichen Ursprungs. Eine solche multifunktionale Verbindung ist für therapeutische und diagnostische Zwecke besonders geeignet. Diese multifunktionale Verbindung, umfassend GM-CSF, IL-2 und die scFv-Fragmente, umfassend die V_H- und die V_L-Region des menschlichen anti-Mensch-EpCAM-Antikörpers, ist in **Fig. 53** dargestellt. In Anbetracht der Tatsache, daß in dieser multifunktionalen Verbindung alle Domänen mit einer Rezeptor- oder Ligandenfunktion(en) sowie die Heterodimerisierungsdomänen menschlichen Ursprungs sind, kann sie für die Behandlung oder die Verhinde-

zung eines malignen Zellwachstums einen spezifischen und besonderen Wert haben. Eine solche multifunktionale Verbindung ist möglicherweise weniger immunogen als ein ähnliches Molekül, welches Domänen aus anderen Spezies enthält. Menschliches IL-2 und menschlicher GM-CSF sind in diesem Zusammenhang besonders nützlich, da diese Cytokine in der Lage sind, einen großen und meist unterschiedlichen Bereich von Effektorzellen zu stimulieren. Ein Konstrukt, wie in **Fig. 53** veranschaulicht, ist bei der Behandlung eines malignen Zellwachstums, insbesondere zur Behandlung von soliden Tumoren wie Karzinome, besonders nützlich.

[0055] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die erfindungsgemäße multifunktionale Verbindung, wobei die C_{H1}-Domäne ferner einen Histidin-Marker, GST, einen Staphylococcus-Protein A-Marker, Lex A, einen FLAG-Marker oder einen MYC-Marker umfaßt. Diese zusätzlichen Sequenzen, die selektiv an einen festen Träger binden können oder für Reinigungszwecke verwendet werden können, können entweder vollständige Polypeptidsequenzen oder Fragmente davon sein. In Anbetracht der Tatsache, daß diese Marker an die C_{H1}-Domäne fusioniert sind, kann die vollständige multifunktionale Verbindung in herkömmlicher Weise isoliert werden.

[0056] Zusätzlich betrifft die vorliegende Erfindung eine multifunktionale Verbindung, wobei die funktionalen Domänen mit einer Rezeptor- oder Ligandenfunktion eine Nicht-Immunglobulindomäne sind oder davon abgeleitet sind. Der Begriff "abgeleitet von" bedeutet in diesem Zusammenhang, daß das Aminosäuremolekül der Nicht-Immunglobulindomäne eine oder mehrere Substitutionen, eine oder mehrere Additionen, eine oder mehrere Inversionen, Duplikationen, eine oder mehrere Rekombinationen etc. umfassen kann.

[0057] Abgesehen davon betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Polynucleotid, das eine und/oder zwei Polypeptidketten der multifunktionalen Verbindung, wie vorstehend definiert, codiert.

[0058] Das Polynucleotid kann mit geeigneten Expressionskontrollsequenzen verknüpft sein, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, um die richtige Transkription und Translation der Polypeptidketten sicherzustellen. Das Polynucleotid kann z. B. DNA, cDNA, RNA oder eine synthetisch hergestellte DNA oder RNA oder ein rekombinant hergestelltes, chimäres Nucleinsäuremolekül, umfassend eines dieser Polynucleotide entweder allein oder in Kombination miteinander, sein. Vorzugsweise ist das Polynucleotid ein Teil eines Vektors. Solche Vektoren können ferner Gene wie Markergene umfassen, welche die Selektion des Vektors in einer geeigneten Wirtszelle und unter geeigneten Bedingungen ermöglichen. Vorzugsweise ist das erfindungsgemäße Polynucleotid funktionell verbunden mit Expressionskontrollsequenzen, um die Expression in eukaryontischen Zellen zu ermöglichen. Die Expression des Polynucleotids umfaßt die Transkription des Polynucleotids in eine translatierbare mRNA. Regulatorische Elemente, welche die Expression in eukaryontischen Zellen, vorzugsweise Säugerzellen, sicherstellen, sind den Fachleuten gut bekannt. Sie umfassen üblicherweise regulatorische Elemente, welche die Initiation der Transkription sicherstellen, und gegebenenfalls Poly-A-Signale, welche die Termination der Transkription und die Stabilisierung des Transkripts gewährleisten. Zusätzliche regulatorische Elemente können transkriptionale als auch translationale Enhancer und/oder natürlicherweise assoziierte oder heterologe Promotorregionen einschließen. Mögliche regulatorische Elemente, welche die Expression in Säuger-Wirtszellen ermöglichen, umfassen den CMV-Promotor, SV40-Promotor, RSV-Promotor (Roussarkom-Virus), menschlichen Elongationsfaktor 1 α -Promotor, CMV-Enhancer oder SV40-Enhancer. Neben Elementen, die für die Initiation der Transkription verantwortlich sind, können solche regulatorischen Elemente auch Transkriptionsterminationssignale wie die SV40-Poly-A-Stelle oder die tk-Poly-A-Stelle stromabwärts des Polynucleotids umfassen. In diesem Zusammenhang sind auf dem Fachgebiet geeignete Expressionsvektoren bekannt, wie der cDNA-Expressionsvektor pcDV1 nach Okayama-Berg (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen), pSPORT1 (Gibco-BRL) und pEF-DHFR (Mack, PNAS 92 (1995), 7021-7025). Vorzugsweise sind die Expressionskontrollsequenzen eukaryontische Promotorsysteme in Vektoren, die Säuger-Wirtszellen transformieren oder transfizieren können. Sobald der Vektor in den geeigneten Wirt eingebaut worden ist, wird der Wirt unter Bedingungen aufrechterhalten, die für eine hohe Expressionsrate der Nucleotidsequenzen geeignet sind, und gegebenenfalls kann sich die Gewinnung und Reinigung des erfindungsgemäßen Polypeptids anschließen.

[0059] Ein Vektor, umfassend mindestens eines der vorstehend erwähnten Polynucleotide, ist ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

[0060] Der erfindungsgemäße Vektor kann z. B. ein Plasmid, Cosmid, Virus, Bakteriophage oder ein anderer Vektor sein, der herkömmlicherweise in der Gentechnik verwendet wird, und kann weitere Gene wie Markergene umfassen, welche die Selektion des Vektors in einer geeigneten Wirtszelle und unter geeigneten Bedingungen ermöglichen.

[0061] In einer anderen Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung eine Säuger-Wirtszelle, umfassend mindestens einen erfindungsgemäßen Vektor.

[0062] In einer bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Säuger-Wirtszelle eine CHO-Zelle oder eine Myelomzelle.

[0063] Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen multifunktionalen Verbindung, wobei das Verfahren das Züchten der erfindungsgemäßen Wirtszelle unter Bedingungen, welche die Synthese der multifunktionalen Verbindung ermöglichen, und das Gewinnen der multi-

funktionalen Verbindung aus der Kultur umfaßt.

[0064] Folglich ermöglicht die vorliegende Erfindung die rekombinante Herstellung von multifunktionalen Verbindungen, die Stellen und Domänen von T-Zellen co-stimulierenden Liganden, Antigen-Bindungsregionen, spezifisch für ein Tumor-assoziiertes Antigen, oder proteinartigen Verbindungen, welche erste Aktivierungssignale für T-Zellen bereitstellen, umfassen. Wie aus dem Vorstehenden ersichtlich ist, stellt die Erfindung eine große Familie von multifunktionalen Verbindungen mit Rezeptor-Liganden-Funktionen zur Verwendung in therapeutischen und diagnostischen Ansätzen bereit.

[0065] Für Fachleute ist ersichtlich, daß die erfindungsgemäßen multifunktionalen Verbindungen ferner an andere Einheiten gekoppelt sein können, z. B. zur Arzneistoff-Hinleitung oder für diagnostische Abbildungsanwendungen. Eine solche Kopplung kann nach der Expression der multifunktionalen Verbindung oder der Expression der Polypeptidketten der Erfindung chemisch durchgeführt werden, oder das Kopplungsprodukt kann in die erfindungsgemäßen Polynucleotide, wie vorstehend besprochen, eingebaut werden. Die Polynucleotide werden dann in einem geeigneten Wirtssystem exprimiert, und die exprimierten multifunktionalen Verbindungen werden gewonnen und gegebenenfalls gereinigt.

[0066] In einer anderen Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung eine Zusammensetzung, umfassend die erfindungsgemäße multifunktionale Verbindung, das erfindungsgemäße Polynucleotid und/oder den erfindungsgemäßen Vektor und gegebenenfalls eine proteinartige Verbindung, welche das primäre Aktivierungssignal für T-Zellen bereitstellen kann. Besonders bevorzugt ist die Zusammensetzung ein Arzneimittel, das weiterhin gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder das Verdünnungsmittel und/oder den Excipienten umfaßt. Erfindungsgemäß sind die proteinartigen Verbindungen, die das primäre Aktivierungssignal für T-Zellen in pharmazeutischen und/oder diagnostischen Zusammensetzungen bereitstellen können, monospezifische oder bispezifische Antikörper, die mit dem CD3-Komplex, dem T-Zell-Rezeptor sowie Verbindungen einschließlich einem Superantigen in Wechselwirkung treten.

[0067] Eine diagnostische Zusammensetzung, umfassend die erfindungsgemäße multifunktionale Verbindung, das erfindungsgemäße Polynucleotid und/oder den erfindungsgemäßen Vektor und gegebenenfalls eine proteinartige Verbindung, die das primäre Aktivierungssignal für T-Zellen bereitstellen kann, und gegebenenfalls geeignete Nachweismittel, ist ebenfalls ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

[0068] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen multifunktionalen Verbindung, des erfindungsgemäßen Polynucleotids und/oder des erfindungsgemäßen Vektors zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verhinderung und/oder Behandlung eines malignen Zellwachstums.

[0069] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die vorstehend beschriebene Verwendung, wobei das maligne Zellwachstum mit Malignitäten von hämatopetischen Zellen oder von soliden Tumoren in Beziehung steht.

[0070] In einer noch mehr bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die erfindungsgemäße Verwendung, wobei die Malignitäten von hämatopetischen Zellen Lymphome oder Leukämien sind.

[0071] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform jedoch betrifft die vorliegende Erfindung die erfindungsgemäße Verwendung, wobei die soliden Tumoren Karzinome, Melanome oder Sarkome sind.

[0072] Ein Kit, umfassend die erfindungsgemäße multifunktionale Verbindung und gegebenenfalls eine proteinartige Verbindung, die das primäre Aktivierungssignal für T-Zellen bereitstellen kann, ist ebenfalls ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

[0073] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung das erfindungsgemäße Arzneimittel, die erfindungsgemäße diagnostische Zusammensetzung oder den erfindungsgemäßen Kit, wobei die proteinartige Verbindung, die das primäre Aktivierungssignal für T-Zellen bereitstellen kann, ein bispezifischer Antikörper ist, der mit dem T-Zell-Antigen CD3 in Wechselwirkung tritt.

[0074] Das erfindungsgemäße Arzneimittel kann ferner einen pharmazeutisch verträglichen Träger, Verdünnungsmittel und Excipienten umfassen. Beispiele geeigneter pharmazeutischer Träger, Verdünnungsmittel und Excipienten sind auf dem Fachgebiet gut bekannt und schließen phosphatgepufferte Salzlösungen, Wasser, Emulsionen wie Öl/Wasser-Emulsionen, verschiedene Arten von Benetzungsmitteln, sterile Lösungen etc. ein. Zusammensetzungen, umfassend solche Träger, können durch gut bekannte herkömmliche Verfahren formuliert werden. Diese Arzneimittel können an das Individuum in einer geeigneten Dosis verabreicht werden. Der proteinartige, pharmazeutisch wirksame Stoff kann in Mengen zwischen 1 ng und 10 mg pro Dosis vorliegen. Die Verabreichung der geeigneten Zusammensetzungen kann über unterschiedliche Wege erreicht werden, z. B. durch intravenöse, intraperitoneale, subkutane, intramuskuläre, topische oder intradermale Verabreichung. Das Dosierungsschema wird durch den behandelnden Arzt und andere klinische Faktoren festgelegt. Wie auf dem Gebiet der Medizin gut bekannt ist, hängen die Dosierungen für einen Patienten von vielen Faktoren ab, einschließlich der Größe des Patienten, der Körperoberfläche, dem Alter, der einzelnen zu verabreichenden Verbindung, dem Geschlecht, der Zeitdauer und dem Weg der Verabreichung, dem allgemeinen Gesundheitszustand und anderen gleichzeitig verabreichten Arzneistoffen.

[0075] Es ist selbstverständlich, daß in dieser Beschreibung und in den folgenden Patentansprüchen, sofern

der Zusammenhang keine andere Deutung erforderlich macht, das Wort "umfassen" und Variationen wie "umfaßt" und "umfassend" die Einbeziehung einer angegebenen ganzen Zahl oder eines angegebenen Schrittes oder einer Gruppe von ganzen Zahlen oder Schritten beinhaltet, aber nicht den Ausschluß einer anderen ganzen Zahl oder eines anderen Schrittes oder einer Gruppe von ganzen Zahlen oder Schritten.

[0076] Die Figuren zeigen:

[0077] **Fig. 1:** Molekulare Anordnung von Heterominkörper M79scFvCH1/CD80CK, dargestellt auf der Proteinebene. C_{H1} und C_K geben die erste konstante Domäne der schweren Kette des menschlichen IgG1 bzw. die konstante Region der leichten Kappa-Kette des menschlichen Ig an, die zusammen, kovalent verknüpft miteinander über eine Disulfidbrücke (S–S), die Heterodimerisierungseinheit bilden. VH gibt die variable Region der schweren Ig-Kette an, und VL gibt die variable Region der leichten Ig-Kette an.

[0078] (B–J) Molekulare Anordnung der Heterominkörper:

(B) M79scFvCK/CD80CH1; (C) M79scFvCH1/CD54CK; (D) M79scFvCK/CD54CH1; (E) M79scFvCH1/CD58CK; (F) M79scFvCK/CD58CH1; (G) M79scFvCH1/CD86CK; (H) M79scFvCK/CD86CH1; (I) antiLeyscFvCH1/CD80CK; (J) antiLeyscFvCK/CD80CH1, dargestellt auf der Proteinebene. Für Einzelheiten vgl. die Legende von **Fig. 1(A)**.

[0079] **Fig. 2:** DNA-Sequenz, bezeichnet als CTI, die in die multiple Clonierungsstelle des Bluescript KS-Vektors (GenBank-Hinterlegungsnummer X52327) unter Verwendung der Restriktionsstellen XbaI und Sall, um die Zahl der möglichen Clonierungsstellen zu erhöhen, cloniert wurde. Die CTI-abgeleiteten Restriktionsenzym-Spaltstellen sind dargestellt.

[0080] **Fig. 3:** Molekulare Anordnung von DNA-Fragmenten, codierend die einzelnen Polypeptidketten der Heterominkörper:

(A) M79scFvCH1/CD80CK; (B) M79scFvCK/CD80CH1; (C) M79scFvCH1/CD54CK; (D) M79scFvCK/CD54CH1; (E) M79scFvCH1/CD58CK; (F) M79scFvCK/CD58CH1; (G) M79scFvCH1/CD86CK; (H) M79scFvCK/CD86CH1; (I) antiLeyscFvCH1/CD80CK; (J) antiLeyscFvCK/CD80CH1.

[0081] Es ist anzumerken, daß einige Heterominkörper die gleiche Polypeptidkette gemeinsam haben. In diesen Fällen sind die entsprechenden Polypeptidketten nur einmal dargestellt. Die Symbole werden wie in den **Fig. 1(A)** und **1(B)** verwendet. Der zur Clonierung und Expression der einzelnen Ketten verwendete Expressionsvektor pEF-DHFR oder pEF-ADA ist angegeben. Lewis-Y ist als Le_Y abgekürzt.

[0082] **Fig. 4:** ELISA-Analyse von Zellkulturüberständen, erhalten aus CHO-Zellen, welche mit dem Expressionsplasmid pEF-DHFR-M79scFvCK-pEF-ADA/CD80CH1 transfiziert wurden, nach verschiedenen Amplifikationsschritten und nach dem Subclonieren. ELISA-Platten mit 96 Vertiefungen wurden mit 50 µl eines löslichen 17-1A-Antigens (50 µg/ml) pro Vertiefung inkubiert. Anschließend wurde der rohe Zellkulturüberstand zugegeben, wie angegeben. Der Nachweis wurde mit einem biotinmarkierten menschlichen CK-Antikörper (Pierce; Kat. Nr. 31780), 1 : 1000 verdünnt, und Peroxidase-konjugiertem Avidin (Dako, Hamburg; Kat. Nr. P0347), 1 : 1000 verdünnt, durchgeführt. Als negative Kontrolle wurden Vertiefungen mit phosphatgepufferter Salzlösung inkubiert. Der ELISA wurde mit einer ABTS-Substratlösung entwickelt, wie in Beispiel 2.1 beschrieben. Die OD-Werte wurden unter Verwendung eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen.

[0083] **Fig. 5:** FACS-Analyse der Bindung des Heterominkörpers M79scFvCK/CD80CH1 an 17-1A-transfizierte CHO-Zellen. 200.000 17-1A-transfizierte CHO-Zellen (vgl. Beispiel 5.2) wurden für 30 Minuten mit mehreren Verdünnungen des Heterominkörpers M79scFvCK/CD80CH1 im Bereich von 4 µg/ml bis 3,9 ng/ml inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und für 30 Minuten mit einem R-Phycoerythrin-konjugierten, murinen anti-Mensch-CD80-Antikörper (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA; Kat. Nr. 340294) inkubiert. Nach zwei letzten Waschschritten in PBS wurden die Zellen dann mittels Durchflußzytometrie (FACS-SCAN, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) analysiert.

[0084] **Fig. 6:** DNA- sowie Aminosäuresequenz eines anti-Lewis-Y-scFv-Fragments, das eine Leadersequenz an seinem N-Terminus trägt. Die Nucleotide 68 bis 394 codieren die variable Region der leichten Ig-Kette, die Nucleotide 440 bis 793 codieren die variable Domäne der schweren Ig-Kette. Die zur Clonierung wichtigen Restriktionsenzym-Spaltstellen sind angegeben.

[0085] **Fig. 7:** ELISA-Analyse von Zellkulturüberständen, erhalten von zwei unterschiedlichen CHO-Zell-Transfektanten, die mit entweder den Expressionsplasmiden pEF-DHFRanti-Lewis-Y-scFv-CK und pEF-ADA-CD80-CH1 bzw. mit pEF-DHFR-CD80-CK und pEF-ADA-anti-Lewis-Y-scFv-CH1 doppelt transfiziert wurden, nach dem ersten Genamplifikationsschritt. ELISA-Platten mit 96 Vertiefungen wurden mit 50 µl eines löslichen Lewis-Y-BSA-Konjugats (30 µg/ml) pro Vertiefung inkubiert. Anschließend wurde der rohe Zellkulturüberstand davon zugegeben, wie angegeben. Der Nachweis wurde mit einem CD80-spezifischen, monoclonalen Antikörper (Immunotech; Kat. Nr. 1449), 1 : 1000 verdünnt, und einem Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-Maus-IgG-(Fc)-Antikörper (Dianova, Hamburg), 1 : 5000 verdünnt, durchgeführt. Als negative Kontrolle wurden Vertiefungen mit phosphatgepufferter Salzlösung inkubiert. Der ELISA wurde mit einer ABTS-Substratlösung entwickelt, wie in Beispiel 2.1 beschrieben. Die OD-Werte wurden unter Verwendung eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen. LeY wird als Abkürzung von anti-Lewis-Y-scFv verwendet.

[0086] **Fig. 8:** ELISA-Analyse von Zellkulturüberständen, erhalten von zwei unterschiedlichen CHO-Zell-Transfektanten, die mit entweder den Expressionsplasmiden pEF-DHFRanti-Lewis-Y-scFv-CK und pEF-ADA-CD80-CH1 bzw. mit pEF-DHFR-CD80-CK und pEF-ADA-anti-Lewis-Y-scFv-CH1 doppelt transfiziert wurden, nach dem ersten Genamplifikationsschritt. ELISA-Platten mit 96 Vertiefungen wurden mit 50 µl eines BSA-freien anti-His-Marker-Antikörpers (25 µg/ml) pro Vertiefung inkubiert. Anschließend wurde der rohe Zellkulturüberstand zugegeben, wie angegeben. Der Nachweis wurde mit einem biotinmarkierten anti-Mensch-CK-Antikörper (Pierce; Kat. Nr. 31780), 1 : 1000 verdünnt, und Peroxidase-konjugiertem Avidin (Dako, Hamburg; Kat. Nr. P0347), 1 : 1000 verdünnt, durchgeführt. Als negative Kontrolle wurden Vertiefungen mit phosphatgepufferter Salzlösung inkubiert. Der ELISA wurde mit einer ABTS-Substratlösung entwickelt, wie in Beispiel 2.1 beschrieben. Die OD-Werte wurden unter Verwendung eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen. Ley wird als Abkürzung von anti-Lewis-Y-scFv verwendet.

[0087] **Fig. 9:** ELISA mit dem Zellkulturüberstand der beiden Ausführungsformen des Heterominikörpers CD80, CD86, CD58 und CD54 (spezifischer Nachweis). Die Bindung an das 17-1A-Antigen wurde unter Verwendung eines rekombinanten 17-1A-Antigens untersucht, das durch stabile Expression in CHO-Zellen, wie beschrieben (Mack et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 92 (1995), 7021–7025, und Beispiel 4.4), erhalten wurde. Das Antigen wurde an U-Boden-ELISA-Platten mit 96 Vertiefungen (Nunc Maxisorb) in einer Konzentration von 50 µg/ml in phosphatgepufferter Salzlösung, PBS, immobilisiert. Die Beschichtung wurde bei 4°C für 12 Stunden mit 50 µl, gefolgt durch einen Waschschriff mit PBS, 0,05% Tween, ausgeführt. Der ELISA wurde dann für 1 Stunde mit PBS/3% Rinderserumalbumin (BSA) blockiert und noch einmal gewaschen. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand unverdünnt und in mehreren Verdünnungen (roh, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16 und 1 : 32) zugegeben und für 2 Stunden inkubiert. Der spezifische Nachweis war abhängig von der An der co-stimulierenden Proteine, die mit den unterschiedlichen Heterokörper-Ausführungsformen assoziiert sind. Die spezifischen Antikörper anti-CD54, anti-CD58, anti-CD80 und anti-CD86 wurden verwendet, alle 1 : 1000 verdünnt (für Einzelheiten vgl. Tabelle 4.4.). Nach dreimaligem Waschen mit PBS, 0,05% Tween-20 wurde ein Peroxidase-konjugierter, polyclonaler Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper (Fc-spezifisch) (Dianova, Hamburg), 1 : 5000 verdünnt, zugegeben und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS, 0,05% Tween-20 wurde der ELISA schließlich durch Zugabe des ABTS-Substrats entwickelt, wie in Beispiel 4.4 beschrieben. Als negative Kontrolle wurden die Platten mit PBS anstelle der Heterominikörper-Konstrukte inkubiert. Der farbige Niederschlag wurde unter Verwendung eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen.

[0088] **Fig. 10:** ELISA mit dem Zellkulturüberstand der beiden Ausführungsformen des Heterokörpers CD80, CD86, CD58 und CD54 (anti-Mensch-C_{kappa}-Nachweis). Platten mit 96 Vertiefungen wurden mit einem anti-His-Marker-Antikörper (Dianova, Hamburg; Kat. Nr. DIA 910), 1 : 40 verdünnt, beschichtet, wie vorstehend beschrieben. Überstände aller Heterominikörper-Ausführungsformen wurden roh und in Verdünnungen von 1 : 2, 1 : 4 und 1 : 8 zugegeben. Ein biotinylierter anti-Mensch-C_{kappa}-Antikörper (Pierce; Kat. Nr. 31780), gefolgt durch Peroxidase-konjugiertes Streptavidin (1 : 1000) (Dako, Hamburg; Kat. Nr. P0347), wurden zum Nachweis der gebundenen Heterominikörper verwendet (vgl. Tabelle 4.4). Nach viermaligem Waschen mit PBS, 0,05% Tween-20 wurde der ELISA schließlich durch Zugabe des ABTS-Substrats entwickelt, wie in Beispiel 4.4 beschrieben. Als negative Kontrolle wurden die Platten mit PBS anstelle der Heterominikörper-Konstrukte inkubiert. Der farbige Niederschlag wurde unter Verwendung eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen.

[0089] **Fig. 11:** FACS-Kontrolle der CHO-Zellen nach Transfektion mit 17-1A. Die Expression von Transmembran-17-1A wurde durch eine schrittweise Genamplifikation erhöht, welche induziert wurde durch die anschließende Zugabe von ansteigenden Konzentrationen des DHFR-Inhibitors MTX bis zu einer Endkonzentration von 500 nM, wobei die Konzentrationsschritte zwischen 20 nM und 100 nM lagen. Diese Zellen wurden bei einer Konzentration von 10 µg/ml des 17-1A-spezifischen Antikörpers M79 (Göttlinger, Int. J. Cancer 38 (1986), 47–53), gefolgt durch einen FITCmarkierten, polyclonalen Ziege-anti-Maus-IgG+IgM-(H+L)-Antikörper, 1 : 100 verdünnt in PBS, mittels Durchflußcytometrie auf eine Membranexpression von 17-1A getestet. Als negative Kontrolle wurden untransfizierte CHO-Zellen verwendet, während die 17-1A-positive, menschliche Magenkrebs-Zelllinie Kato, erhalten von ATCC, als positive Kontrolle diente.

[0090] **Fig. 12:** BrdU-Einbau von CD4⁺CD45RA⁺-T-Zellen nach Stimulierung mit dem Heterominikörper M79CK/CD80CH1 und/oder M79scFv-antiCD3scFv. Nach dreitägiger Stimulierung wurden die Zellen mit BrdU für 14 Stunden inkubiert. Der Test wurde durchgeführt, wie in der Produktbeschreibung von Boehringer Mannheim, Kat. Nr. 1647229, empfohlen. Die OD-Werte wurden unter Verwendung eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen.

Abkürzungen:

ohne CHO max = ohne 17-1A-transfizierte CHO-Zellen plus 250 ng/ml des bispezifischen, einkettigen Antikörpers M79scFv-anti-CD2scFv plus 500 ng/ml des M79scFvCK/CD80CH1-Heterominikörpers.

ohne CHO Bimax = ohne 17-1A-transfizierte CHO-Zellen plus 250 ng/ml des bispezifischen, einkettigen Antikörpers M79scFv-anti-CD2scFv.

PBLsMBmaxBimax = 17-1A-transfizierte CHO-Zellen plus ungetrennte einkernige Zellen aus dem peripheren Blut plus 250 ng/ml des bispezifischen, einkettigen Antikörpers M79scFv-anti-CD3scFv plus 500 ng/ml des M79scFvCK/CD80CH1-Heterominikörpers.

PBLBimax = 17-1A-transfizierte CHO-Zellen plus ungetrennte einkernige Zellen aus dem peripheren Blut plus 250 ng/ml des bispezifischen, einkettigen Antikörpers M79scFv-anti-CD2scFv.

PBL neg = negative Kontrolle, bestehend aus 17-1A-transfizierten CHO-Zellen plus ungetrennte einkernige Zellen aus dem peripheren Blut.

[0091] **Fig. 13:** Prozentsatz der CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻-T-Zellen nach dreitägiger Stimulierung von CD4⁺CD45RA⁺-T-Zellen mit dem Heterominikörper M79CK/CD80CH1 und/oder M79scFv-antiCD3, analysiert mittels FACS. Die CD45RA- und CD45RO-Expressionsraten wurden nach dreitägiger Stimulierung von CD4⁺CD45RA⁺-T-Zellen mit 500 ng/ml des Heterominikörpers M79CK/CD80CH1 und/oder 250, 50, 10 oder 2 ng/ml M79scFv-antiCD3scFv mittels Durchflußcytometrie analysiert. **Fig. 5.4.1** zeigt den Prozentsatz der CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁺-T-Zellen aller durchgelassenen ("gated") Zellen. 100.000 Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und für 30 Minuten mit einem R-Phycoerythrin-konjugierten anti-Mensch-CD45RA-Antikörper (2H4, Coulter), 1 : 50 verdünnt, und mit einem FITCkonjugierten anti-Mensch-CD45RO-Antikörper (UHCL-1; Dako, Hamburg), 1 : 50 verdünnt, inkubiert und noch einmal mit PBS gewaschen. Als positive Kontrolle wurden PBMCs mit 500 ng/ml des Heterominikörpers M79CK/CD80CH1 und/oder 250 ng/ml M79scFv-antiCD3scFv stimuliert. Für negative Kontrollen wurden unstimulierte PBMCs und gereinigte CD4⁺CD45RO⁺-T-Zellen mit 500 ng/ml des Heterominikörpers M79CK/CD80CH1 und/oder 250 ng/ml M79scFv-antiCD3scFv ohne 17-1A-transfizierte CHO-Zellen stimuliert. Für Abkürzungen vgl. die Legende von **Fig. 12**.

[0092] **Fig. 14:** Prozentsatz der CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁺-T-Zellen nach sechstägiger Stimulierung von CD4⁺CD45RA⁺-T-Zellen mit dem Heterominikörper M79CK/CD80CH1 und/oder M79scFv-antiCD3scFv, analysiert mittels FACS. Die CD45RA- und CD45RO-Expressionsraten wurden nach sechstägiger Stimulierung von CD4⁺CD45RA⁺-T-Zellen mit 500 ng/ml des Heterominikörpers M79CK/CD80CH1 und/oder 250, 50, 10 oder 2 ng/ml M79scFv-antiCD3scFv mittels Durchflußcytometrie analysiert. **Fig. 5.4.1** zeigt den Prozentsatz der CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁺-T-Zellen aller durchgelassenen Zellen. 100.000 Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und für 30 Minuten mit einem R-Phycoerythrin-konjugierten anti-Mensch-CD45RA-Antikörper (2H4, Coulter), 1 : 50 verdünnt, und mit einem FITCkonjugierten anti-Mensch-CD45RO-Antikörper (UHCL-1; Dako, Hamburg), 1 : 50 verdünnt, inkubiert und noch einmal mit PBS gewaschen. Als positive Kontrolle wurden PBMCs mit 500 ng/ml des Heterominikörpers M79CK/CD80CH1 und/oder 250 ng/ml M79scFv-antiCD3scFv stimuliert. Für negative Kontrollen wurden unstimulierte PBMCs und gereinigte CD4⁺CD45RO⁺-T-Zellen mit 500 ng/ml des Heterominikörpers M79CK/CD80CH1 und/oder 250 ng/ml M79scFv-antiCD3-scFv, ohne 17-1A-transfizierte CHO-Zellen, stimuliert. Für Abkürzungen vgl. die Legende von **Fig. 12**.

[0093] **Fig. 15:** γ -IFN-ELISA-Analyse von CD4⁺CD45RA⁺-T-Zellen nach dreitägiger Stimulierung mit dem Heterominikörper M79CK/CD80CH1 und/oder M79scFv-antiCD3scFv. Der Zellkulturüberstand wurde vor der ELISA-Analyse 1 : 5 verdünnt; der γ -Standard (bereitgestellt mit dem Testkit) wurde als positive Kontrolle verwendet. Als negative Kontrolle wurden Vertiefungen mit Zellkulturmedium inkubiert. Der ELISA wurde gemäß den Empfehlungen des Benutzerhandbuchs des Herstellers (Genzyme DuoSet, Genzyme Diagnostics Cambridge, MA, USA; Kat. Nr. 80-3932-00) durchgeführt und mit einer ABTS-Substratlösung entwickelt, wie in Beispiel 2.1 beschrieben. Die OD-Werte wurden unter Verwendung eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen. Für Abkürzungen vgl. die Legende von **Fig. 12**.

[0094] **Fig. 16:** γ -IFN-ELISA-Analyse von CD4⁺CD45RA⁺-T-Zellen nach sechstägiger Stimulierung mit dem Heterominikörper M79CK/CD80CH1 und/oder M79scFv-antiCD3-scFv. Der Zellkulturüberstand wurde vor der ELISA-Analyse 1 : 5 verdünnt; der γ -IFN-Standard (bereitgestellt mit dem Testkit) wurde als positive Kontrolle verwendet. Als negative Kontrolle wurden Vertiefungen mit Zellkulturmedium inkubiert. Der ELISA wurde gemäß dem Benutzerhandbuch des Herstellers (Genzyme DuoSet, Genzyme Diagnostics Cambridge, MA, USA; Kat. Nr. 80-3932-00) durchgeführt und mit einer ABTS-Substratlösung entwickelt, wie in Beispiel 2.1 beschrieben. Die OD-Werte wurden unter Verwendung eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen. Für Abkürzungen vgl. die Legende von **Fig. 12**.

[0095] **Fig. 17:** IL-5-ELISA-Analyse von CD4⁺CD45RA⁺-T-Zellen nach dreitägiger Stimulierung mit dem Heterominikörper M79CK/CD80CH1 und/oder M79scFv-antiCD3scFv. Der Zellkulturüberstand wurde unverdünnt analysiert; der IL-5-Standard (bereitgestellt mit dem Testkit) wurde als positive Kontrolle verwendet. Als negative Kontrolle wurden Vertiefungen mit Zellkulturmedium inkubiert. Der ELISA wurde gemäß dem Benutzerhandbuch des Herstellers (Genzyme DuoSet, Genzyme Diagnostics Cambridge, MA, USA; Kat. Nr. 80-5025-00) durchgeführt und mit einer ABTS-Substratlösung entwickelt, wie in Beispiel 2.1 beschrieben. Die OD-Werte wurden unter Verwendung eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen. Für Abkürzungen vgl. die Legende von **Fig. 12**.

[0096] **Fig. 18:** IL-5-ELISA-Analyse von CD4⁺CD45RA⁺-T-Zellen nach sechstägiger Stimulierung mit dem Heterominikörper M79CK/CD80CH1 und/oder M79scFv-antiCD3scFv. Der Zellkulturüberstand wurde unver-

dünnt analysiert; der IL-S-Standard (bereitgestellt mit dem Testkit) wurde als positive Kontrolle verwendet. Als negative Kontrolle wurden Vertiefungen mit Zellkulturmedium inkubiert. Der ELISA wurde gemäß dem Benutzerhandbuch des Herstellers (Genzyme DuoSet, Genzyme Diagnostics Cambridge, MA, USA; Kat. Nr. 80-5025-00) durchgeführt und mit einer ABTS-Substratlösung entwickelt, wie in Beispiel 2.1 beschrieben. Die OD-Werte wurden unter Verwendung eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen. Für Abkürzungen vgl. die Legende von **Fig. 12**.

[0097] **Fig. 19:** BrdU-Einbau von CD8⁺CD45RA⁺-Zellen nach dreitägiger Stimulierung mit dem Heterominkörper M79CK/CD80CH1 und/oder M79scFv-antiCD3scFv. Nach dreitägiger Stimulierung wurden die Zellen mit BrdU für 14 Stunden inkubiert. Der Test wurde durchgeführt, wie in der Produktbeschreibung von Boehringer Mannheim, Kat. Nr. 1647229, empfohlen. Die OD-Werte wurden unter Verwendung eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen. Für Abkürzungen vgl. die Legende von **Fig. 12**.

[0098] **Fig. 20:** Prozentsatz der CD8⁺CD45RA⁺-T-Zellen nach viertägiger Stimulierung von CD8⁺CD45RA⁺-T-Zellen mit dem Heterominkörper M79CK/CD80CH1 und/oder M79scFv-antiCD3scFv, analysiert mittels FACS. Die CD45RA- und CD45RO-Expressionsraten wurden nach viertägiger Stimulierung von CD8⁺CD45RA⁺-T-Zellen mit 500 ng/ml des Heterominkörpers M79CK/CD80CH1 und/oder 250, 50, 10 oder 2 ng/ml M79scFv-antiCD3scFv mittels Durchflußcytometrie analysiert. **Fig. 5.4.1** zeigt den Prozentsatz der CD8⁺CD45RA⁺CD45RO⁺-T-Zellen aller durchgelassenen Zellen. 100.000 Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und für 30 Minuten mit einem R-Phycoerythrin-konjugierten anti-Mensch-CD45RA-Antikörper (2H4, Coulter), 1 : 50 verdünnt, und mit einem FITC-konjugierten anti-Mensch-CD45RO-Antikörper (UHCL-1; Dako, Hamburg), 1 : 50 verdünnt, inkubiert und noch einmal mit PBS gewaschen. Als positive Kontrolle wurden PBMCs mit 500 ng/ml des Heterominkörpers M79CK/CD80CH1 und/oder 250 ng/ml M79scFv-antiCD3scFv stimuliert. Für negative Kontrollen wurden unstimulierte PBMCs und gereinigte CD8⁺CD45RO⁺-T-Zellen mit 500 ng/ml des Heterominkörpers M79CK/CD80CH1 und/oder 250 ng/ml M79scFv-antiCD3-scFv ohne 17-1A-transfizierte CHO-Zellen stimuliert. Für Abkürzungen vgl. die Legende von **Fig. 12**.

[0099] **Fig. 21:** Prozentsatz der CD8⁺CD45RA⁺CD45RO⁺-T-Zellen nach sechstägiger Stimulierung von CD8⁺CD45RA⁺-T-Zellen mit dem Heterominkörper M79CK/CD80CH1 und/oder M79scFv-antiCD3scFv, analysiert mittels FACS. Die CD45RA- und CD45RO-Expressionsraten wurden nach sechstägiger Stimulierung von CD8⁺CD45RA⁺-T-Zellen mit 500 ng/ml des Heterominkörpers M79CK/CD80CH1 und/oder 250, 50, 10 oder 2 ng/ml M79scFv-antiCD3scFv mittels Durchflußcytometrie analysiert. **Fig. 5.4.1** zeigt den Prozentsatz der CD8⁺CD45RA⁺CD45RO⁺-T-Zellen aller durchgelassenen Zellen. 100.000 Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und für 30 Minuten mit einem R-Phycoerythrin-konjugierten anti-Mensch-CD45RA-Antikörper (2H4, Coulter), 1 : 50 verdünnt, und mit einem FITC-konjugierten anti-Mensch-CD45RO-Antikörper (UHCL-1; Dako, Hamburg), 1 : 50 verdünnt, inkubiert und noch einmal mit PBS gewaschen. Als positive Kontrolle wurden PBMCs mit 500 ng/ml des Heterominkörpers M79CK/CD80CH1 und/oder 250 ng/ml M79scFv-antiCD3scFv stimuliert. Für negative Kontrollen wurden unstimulierte PBMCs und gereinigte CD8⁺CD45RO⁺-T-Zellen mit 500 ng/ml des Heterominkörpers M79CK/CD80CH1 und/oder 250 ng/ml M79scFv-antiCD3-scFv ohne 17-1A-transfizierte CHO-Zellen stimuliert. Für Abkürzungen vgl. die Legende von **Fig. 12**.

[0100] **Fig. 22:** TNF- α -ELISA-Analyse von CD8⁺CD45RA⁺-T-Zellen nach viertägiger Stimulierung mit dem Heterominkörper M79CK/CD80CH1 und/oder M79scFv-antiCD3-scFv. Der Zellkulturüberstand wurde unverdünnt analysiert; der TNF- α -Standard (bereitgestellt mit dem Testkit) wurde als positive Kontrolle verwendet. Als negative Kontrolle wurden Vertiefungen mit Zellkulturmedium inkubiert. Der ELISA wurde gemäß dem Benutzerhandbuch des Herstellers (Genzyme DuoSet, Genzyme Diagnostics Cambridge, MA, USA; Kat. Nr. 80-3933-00) durchgeführt und mit einer ABTS-Substratlösung entwickelt, wie in Beispiel 2.1 beschrieben. Die OD-Werte wurden unter Verwendung eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen. Für Abkürzungen vgl. die Legende von **Fig. 12**.

[0101] **Fig. 23:** Molekulare Anordnung des Heterominkörpers M79scFv-CK-antiCD3-scFv/CD80CH1, dargestellt auf der Proteinebene. CH1 und CK geben die erste konstante Domäne der schweren Kette des menschlichen IgG1 bzw. die konstante Region der leichten Kappa-Kette des menschlichen Ig an, die zusammen, kovalent verknüpft miteinander über eine Disulfidbrücke (S-S), die Heterodimerisierungseinheit bilden. VH gibt die variable Region der schweren Ig-Kette an, und VL gibt die variable Region der leichten Ig-Kette an.

[0102] **Fig. 24:** Anordnung verschiedener bifunktionaler CD80-scFv-Konstrukte, wobei die Konstruktionselemente auf der Proteinebene dargestellt sind. VH gibt die variable Region der schweren Ig-Kette und VL die der leichten Ig-Kette an.

[0103] **Fig. 25:** Anordnung verschiedener bifunktionaler CD80-scFv-Konstrukte, wobei die Konstruktionselemente auf der DNA-Ebene dargestellt sind, sowie der verwendeten Restriktionsenzym-Spaltstellen.

[0104] **Fig. 26:** ELISA-Analyse des Zellkulturüberstands, erhalten aus CHO-Zellen, die mit dem Expressionsplasmid pEF-DHFR+CTI+CD80-M79scFv-(VL/VH), einschließlich der codierenden Sequenz des kurzen (Gly₄Ser₁)₁-Linkers, transfiziert wurden. ELISA-Platten mit 96 Vertiefungen wurden mit 50 μ l eines löslichen 17-1A-Antigens (50 μ g/ml) pro Vertiefung inkubiert. Anschließend wurden der rohe Zellkulturüberstand und Verdünnungen davon zugegeben, wie angegeben. Der Nachweis wurde durch einen murinen anti-His-Marker-

IgG1-Antikörper (Dianova, Hamburg), 1 : 1000 verdünnt, und einen Peroxidase-konjugierten, polyclonalen Ziege-anti-Maus-IgG-(Fc)-Antikörper (Dianova, Hamburg), 1 : 5000 verdünnt, durchgeführt. Der bispezifische, einkettige anti-17-1A/anti-CD3-Antikörper (Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021–7025) wurde als positive Kontrolle verwendet. Als negative Kontrolle wurden Vertiefungen mit phosphatgepufferter Salzlösung inkubiert. Der ELISA wurde mit einer ABTS-Substratlösung entwickelt, wie in Beispiel 2.1 beschrieben. Die OD-Werte wurden unter Verwendung eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen.

[0105] **Fig. 27:** ELISA-Analyse des Zellkulturüberstands, erhalten aus CHO-Zellen, die mit dem Expressionsplasmid pEF-DHFR+CTI+CD80-M79scFv-(VL/VH), einschließlich der codierenden Sequenz des kurzen (Gly₄Ser₁)₁-Linkers, transfiziert wurden. ELISA-Platten mit 96 Vertiefungen wurden mit 50 µl eines löslichen 17-1A-Antigens (50 µg/ml) pro Vertiefung inkubiert. Anschließend wurden der rohe Zellkulturüberstand und Verdünnungen davon zugegeben, wie angegeben. Der Nachweis wurde mit einem murinen IgG1-anti-CD80-Antikörper, 1 : 1000 verdünnt, gefolgt durch einen Peroxidase-konjugierten, polyclonalen Ziege-anti-Maus-IgG-(Fc)-Antikörper (Dianova, Hamburg), 1 : 5000 verdünnt, durchgeführt. Der bispezifische, einkettige anti-17-1A/anti-CD3-Antikörper (Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021–7025) wurde als positive Kontrolle verwendet und nachgewiesen, wie in **Fig. 26** beschrieben. Als negative Kontrolle wurden Vertiefungen mit phosphatgepufferter Salzlösung inkubiert. Der ELISA wurde mit einer ABTS-Substratlösung entwickelt, wie in Beispiel 2.1 beschrieben. Die OD-Werte wurden unter Verwendung eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen.

[0106] **Fig. 28:** ELISA-Analyse des gereinigten rekombinanten CD80-M79scFv-(VL/VH)-Konstrukts mit einem kurzen (Gly₄Ser₁)₁-Linker, erhalten durch Reinigung aus dem Zellkulturüberstand unter Verwendung einer Ni-NTA-Säule, wie beschrieben (Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021-7025). ELISA-Platten mit 96 Vertiefungen wurden über Nacht bei 4°C mit dem rohen Eluat aus der Ni-NTA-Säule und mit Verdünnungen davon beschichtet, wie angegeben. Anschließend wurde das gebundene rekombinante Protein durch einen murinen anti-CD80- IgG1-Antikörper, 1 : 1000 verdünnt, bzw. durch einen murinen anti-His-Marker- IgG1-Antikörper (Dianova, Hamburg), 1 : 1000 verdünnt, gefolgt durch einen Peroxidasekonjugierten, polyclonalen Ziege-anti-Maus-IgG-(Fc)-Antikörper (Dianova, Hamburg), 1 : 5000 verdünnt, nachgewiesen. Als negative Kontrolle wurden Vertiefungen über Nacht bei 4°C mit 3% BSA in phosphatgepufferter Salzlösung beschichtet. Der ELISA wurde mit einer ABTS-Substratlösung entwickelt, wie in Beispiel 2.1 beschrieben. Die OD-Werte wurden unter Verwendung eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen.

[0107] **Fig. 29:** ELISA-Analyse des Zellkulturüberstands, erhalten aus CHO-Zellen, die mit dem Expressionsplasmid pEF-DHFR+CTI+CD80-M79scFv-(VH/VL), einschließlich der codierenden Sequenz des kurzen (Gly₄Ser₁)₁-Linkers, transfiziert wurden. ELISA-Platten mit 96 Vertiefungen wurden mit einem löslichen 17-1A-Antigen (50 µg/ml) pro Vertiefung inkubiert. Anschließend wurden der rohe Zellkulturüberstand und Verdünnungen davon zugegeben, wie angegeben. Der Nachweis wurde durch einen murinen anti-CD80-IgG1-Antikörper, 1 : 1000 verdünnt, gefolgt durch einen Peroxidase-konjugierten, polyclonalen Ziege-anti-Maus-IgG-(Fc)-Antikörper (Dianova, Hamburg), 1 : 5000 verdünnt, durchgeführt. Der bispezifische, einkettige anti-17-1A/anti-CD3-Antikörper (Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021–7025) wurde als positive Kontrolle verwendet und nachgewiesen, wie in **Fig. 26** beschrieben. Als negative Kontrolle wurden Vertiefungen mit phosphatgepufferter Salzlösung inkubiert. Der ELISA wurde mit einer ABTS-Substratlösung weiterbearbeitet, wie in Beispiel 2.1 beschrieben. Die OD-Werte wurden unter Verwendung eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen.

[0108] **Fig. 30:** DNA-Sequenz des als ACCGS15BAM bezeichneten doppelsträngigen Oligonucleotids mit einzelsträngigen überhängenden Enden, die mit denen der Restriktionsenzyme BspEI und BamHI kompatibel sind. Die durch die Nucleotidsequenz codierten Aminosäuren sind dargestellt.

[0109] **Fig. 31:** ELISA-Analyse des Zellkulturüberstands und von Verdünnungen davon, erhalten aus CHO-Zellen, die mit dem Expressionsplasmid pEF-DHFR+CTI+CD80-M79scFv-(VH/VL), einschließlich der codierenden Sequenz des langen (Gly₄Ser₁)₃-Linkers, transfiziert wurden. ELISA-Platten mit 96 Vertiefungen wurden mit 50 µl eines löslichen 17-1A-Antigens (50 µg/ml) pro Vertiefung inkubiert. Anschließend wurden der rohe Zellkulturüberstand und Verdünnungen davon zugegeben, wie angegeben. Das gebundene Protein wurde durch einen murinen anti-His-Marker-Antikörper (Dianova, Hamburg), 1 : 1000 verdünnt, gefolgt durch einen Peroxidase-konjugierten, polyclonalen Ziege-anti-Maus-IgG-(Fc)-Antikörper (Dianova, Hamburg), 1 : 5000 verdünnt, nachgewiesen. Der bispezifische, einkettige anti-17-1A/anti-CD3-Antikörper (Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021–7025) wurde als positive Kontrolle verwendet. Als negative Kontrolle wurden Vertiefungen mit phosphatgepufferter Salzlösung inkubiert. Der ELISA wurde mit einer ABTS-Substratlösung entwickelt, wie in Beispiel 2.1 beschrieben. Die OD-Werte wurden unter Verwendung eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen.

[0110] **Fig. 32:** Molekulare Anordnung von DNA-Fragmenten, welche die einzelnen Polypeptidketten des Heterominkörpers M79scFv-CK-anti-CD3scFv/CD80CH1 codieren. Die Symbole werden wie in den **Fig. 1(A)** und **1(B)** verwendet. Der zur Clonierung und Expression der einzelnen Ketten verwendete Expressionsvektor pEF-DHFR oder pEF-ADA ist angegeben. Gly₄Ser₁ gibt einen S-Aminosäure-Glycin-Serin-Linker an.

[0111] **Fig. 33:** Phänotypwechsel von CD45RA⁺/RO⁻-CD4-T-Zellen zu RA⁻/RO⁺-CD4-T-Zellen, induziert durch in vitro-Priming. Die CD45RA- und CD45RO-Expression auf PBMCs und gereinigten naiven CD4⁺CD45RO⁻-T-Zellen wurde mittels FACS am Tag 0 analysiert. Die CD45RA- und CD45RO-Expressionsraten von CD4⁺CD45RO⁻-Zellen wurden weiterhin nach sechstägiger Stimulierung mit 500 ng/ml des Heterominikörpers M79scFvCK/CD80CH1 und/oder 250 ng/ml des bispezifischen, einkettigen Antikörpers M79scFv-antiCD3scFv in Kontakt mit bestrahlten, 17-1Atransfizierten Zellen mittels Durchflußcytometrie analysiert. Jeweils 100.000 T-Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und für 30 Minuten mit einem Phycoerythrin-konjugierten anti-Mensch-CD45RA-Antikörper (2H4, Coulter), 1 : 50 verdünnt, und mit einem FITC-konjugierten anti-Mensch-CD45RO-Antikörper (UCHL-1; Dako, Hamburg), 1 : 50 verdünnt, inkuziert und vor der Durchflußcytometrie noch einmal mit PBS gewaschen.

[0112] **Fig. 34:** Phänotypwechsel von CD45RA⁺/RO⁻-CD8-T-Zellen zu RA⁻/RO⁺-CD8-T-Zellen. Die CD45RA- und CD45RO-Expression auf PBMCs und gereinigten naiven CD8⁺CD45RO⁻-T-Zellen wurde mittels FACS am Tag 0 analysiert. Die CD45RA- und CD45RO-Expressionsraten von CD8⁺CD45RO⁻-Zellen wurden weiterhin nach sechstägiger Stimulierung mit 500 ng/ml des Heterominikörpers M79scFv-CK/CD80CH1 und/oder 250 ng/ml des bispezifischen, einkettigen Antikörpers M79scFv-antiCD3scFv in Kontakt mit bestrahlten, 17-1A-transfizierten Zellen mittels Durchflußcytometrie analysiert. Jeweils 100.000 T-Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und für 30 Minuten mit einem Phycoerythrin-konjugierten anti-Mensch-CD45RA-Antikörper (2H4, Coulter), 1 : 50 verdünnt, und mit einem FITCkonjugierten anti-Mensch-CD45RO-Antikörper (UCHL-1; Dako, Hamburg), 1 : 50 verdünnt, inkuziert und vor der Durchflußcytometrie noch einmal mit PBS gewaschen.

[0113] **Fig. 35:** ⁵¹Cr-Freisetzungstest mit naiven CD8⁺CD45RA⁺CD45RO⁻-T-Zellen (vor dem Primem) und davon abgeleiteten T-Zellen durch in vitro-Priming mit dem Heterominikörper M79scFvCK/CD80CH1 und dem bispezifischen, einkettigen Antikörper M79scFv-antiCD3scFv (nach dem Primem). Die T-Zellen wurden durch unterschiedliche Konzentrationen des bispezifischen, einkettigen Antikörpers M79scFvantiCD3scFv wieder gegen 17-1A-positive Kato-Zellen gerichtet, wie angegeben. Gegebenenfalls war der Heterominikörper M79scFvCK/CD80CH1 während des ⁵¹Cr-Freisetzungstests in einer Konzentration von 500 ng/ml vorhanden. PBMCs wurden als positive Kontrolle verwendet. Die Inkubationszeit betrug 20 h bei einem E : T-Verhältnis von 20 : 1.

[0114] **Fig. 36:** SDS-PAGE (7,5%) von Heterominikörper M79scFvCK/CD80CH1. Die Coomassie-Färbung des gereinigten Heterominikörpers M79scFvCK/CD80CH1 ist unter reduzierenden (linke Bahn) und nicht-reduzierenden (rechte Bahn) Bedingungen gezeigt. In beiden Bahnen ist ein Molekulargewichtsstandard dargestellt.

[0115] **Fig. 37:** Bindung von Heterominikörper M79scFvCK/CD80CH1 an untransfizierte und 17-1A-transfizierte CHO-Zellen. 200.000 Zellen jeder Zelllinie wurden für 30 Minuten mit dem gereinigten Heterominikörper M79scFvCK/CD80CH1 in einer Konzentration von 0,2 µg/ml inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und für 30 Minuten mit einem FITC-konjugierten, C_{kappa}-spezifischen anti-Mensch-Antikörper (Coulter 6604287), 1 : 10 verdünnt, inkubiert. Nach zwei letzten Waschschritten in PBS wurden die Zellen dann mittels Durchflußcytometrie (FACS-SCAN, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) analysiert.

[0116] **Fig. 38:** Bindung von Heterominikörper M79scFvCK/CD80CH1 an CD28 auf T-Zellen. 100.000 gereinigte naive CD8⁺CD11b⁻-T-Zellen wurden für 30 Minuten mit 200 µg/ml des Heterominikörpers M79scFvCK/CD80CH1 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und für 30 Minuten mit einem FITCkonjugierten, C_{kappa}-spezifischen anti-Mensch-Antikörper (Coulter 6604287), 1 : 10 verdünnt, inkubiert. Nach zwei letzten Waschschritten in PBS wurden die Zellen mittels Durchflußcytometrie analysiert.

[0117] **Fig. 39:** Bindung von Heterominikörper M79scFvCK/CD80CH1 an CTLA-4, gemessen durch einen ELISA. ELISA-Platten mit 96 Vertiefungen wurden mit 50 µl/Vertiefung einer löslichen CTLA-4/Fc-Chimäre (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA, Kat. Nr. 325-CT) in einer Konzentration von 10 µg/ml inkubiert. Anschließend wurden unterschiedliche Konzentrationen des gereinigten Heterominikörpers M79scFvCK/CD80CH1 in phosphatgepufferter Salzlösung, PBS, zugegeben. Der Nachweis wurde mit einem biotinmarkierten, C_{kappa}-spezifischen anti-Mensch-Antikörper (Pierce; Kat. Nr. 31780), 1 : 1000 verdünnt, gefolgt durch Peroxidase-konjugiertes Avidin (Dako, Hamburg; Kat. Nr. P0347), 1 : 1000 verdünnt, durchgeführt. Als negative Kontrolle wurden einige Vertiefungen mit einem CD4-Ig-Fusionsprotein inkubiert. Der ELISA wurde mit einer ABTS-Substratlösung entwickelt, wie in Beispiel 2.1 beschrieben. Die OD-Werte wurden mittels eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen.

[0118] **Fig. 40:** Bindung von Heterominikörper M79scFvCK-antiCD3scFv/CD80CH1 an ein immobilisiertes rekombinantes 17-1A-Antigen. ELISA-Platten mit 96 Vertiefungen wurden mit 50 µl eines löslichen 17-1A-Antigens (50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurde der rohe Zellkulturüberstand von CHO-Zellen zugegeben, die mit dem Heterominikörper M79scFvCK-antiCD3scFv/CD80CH1 transfiziert wurden, was einer primären Selektion (PS) oder dem ersten Genamplifikationsschritt (1. Amp.) entspricht. Der Nachweis des gebundenen Hete-

rominikörpers wurde mit einem CD80-spezifischen, monoclonalen Antikörper (Immunotech; Kat. Nr. 1449), 1 : 1000 verdünnt, und einem Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-Maus-IgG-(Fc)-Antikörper (Dianova, Hamburg), 1 : 5000 verdünnt, durchgeführt. Als negative Kontrolle wurden Vertiefungen mit phosphatgepufferter Salzlösung inkubiert. Der ELISA wurde mit einer ABTS-Substratlösung entwickelt, wie in Beispiel 2.1 beschrieben. Die OD-Werte wurden mittels eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen.

[0119] **Fig. 41:** ELISA-Analyse von Zellkulturüberständen aus CHO-Zellen, die mit den Expressionsplasmiden pEF-DHFR-M79scFvCK-antiCD3scFv und pEF-ADA-CD80CH1 transfiziert wurden, was einer primären Selektion (PS) und den verschiedenen Genamplifikationsschritten (1.–3. Amp.), wie angegeben, entspricht. ELISA-Platten mit 96 Vertiefungen wurden mit 50 µl/Vertiefung eines löslichen 17-1A-Antigens (50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden rohe Überstände zugegeben, die den Heterominikörper M79scFvCK-antiCD3scFv/CD80CH1 enthielten. Der Nachweis wurde mit einem Peroxidase-markierten anti-Histidin-Marker-Antikörper (Roche, 1965085), 1 : 500 verdünnt, durchgeführt. Als negative Kontrolle wurden Vertiefungen mit PBS inkubiert. Der ELISA wurde mit einer ABTS-Substratlösung entwickelt, wie in Beispiel 2.1 beschrieben. Die OD-Werte wurden mittels eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen.

[0120] **Fig. 42:** Bindung von Heterominikörper M79seFvCK-antiCD3scFv/CD80CH1 an CD3 auf menschlichen T-Zellen. 100.000 CD8⁺CD3⁺CD11b⁺-T-Zellen wurden für 30 Minuten mit 400 µg/ml (dicke, schwarze Linie) und 50 µg/ml (dünne, graue Linie) des Heterominikörpers M79scFvCK-antiCD3scFv/CD80CH1 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und für 30 Minuten mit einem FITCkonjugierten, C_{kappa} spezifischen anti-Mensch-Antikörper (Coulter 6604287), 1 : 10 verdünnt, inkubiert. Als negative Kontrolle wurden Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (gestrichelte Linie) anstelle des Heterominikörpers inkubiert. Nach zwei letzten Waschschritten in PBS wurden die Zellen dann mittels Durchflußcytometrie analysiert.

[0121] **Fig. 43:** Molekulare Anordnung des Heterominikörpers bseAbM79scFv-antiCD3scFv-CK/CD80CH1, dargestellt auf der Proteinebene. CH1 und CK geben die erste konstante Domäne der schweren Kette des menschlichen Igel bzw. die konstante Region der leichten Kappa-Kette des menschlichen Ig an, die zusammen, kovalent verknüpft miteinander über eine Disulfidbrücke (S–S), die Heterodimerisierungseinheit bilden. VH gibt die variable Region der schweren Ig-Kette an, und VL gibt die variable Region der leichten Ig-Kette an.

[0122] **Fig. 44:** Anordnung der beiden Arme des Heterominikörpers bscAbM79scFv-anti-CD3seFv-CK/CD80CH1, dargestellt auf der DNA-Ebene. Die Restriktionsenzym-Spaltstellen sind angegeben. VH gibt die variable Region der schweren Ig-Kette an, und VL gibt die der leichten Ig-Kette an.

[0123] **Fig. 45:** Bindung von Heterominikörper bscAbM79scFv-antiCD3scFv-CK/CD80CH1 an ein immobilisiertes rekombinantes 17-1A-Antigen, gemessen durch einen ELISA. ELISA-Platten mit 96 Vertiefungen wurden mit 50 µl/Vertiefung eines löslichen 17-1A-Antigens (50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden rohe Zellkulturüberstände von CHO-Zellen zugegeben, die mit dem Heterominikörper bscAbM79scFvantiCD3scFv-CK/CD80CH1 transfiziert wurden, was einer primären Selektion (PS) oder dem ersten Genamplifikationsschritt (1. Amp.) entspricht. Der Nachweis des gebundenen Heterominikörpers wurde mit einem Peroxidase-markierten anti-Histidin-Marker-Antikörper (Roche, 1965085), 1 : 500 verdünnt, durchgeführt. Als negative Kontrolle wurden Vertiefungen mit phosphatgepufferter Salzlösung anstelle des Heterominikörpers inkubiert. Der ELISA wurde mit einer ABTS-Substratlösung entwickelt, wie in Beispiel 2.1 beschrieben. Die OD-Werte wurden mittels eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen.

[0124] **Fig. 46:** ELISA-Analyse von Heterominikörper bscAbM79scFv-antiCD3scFv-CK/CD80-CH1, ausgeführt mit einem immobilisierten anti-CD80-Antikörper. ELISA-Platten mit 96 Vertiefungen wurden mit 50 µl/Vertiefung eines monoclonalen anti-Mensch-CD80-Antikörpers (Immunotech; Kat. Nr. 1449), 1 : 200 verdünnt, inkubiert. Anschließend wurden rohe Zellkulturüberstände von CHO-Zellen zugegeben, die mit dem Heterominikörper bscAbM79scFv-antiCD3scFv-CK/CD80CH1 transfiziert wurden, was einer primären Selektion (PS) oder dem ersten Genamplifikationsschritt (1. Amp.) entspricht. Der Nachweis wurde mit einem Peroxidase-markierten anti-Histidin-Marker-Antikörper (Roche, 1965085), 1 : 500 verdünnt, durchgeführt. Als negative Kontrolle wurden Vertiefungen mit phosphatgepufferter Salzlösung anstelle des Heterominikörpers inkubiert. Der ELISA wurde mit einer ABTS-Substratlösung entwickelt, wie in Beispiel 2.1 beschrieben. Die OD-Werte wurden mittels eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen.

[0125] **Fig. 47:** DNA- und Aminosäuresequenz des M79scFv-IL2-Konstrukts, das eine Dimerisierungsdomäne enthält. Die Nucleotide 10 bis 66 codieren ein N-terminales Leaderpeptid. Die Nucleotide 67 bis 387 codieren die variable Region VL der leichten Ig-Kette von M79scFv; die Nucleotide 388 bis 432 codieren einen Glycin-Serin-Linker, gefolgt durch die variable Domäne VH der schweren Ig-Kette von M79scFv (Nucleotide 433 bis 777). Am 5'-Ende der oberen Hinge-Region des murinen IgG3, beschrieben durch Pack, Biotechnology 11 (1993), 1271 (Nucleotide 784 bis 813), wurden durch die Insertion einer EcoRI-Spaltstelle 6 Nucleotide angehängt. Die Nucleotide 814 bis 918 codieren die dHLX-Dimerisierungsdomäne, beschrieben durch Pack, Biotechnology 11 (1993), 1271, gefolgt durch einen kurzen Peptidlinker von Nucleotid 919 bis 936. An die IL-2-Domäne (Nucleotide 937 bis 1341) schließen sich ein C-terminaler His-Marker (Nucleotide 1342 bis 1359) und zwei Stoppcodons an. Die zur Clonierung verwendeten Restriktionsenzym-Spaltstellen sind angegeben.

[0126] **Fig. 48:** DNA- und Aminosäuresequenz des M79scFv-IL2-Konstrukts, das eine Tetramerisierungsdo-

mäne enthält. Die Nucleotide 10 bis 66 codieren ein N-terminales Leaderpeptid. Die Nucleotide 67 bis 387 codieren die variable Region VL der leichten Ig-Kette von M79scFv; die Nucleotide 388 bis 432 codieren einen Glycin-Serin-Linker, gefolgt durch die variable Domäne VH der schweren Ig-Kette von M79scFv (Nucleotide 433 bis 777). Am 5'-Ende der oberen Hinge-Region des menschlichen IgG3, beschrieben durch Rheinacker et al., J. Immunol. 157 (1996), 2989–2997 (Nucleotide 784 bis 816), wurden durch die Insertion einer EcoRI-Spaltstelle 6 Nucleotide angehängt. Die Nucleotide 817 bis 933 codieren die menschliche p53-Tetramerisierungsdomäne (Rheinacker et al., J. Immunol. 157 (1996), 2989–2997), gefolgt durch einen kurzen Peptidlinker von Nucleotid 934 bis 954. An die IL-2-Domäne (Nucleotide 955 bis 1359) schließen sich ein C-terminaler His-Marker (Nucleotide 1360 bis 1377) und zwei Stoppcodons an. Die zur Clonierung verwendeten Restriktionsenzym-Spaltstellen sind angegeben.

[0127] **Fig. 49:** DNA- und Aminosäuresequenz des DC8scFv/erbB2_{EC}-Konstrukts, das eine Tetramerisierungsdomäne enthält. Die Nucleotide 10 bis 66 codieren ein N-terminales Leaderpeptid. Die Nucleotide 67 bis 390 codieren die variable Region VL der leichten Ig-Kette von DC8scFv; die Nucleotide 391 bis 435 codieren einen Glycin-Serin-Linker, gefolgt durch die variable Domäne VH der schweren Ig-Kette von DC8scFv (Nucleotide 436 bis 771). Am 5'-Ende der oberen Hinge-Region des menschlichen IgG3, beschrieben durch Rheinacker et al., J. Immunol. 157 (1996), 2989–2997 (Nucleotide 775 bis 807), wurden 3 Nucleotide angehängt, wodurch das folgende Nucleotidtripllett vervollständigt wird, um eine BspEI-Spaltstelle zu bilden. Die Nucleotide 808 bis 924 codieren die menschliche p53-Tetramerisierungsdomäne (Rheinacker et al., J. Immunol. 157 (1996), 2989–2997), gefolgt durch einen kurzen Peptidlinker von Nucleotid 925 bis 945. An die erbB2_{EC}-Domäne (Nucleotide 946 bis 2844) schließen sich ein C-terminaler His-Marker (Nucleotide 2845 bis 2862) und ein Stoppcodon an. Die zur Clonierung verwendeten Restriktionsenzym-Spaltstellen sind angegeben.

[0128] **Fig. 50:** ELISA-Analyse des Zellkulturüberstands und des Lysats, erhalten aus CHO-Zellen, die mit dem M79scFv-IL2-Dimer- oder -Tetramerkonstrukt transfiziert wurden. ELISA-Platten mit 96 Vertiefungen wurden mit 50 µl/Vertiefung eines löslichen 17-1A-Antigens (50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurde der rohe Zellkulturüberstand oder das entsprechende Zelllysate zugegeben, wie angegeben. Der Nachweis wurde mit einem Peroxidase-konjugierten anti-His-Marker-Antikörper (Roche; Kat. Nr. 1965085), 1 : 500 verdünnt, durchgeführt. Als negative Kontrolle wurden Vertiefungen mit phosphatgepufferter Salzlösung anstelle des M79scFv-IL2-Konstrukts inkubiert. Der ELISA wurde mit einer ABTS-Substratlösung entwickelt, wie in Beispiel 2.1 beschrieben. Die OD-Werte wurden mittels eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen.

[0129] **Fig. 51:** A: ELISA-Analyse des Zellkulturüberstands und des Lysats, erhalten aus CHO-Zellen, die mit dem M79scFv-IL2-Tetramerkonstrukt transfiziert wurden. ELISA-Platten mit 96 Vertiefungen wurden mit 50 µl/Vertiefung eines löslichen 17-1A-Antigens (50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden die rohen Zellkulturüberstände oder das entsprechende Zelllysate sowie Verdünnungen davon zugegeben, wie angegeben. Der Nachweis wurde mit einem Peroxidasekonjugierten anti-His-Marker-Antikörper (Roche; Kat. Nr. 1965085), 1 : 500 verdünnt, durchgeführt. Als negative Kontrolle wurden Vertiefungen mit phosphatgepufferter Salzlösung anstelle des tetrameren M79scFv-IL2-Konstrukts inkubiert. Der ELISA wurde mit einer ABTS-Substratlösung entwickelt, wie in Beispiel 2.1 beschrieben. Die OD-Werte wurden mittels eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen.

[0130] **Fig. 52:** Potential der Heterominikörper-Anordnung für die Addition von Effektordomänen an deren N- und C-terminalen Positionen.

[0131] **Fig. 53:** Heterominikörper, welcher EpCAM mit seinen N-terminalen scFv's (HD70) sowie IL-2- und GM-CSF-Rezeptor-tragende Zellen mit seinen C-terminal gebundenen Cytokinen IL-2 und GM-CSF erkennt.

[0132] **Fig. 54:** cDNA-Insertionen von zwei Vektoren, die zur Expression des in **Fig. 53** schematisch dargestellten Heterominikörpers in Säugerzellen verwendet wurden. Die Pfeile geben die verschiedenen funktionalen Teile der Insertionen an und zeigen die 5'-3'-Orientierung an.

[0133] **Fig. 55:** A. Vollständige Nucleotidsequenz und davon abgeleitete Aminosäuresequenz, codierend die HD70scFv-CH1-GM-CSF-Kette, welche zur Expression der linken Hälfte des in **Fig. 53** schematisch dargestellten Heterominikörpers verwendet wird (oberer Teil des in **Fig. 54** schematisch dargestellten Heterominikörpers).

[0134] B. Vollständige Nucleotidsequenz und davon abgeleitete Aminosäuresequenz, codierend die HD70scFv-CK-IL-2-Kette, welche zur Expression des rechten Teils des in **Fig. 53** schematisch dargestellten Heterominikörpers verwendet wird (unterer Teil des in **Fig. 54** schematisch dargestellten Heterominikörpers).

[0135] **Fig. 56:** Bindung eines Heterominikörpers an CHO-Zellen, die das menschliche EpCAM exprimieren. Expressionsvektoren, die den in **Fig. 53** dargestellten Heterominikörper codieren, wurden in CHO-Zellen stabil transfiziert. Die Überstände solcher Zellen wurden auf die Produktion und Sekretion eines Heterominikörpers unter Verwendung von CHO-Zellen, die auf ihrer Oberfläche menschliches EpCAM exprimieren, mittels FACS-Analyse (FACS-Calibur, Becton Dickinson) getestet. Der gebundene Heterominikörper wurde mit einem zweiten Antikörper, der an den GM-CSF-Teil des einzelnen Heterominikörpers bindet, und einem dritten Speziespezifisch markierten, FITC-markierten Antikörper (vgl. Text) nachgewiesen. Oberes Bild: EpCAM exprimierende CHO-Zellen plus Zellkulturmedium. Folgende Bilder: Überstände von Heterominikörper exprimieren-

den CHO-Zellen wurden in Zellkulturmedium verdünnt (von oben nach unten: 1 : 625, 1 : 125, 1 : 25, 1 : 5 und 1 : 1) und auf eine verstärkte Bindung an EpCAM-positive Zellen getestet.

[0136] **Fig. 57:** Die EpCAM-Bindungsaktivität ist mit GM-CSF- und IL-2-Immunreaktivitäten in Überständen von Heterominikörper produzierenden CHO-Zellen physisch verbunden. Der in **Fig. 53** gezeigte Heterominikörper wurde in CHO-Zellen exprimiert, und die erhaltenen Zellkulturüberstände wurden mit der extrazellulären Domäne eines rekombinanten EpCAM, immobilisiert an eine ELISA-Platte, inkubiert. Nach ausgedehnten Waschschritten wurde der gebundene Heterominikörper auf eine Immunreaktivität mit Antikörpern, die den menschlichen GM-CSF oder das menschliche IL-2 erkennen, in einem ELISA untersucht.

[0137] **Fig. 58:** IL-2- und GM-CSF-Immunreaktivitäten sind in Überständen von Heterominikörper produzierenden CHO-Zellen physikalisch verbunden. Der in **Fig. 53** gezeigte Heterominikörper wurde in CHO-Zellen exprimiert, und die erhaltenen Zellkulturüberstände wurden in einer ELISA-Platte inkubiert, die mit entweder anti-hu-IL-2- oder anti-hu-GM-CSF-Antikörpern beschichtet worden waren. Der gebundene Heterominikörper wurde dann auf eine Reaktivität mit einem Antikörper getestet, der das jeweilige andere Cytokin erkennt (vgl. Beispiele).

[0138] **Fig. 59:** Ein gereinigter Heterominikörper besteht aus kovalent verknüpften Ketten und geht eine Immunreaktion mit Antikörpern ein, die menschliche C-, menschliche IL-2- und menschliche GM-CSF-Proteine in Western-Blots erkennen. Der in **Fig. 53** gezeigte Heterominikörper wurde in CHO-Zellen exprimiert und in zwei Schritten aus dem Zellkulturüberstand gereinigt. Ein Aliquot eines teilweise gereinigten Heterominikörpers wurde durch eine Gradienten-SDS-PAGE und durch Färben des Gels auf Proteine mit Coomassie-Blau (Bahn 1) analysiert. Aliquots des Überstands wurden durch eine SDS-PAGE, gefolgt durch Elektroblootting auf Membranen und eine Immunfärbung mit Antikörpern, die menschliches C (Bahn 2), menschliches IL-2 (Bahn 3) und menschliches GM-CSF (Bahn 4) erkennen (vgl. Beispiele), aufgetrennt. Alkalische Phosphatase-konjugiertes Streptavidin wurde verwendet, um die gebundenen Primärantikörper sichtbar zu machen. Die Position von Molekulargewichtsstandards sind in den mit "S" bezeichneten Bahnen gezeigt, und deren Größe ist auf den rechten und linken Bahnen in Zahlen angegeben. Die Pfeile geben die Position der 116 kDa-Heterominikörper-Bande an. Gestrichelte Linien geben die Positionen von 188 kDa- und 97 kDa-Markern an.

[0139] **Fig. 60:** Bioaktivität von Heterominikörper gebundenem menschlichem GM-CSF. Der in **Fig. 53** gezeigte Heterominikörper wurde in CHO-Zellen hergestellt, aus Zellkulturüberständen gereinigt und anschließend in einem Proliferationstest unter Verwendung der auf GM-CSF ansprechenden, menschlichen Erythro-leukämie-Zelllinie TF-1 getestet. Das getestete Heterominikörper-Aliquot enthielt > 300 IE/ml an GM-CSF, wie mittels Titration gegen einen menschlichen GM-CSF-Standard gemessen wurde.

[0140] **Fig. 61:** Bioaktivität von Heterominikörper gebundenem menschlichem IL-2. Der in **Fig. 53** gezeigte Heterominikörper wurde in CHO-Zellen hergestellt, aus Zellkulturüberständen gereinigt und anschließend in einem Proliferationstest unter Verwendung der auf menschliches IL-2 ansprechenden, murinen T-Zelllinie CL96 getestet. Das getestete Heterominikörper-Aliquot enthielt > 10.000 IE/ml an menschlichem IL-2, wie mittels Titration gegen einen menschlichen IL-2-Standard gemessen wurde.

[0141] Die Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf die folgenden biologischen Beispiele beschrieben, die lediglich veranschaulichend sind und nicht als eine Begrenzung des Schutzzumfangs der vorliegenden Erfindung gedeutet werden sollen.

Beispiel 1

Beispiel 1.1: M79scFvCH1/CD80CK-Heterominikörper

[0142] Ein Protein wurde konstruiert, welches das einkettige Fv-Fragment (scFv) des murinen anti-17-1A-Antikörpers M79 (Göttlinger, Int. J. Cancer 38 (1986), 47–53) mit den extrazellulären Domänen des menschlichen CD80 aufgrund der heterodimeren Assoziation der Immunglobulin-domänen CH1 aus der menschlichen schweren γ 1-Kette und CK, die konstante Region der menschlichen leichten Kappa-Kette, verbindet. Zu diesem Zweck wurde M79scFv mit dem menschlichen CH1 verknüpft, und der extrazelluläre Teil des menschlichen CD80 wurde mit dem menschlichen C_{kappa}-verknüpft. Die erhaltenen das Polypeptid codierenden Ketten, wurden in verschiedene Expressionsvektoren inseriert, die beide in die gleiche Säuger-Wirtszelllinie transfiziert wurden, wobei der in **Fig. 1** gezeigte CD80-Heterominikörper erhalten wurde. Im folgenden Beispiel wird das Konstruktionsverfahren schrittweise beschrieben.

Beispiel 1.1.1: Konstruktion der CD80-CK-Kette

[0143] Zuerst wurde die CD80-C_{kappa}-Kette zusammengestellt. Das CK-DNA-Fragment wurde mittels PCR unter Verwendung von spezifischen 5'- und 3'-Primern erhalten. Die cDNA-Matrize für diese PCR wurde hergestellt durch reverse Transkription der Gesamt-RNA, die aus menschlichen einkernigen Zellen aus dem peripheren Blut gemäß Standardverfahren präpariert wurde (Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manu-

al, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)). Der 5'-HuCKBspEI-Primer führt die Restriktionsspaltstellen BspEI und BsiWI ein, sowie die Hinge-Region von IgG3 (5'-HuCKBspEI: 5'-AAT TCC GGA ACC CCG CTG GGT GAC ACC ACC CAC ACC CGT ACG GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC-3'). Der 3'-HuCKSalNOT-Primer führt die Spaltstellen Sall und NotI ein (3'-HuCKSalNOT: 5'-ATA AGA ATG CCG CCG CGT CGA CTA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT C-3'). Das CD80-Fragment wurde mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung von spezifischen Oligonucleotidprimern erhalten, die komplementär sind zu den 5'- und 3'-Enden der Nucleotidsequenz, die den extrazellulären Teil von CD80 codiert (Freeman G. J. et al., J. Immunol. 143 (1989), 2714–2722). Diese Primer führten auch eine EcoRI- und eine BspEI-Spaltstelle ein (5'-CD80-Primer: 5'-GCA GAA TTC ACC ATG GGC CAC ACA CGG AGG CAG-3'; 3'-CD80-Primer: 5'-TGG TCC GGA GTT ATC AGG AAA ATG CTC TTG CTT G-3'). Die für diese PCR verwendete cDNA-Matrize wurde hergestellt durch reverse Transkription der Gesamt-RNA, die aus der Burkitt-Lymphom-Zelllinie Raji gemäß Standardverfahren präpariert wurde (Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, (1989)).

[0144] Das co-stimulierende CD80-Protein gehört zur Ig-Superfamilie. Es ist ein stark glycosyliertes Protein aus 262 Aminosäuren. Eine ausführlichere Beschreibung wurde durch Freeman G. J. et al., J. Immunol. 143 (1989), 2714–2722, veröffentlicht.

[0145] Die CD80-C_{kappa} Kette wurde in mehreren Schritten unter Verwendung des bereits existierenden Vektors pEF-DHFR-CTI-CD80-M79scFv cloniert. Dieser Vektor wurde wie folgt hergestellt.

[0146] Zuerst wurde ein als CTI bezeichneter Polylinker unter Verwendung der Restriktionsenzym-Spaltstellen XbaI und Sall (Boehringer Mannheim) in den Bluescript KS-Vektor (GenBank®-Hinterlegungsnummer X52327) inseriert. Die Einführung des Polylinkers CTI stellte zusätzliche Spaltstellen bereit, sowie die Sequenz, welche einen (Gly₄Ser₁)₁-Linker, einen Marker aus 6 Resten der Aminosäure Histidin und ein Stoppcodon codiert, wie in **Fig. 2** gezeigt. Der Vektor Bluescript KS-CTI wurde hergestellt durch Spalten mit den Restriktionsenzymen EcoRV und XmaI (Boehringer Mannheim und New England Biolabs), um ihn mit dem M79scFv-Fragment, das mit EcoRV und BspEI gespalten worden war (Mack et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021–7025), zu ligieren (T4-DNA-Ligase, Boehringer Mannheim). Der erhaltene Vektor Bluescript KS-CTI-M79scFv wurde wiederum mit EcoRI (Boehringer Mannheim) und BspEI gespalten, um das CD80-PCR-DNA-Fragment zu inserieren, das erhalten wurde, wie vorstehend beschrieben, und mit den gleichen Enzymen gespalten worden war. Anschließend wurde das ganze CD80-M79scFv-(VLNH)-DNA-Fragment durch Spalten des Vektors Bluescript KS-CTI-CD80-M79scFv-(VLNH) mit EcoRI und Sall (Boehringer Mannheim) isoliert und dann in den eukaryontischen Expressionsvektor pEF-DHFR, beschrieben bei Mack et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021–7025, eingeführt, der das Dihydrofolatreduktase-Gen als Selektionsmarker enthält.

[0147] Für den letzten Schritt der Konstruktion der CD80-C_{kappa}-Kette wurde das C_{kappa}-Fragment, welches erhalten wurde, wie vorstehend beschrieben, mit den Restriktionsenzymen BspEI und Sall gespalten und unter Verwendung der gleichen Enzyme in den Vektor pEF-DHFR-CTI-M79scFv-CD80 cloniert. Auf diese Weise wurde das M79scFv-Fragment durch C_{kappa}-ersetzt. Das endgültige Plasmid pEF-DHFR-CTI-CD80-C_{kappa}, gezeigt in **Fig. 3**, wurde mit dem Restriktionsenzym NdeI (Boehringer Mannheim) linearisiert und mittels Elektroporation in CHO-Zellen transfiziert. Die Elektroporationsbedingungen waren 260 V/960 µF unter Verwendung einer BioRad-Gene Pulser™-Vorrichtung. Die stabile Expression wurde in DHFR-defizienten CHO-Zellen durchgeführt, wie durch Kaufmann R. J. et al., Methods Enzymol. 185 (1990), 537–566, beschrieben. Die Zellen wurden zur Selektion in Nucleosid-freiem α-MEM-Medium, supplementiert mit 10% dialysiertem FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 E/ml Penicillin und 100 ng/ml Streptomycin, gezüchtet.

Beispiel 1.1.2: Konstruktion der M79scFv-CH1-Kette

[0148] Im nächsten Schritt wurde die M79scFv-CH1-Kette zusammengestellt. Das CH1-Fragment der menschlichen schweren IgG1-Kette wurde mit der gleichen cDNA-Matrize, die zur PCR-Amplifikation der menschlichen C_{kappa}-Domäne verwendet worden war, mittels PCR amplifiziert. Der 5'-PCR-Primer führte zwei Spaltstellen (BspEI und NheI) sowie die obere Hinge-Region des menschlichen IgG3 ein (5'-CH1huG1BspEI: AAT TCC GGA ACC CCG CTG GGT GAC ACC CAC ACC GCT AGC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC C). Der 3'-PCR-Primer führte die Spaltstellen BspEI und SpeI ein (3'-CH1huG1BspEI : AAT TCC GGA ACT AGT TTT GTC ACA AGA TTT GG). Das erhaltene PCR-Fragment wurde durch Spalten mit dem Restriktionsenzym BspEI zur Clonierung präpariert und in den vorstehend beschriebenen BS-CTI-Vektor inseriert, der mit BspEI und XmaI gespalten worden war. Um die Selbstligation des Vektors zu vermeiden, wurde der Vektor mit alkalischer Phosphatase behandelt. Anschließend wurde das CH1-Fragment mit den Restriktionsenzymen Sall und BspEI aus BS-CTI ausgeschnitten, um es mit dem einkettigen Fv-Fragment von M79 zu verknüpfen, wie nachstehend beschrieben.

[0149] Der M79-Antikörper wurde durch Göttlinger et al., Int. J. Cancer 38 (1986), 47–53, beschrieben. Das

M79scFv-Fragment wurde aus dem bispezifischen, einkettigen Antikörper (M79scFv-antiCD3scFv) erhalten, welcher durch Mack et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021–7025, beschrieben wurde. Das DNA-Fragment, das diesen bispezifischen einkettigen Antikörper codiert, wurde aus dem Expressionsvektor pEF-DHFR ausgeschnitten und unter Verwendung der Restriktionsenzyme EcoRI bzw. Sall in den Expressionsvektor pEF-ADA inseriert. Der Expressionsvektor pEF-ADA wurde aus dem Expressionsvektor pEF-DHFR (Mack et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021–7025) durch Ersetzen der cDNA, welche die murine Dihydrofolatreduktase (DHFR) codiert, durch diejenige, welche die murine Desaminase codiert, abgeleitet.

[0150] Um das CH1-Fragment einzuführen und auf diese Weise das anti-CD3scFv-Fragment zu ersetzen, wurde der Vektor pEF-ADA, enthaltend den bispezifischen einkettigen Antikörper M79scFv-antiCD3scFv, mit den gleichen Restriktionsenzymen gespalten, die zur Herstellung des CH1-Fragments verwendet wurden (BspEI und Sall). Das erhaltene Plasmid pEF-ADA-M79scFv-CH1, gezeigt in **Fig. 3**, wurde mit NdeI linearisiert und in CHO-Zellen eingeschleust, die bereits mit dem Expressionsvektor pEF-DHFR-CTI-CD80-CK transfiziert worden waren. Die doppelt transfizierten Zellen wurden zur Selektion in Nucleosid-freiem α -MEM-Medium, supplementiert mit 10% dialysiertem FCS und 2 mM L-Glutamin, 100 E/ml Penicillin, 100 ng/ml Streptomycin, 0,1 μ M Desoxycoformycin (dCF) und 1 \times 1.1-AAU-Zusatz, gezüchtet, wie durch Kaufmann R. J. (Meth. Enzym. 185 (1990), 537–566) beschrieben. Nach erfolgreicher Züchtung der Zellen unter diesen Bedingungen wurde die dCF-Konzentration auf 0,3 μ M erhöht (ADA-Selektion), und MTX wurde bis zu einer Endkonzentration von 20 nM zugegeben (DHFR-Selektion), um höhere Expressionsraten des Heterominkörpers aufgrund einer Genamplifikation zu erhalten. Eine ELISA-Analyse des Kulturüberstands der transfizierten Zelllinien wurde ausgeführt, um die Expressionsrate des Heterominkörpers zu bestimmen und um dessen Bindungsspezifität für das 17-1A-Antigen zu bestätigen (vgl. Beispiel 4.4 und die **Fig. 9** und **10**).

Beispiel 1.2.1: M79scFvCK/CD80CH1-Heterominkörper

[0151] Eine andere Ausführungsform des CD80-Heterominkörpers wurde dadurch konstruiert, daß das M79scFv- und das CD80-Fragment gegeneinander ausgetauscht wurden. Dafür wurden die Expressionsplasmide pEF-DHFR-CTI-CD80-CK und pEF-ADA-M79scFv-CH1 mit EcoRI und BspEI gespalten. Das M79scFv-Fragment wurde dann mit dem pEF-DHFR-CTI-CK-Fragment ligiert, und das CD80-Fragment wurde mit dem pEF-ADA-CH1-Fragment ligiert. Zuerst wurde der Vektor pEF-DHFR-M79scFv-CK in CHO-Zellen transfiziert und zur Selektion gezüchtet, wie in Beispiel 1.1 beschrieben. pEF-ADA-CD80-CH1 wurde in einem zweiten Schritt in die gleichen CHO-Zellen transfiziert, und die erhaltenen doppelt transfizierten CHO-Zellen wurden zur Selektion gezüchtet, wie vorstehend beschrieben (vgl. **Fig. 1** und **3**).

1.2.2: Amplifikation, Subclonierung und Reinigung des M79scFvCK/CD80CH1-Heterominkörpers

[0152] Die primäre Selektion wurde in Nucleosid-freiem α -MEM-Kulturmedium, supplementiert mit 10% dialysiertem FCS und 0,1 μ M Desoxycoformycin (dCF) sowie 1 \times 1.1-AAU-Zusatz, ausgeführt, wie beschrieben (Kaufmann, Methods Enzymol. 185 (1990), 537–566). Die Expression dieses Konstruktes wird mittels Genamplifikation erhöht, welche durch die schrittweise Steigerung der Konzentrationen des DHFR-Inhibitors Methotrexat (MTX) und des ADA-Inhibitors Desoxycoformycin (dCF) induziert wurde.

[0153] Die einzelnen Amplifikationsschritte wurden wie folgt ausgeführt:

1. Amplifikation: 20 nM MTX und 0,3 μ M dCF,
2. Amplifikation: 100 μ M MTX und 1 μ M dCF,
3. Amplifikation: 500 nM MTX und 3 μ M dCF.

[0154] Die aus dem dritten Amplifikationsschritt erhaltenen Zellen wurden mit Hilfe des Grenzverdünnungsverfahrens cloniert. Dafür wurden die Zellen in einer Konzentration von 50 Zellen pro ml, 10 Zellen pro ml und 2 Zellen pro ml in Flachboden-Gewebekulturplatten mit 96 Vertiefungen gemäß Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach und Strober, Wiley-Interscience, 1992) unter den Kulturbedingungen des dritten Amplifikationsschritts überimpft. Positive Clone aus Vertiefungen mit einer einzigen dichten Ansammlung von Zellen als Hinweis auf ein monoclonales Wachstum wurden durch einen ELISA identifiziert, wie in Beispiel 2.1 beschrieben.

[0155] Ein positiver Clon wurde vermehrt und zur Proteinherstellung verwendet. Die Antikörperproduktion im großen Maßstab wurde in Rollerflaschen unter Verwendung von 500 ml Medium ausgeführt.

[0156] Der M79scFvCK/CD80CH1-Heterominkörper wurde mit Hilfe seines C-terminalen Histidin-Schwanzes gereinigt, wie beschrieben (Mack et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021–7025).

Beispiel 1.2.3: ELISA mit Zellkulturüberständen von CD80-Heterominkörpern

[0157] Um die 17-1A-Bindungseigenschaften der beiden CD80-Heterominkörper-Ausführungsformen zu un-

tersuchen und um die richtige Zusammenlagerung von CH1 und CK zu bestätigen, wurden zwei unterschiedliche ELISAs ausgeführt. Die spezifische Bindung an das 17-1A-Antigen wurde durch Inkubation des Kulturüberstands mit einem immobilisierten rekombinanten 17-1A-Antigen und durch Nachweis der gebundenen CD80-Heterominkörper mit einem anti-CD80-Antikörper gezeigt. Die heterodimere Struktur der Heterominkörper wurde durch Inkubation des Kulturüberstands mit einem immobilisierten anti-His-Marker-Antikörper, gefolgt durch einen Nachweisschritt mit einem anti-Mensch-C_{kappa}-Antikörper, bestätigt. Für Einzelheiten über beide ELISAs vgl. Beispiel 4.4 und **Fig. 9** und **10**.

Beispiel 2: Analyse der Heterominkörper M79scFvCK/CD80CH1 und M79scFvCH1/CD80CK

2.1: ELISA-Analyse des Heterominkörpers M79scFvCK/CD80CH1, exprimiert durch transfizierte CHO-Zelllinien, bei unterschiedlichen Genamplifikationsschritten

[0158] Die der primären Selektion, der ersten und zweiten Amplifikation und der dritten Amplifikation plus der folgenden Zellclonierung entsprechenden Kulturüberstände wurden durch einen ELISA getestet. Zu diesem Zweck wurden Rundboden-ELISA-Platten mit 96 Vertiefungen (Nunc Maxisorb) mit einem rekombinanten 17-1A (Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021-7025) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) beschichtet (50 µg/ml, 50 µl/Vertiefung). Die Beschichtung wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt. Die Blockierung wurde mit 3% Rinderserumalbumin (BSA) in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur ausgeführt. Die Antikörperkonstrukte in Form der Kulturüberstände aus der primären Selektion (PS) bzw. aus den verschiedenen Amplifikationsschritten (1. Amp., 2. Amp., 3. Amp., subcloniert) (**Fig. 4**) wurden zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der gebundene Heterominkörper wurde mit einem biotinmarkierten anti-Mensch-CK-Antikörper (Pierce; Kat. Nr. 31780), 1 : 1000 in PBS, 1% BSA verdünnt, nachgewiesen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS, 0,05% Tween-20 wurde Avidin-Peroxidase (Dako, Hamburg; Kat. Nr. P0347), 1 : 1000 verdünnt, zugegeben und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS, 0,05% Tween-20 wurde der ELISA schließlich durch Zugabe der folgenden Substratlösung entwickelt: 22 mg ABTS (2,2-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-Diammoniumsalz) wurden in 10 ml 0,1 M Citratpuffer, pH 5,1, enthaltend 2,3 mg Natriumperborattetrahydrat, gelöst. Für die negativen Kontrollen wurden die Platten mit PBS anstelle der bifunktionalen Antikörperkonstrukte inkubiert. Der farbige Niederschlag wurde unter Verwendung eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen. Wie in **Fig. 4** gezeigt, erhöhte sich die Heterominkörper-Expression kontinuierlich von der primären Selektion bis zu einem Zellclon aus dem dritten Amplifikationsschritt.

2.2: ELISA-Analyse der Heterominkörper M79scFvCK/CD80CH1 und M79scFv-CHI/CD80CK durch unterschiedliche Kombinationen von immobilisierten Antikörpern oder einem immobilisierten 17-1A-Antigen mit geeigneten Nachweisantikörpern

2.2.1: ELISA-Analyse mit einem immobilisierten 17-1A-Antigen und einem anti-CD80-Nachweisantikörper

[0159] Die aus dem 1. Amplifikationsschritt erhaltenen Kulturüberstände wurden getestet. Die ELISA-Platte wurde mit einem rekombinanten 17-1A-Antigen beschichtet. Die gebundenen Antikörperkonstrukte wurden mit einem CD80-spezifischen, monoclonalen Antikörper (Immunotech; Kat. Nr. 1449), 1 : 1000 in PBS, 1% BSA verdünnt, gefolgt durch einen Peroxidase-konjugierten, polyclonalen Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper (Fc-spezifisch), 1 : 1000 in PBS, 1% BSA verdünnt, nachgewiesen. Das ELISA-Verfahren wurde durchgeführt, wie vorstehend beschrieben. Wie in **Fig. 9** gezeigt, wurde für beide Heterominkörper-Ausführungsformen gezeigt, daß sie an das 17-1A-Antigen binden, obwohl die M79scFvCK/CD80CH1-Ausführungsform eine wesentlich höhere Expressionsrate als die M79scFvCH1/CD80CK-Ausführungsform zeigte.

2.2.2: ELISA-Analyse mit einem immobilisierten anti-His-Marker-Antikörper und einem anti-Mensch-C_{kappa}-Nachweisantikörper

[0160] Die aus dem 1. Amplifikationsschritt erhaltenen Kulturüberstände wurden getestet. Die ELISA-Platte wurde mit einem BSA-freien anti-Histidin-Marker-Antikörper (Dianova, Hamburg; Kat. Nr. DIA910) beschichtet. Die gebundenen Antikörperkonstrukte wurden mit einem biotinmarkierten anti-Mensch-C_{kappa}-Antikörper (Pierce; Kat. Nr. 31780), 1 : 1000 in PBS verdünnt, gefolgt durch Avidin-Peroxidase (Dako, Hamburg; Kat. Nr. P0347), 1 : 1000 in 1% BSA verdünnt, nachgewiesen. Das ELISA-Verfahren wurde durchgeführt, wie vorstehend beschrieben. Wie in **Fig. 10** gezeigt, bestätigen die Ergebnisse dieses ELISA die höhere Expressionsrate des Heterominkörpers M79scFvCK/CD80CH1 und zeigen zusammen mit den Ergebnissen aus dem vorangegangenen ELISA eindeutig die heterodimere Struktur der CD80-Heterominkörper.

2.2.3: ELISA-Analyse mit einem immobilisierten CTLA-4-Ig-Fusionsprotein und einem anti-Mensch-C_{kappa}-Nachweisantikörper

[0161] Um die Wechselwirkung des CD80 (B7-1)-Arms des Heterominikörpers M79-scFvCK/CD80CH1 mit seinem Rezeptorgegenstück CTLA-4 zu zeigen, wurde ein im Handel erhältliches CTLA-4-Ig-Fusionsprotein (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA; Kat. Nr. 325-CT) auf einer ELISA-Platte immobilisiert (Beschichtungskonzentration 10 µg/ml) und nach Blockierung mit PBS/3% BSA mit unterschiedlichen Konzentrationen des gereinigten Heterominikörpers (in PBS/1% BSA) inkubiert. Der gebundene Heterominikörper wurde mit einem biotinmarkierten anti-Mensch-C_{kappa}-Antikörper (Pierce; Kat. Nr. 31780), 1 : 1000 in PBS/1% BSA verdünnt, gefolgt durch Peroxidase-konjugiertes Avidin, nachgewiesen. Als negative Kontrolle wurden einige Vertiefungen der ELISA-Platte mit einem CD4-Ig-Fusionsprotein anstelle des CTLA-4-Ig-Fusionsproteins beschichtet. Das allgemeine ELISA-Verfahren wurde durchgeführt, wie vorstehend beschrieben. Die in **Fig. 39** gezeigten Ergebnisse zeigen eindeutig die spezifische Bindung des Heterominikörpers an menschliches CTLA-4.

Beispiel 2.3: SDS-Proteingel

[0162] Um die Größe des gereinigten Heterominikörpers M79scFvCK/CD80CH1 zu bestimmen, wurde eine SDS-PAGE mit einem 10%igen Polyacrylamidgel unter nichtreduzierenden und reduzierenden Bedingungen gemäß Laemmli (Laemmli, Nature 227 (1970), Nr. 259, 680–685) ausgeführt. Das Gel wurde anschließend einer Proteinfärbung mit ROTI[®]-Blau (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland; Kat. Nr. A152.1) unterzogen. Im Vergleich zu dem verwendeten Molekulargewichtsstandard (Rainbow[™], farbiger Proteinkulargewichtsmarker, Bereich 14.300–2.200.000, Amersham LIFESCIENCE, Braunschweig, Deutschland; Kat. Nr. RPN 756) konnte eine deutliche Proteinbande unter nichtreduzierenden Bedingungen bei etwa 115 kD beobachtet werden, die mit dem erwarteten Molekulargewicht übereinstimmt. Unter reduzierenden Bedingungen erschienen zwei Banden von etwa 40 kD, entsprechend dem M79scFvCK-Arm des Heterominikörpers, und von etwa 60 kD, entsprechend dem CD80CH1-Arm des Heterominikörpers. Auf diese Weise konnte die kovalente Verknüpfung der zwei Heterominikörperarme über eine Disulfidbrücke bestätigt werden, wobei die "verwischte" 60 kD-Bande die Glycosylierung der extrazellulären CD80-Domäne veranschaulicht.

Beispiel 2.4: Analyse des Heterominikörpers M79scFvCK/CD80CH1 mittels Durchflußcytometrie

[0163] Die Bindung des Heterominikörpers M79scFvCK/CD80CH1 an das native 17-1A-Antigen wurde mittels Durchflußcytometrie analysiert. 200.000 17-1A-transfizierte CHO-Zellen (vgl. Beispiel 5.1) wurden für 30 Minuten mit mehreren Verdünnungen des gereinigten Heterominikörpers im Bereich von 4 µg/ml bis 3,9 ng/ml inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und weitere 30 Minuten mit einem R-Phycoerythrin-konjugierten, murinen anti-Mensch-CD80-Antikörper (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA; Kat. Nr. 340294) inkubiert. Nach zwei letzten Waschschritten in PBS wurden die Zellen mittels Durchflußcytometrie (FACS-SCAN, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) analysiert. Für Ergebnisse vgl. **Fig. 5**.

[0164] Alternativ wurden 17-1A-transfizierte CHO-Zellen für 30 Minuten auf Eis mit dem gereinigten Heterominikörper M79scFvCK/CD80CH1 in einer Konzentration von 0,2 mg/ml inkubiert. Nach Waschen in PBS wurden die Zellen für 30 Minuten auf Eis mit einem FITC-konjugierten anti-Mensch-C_{kappa}-Antikörper (Coulter; Kat. Nr. 6604287), 1 : 10 verdünnt, inkubiert, wiederum in PBS gewaschen und anschließend einer Durchflußcytometrie unterzogen. Das Ergebnis ist in **Fig. 37** gezeigt.

[0165] Um die Wechselwirkung des CD80 (B7-1)-Arms des Heterominikörpers M79-scFvCK/CD80CH1 mit seinem Rezeptorgegenstück CD28 zu zeigen, wurde eine durchflußcytometrische Analyse mit naiven CD8⁺CD11b⁻-T-Zellen, welche gemäß Beispiel 6.1 isoliert wurden, ausgeführt. Durch eine übliche Durchflußcytometrie wurde bestätigt, daß die Zellen CD28, aber nicht CTLA-4, das andere CD80-Rezeptorgegenstück, exprimieren. Naive CD8⁺CD11b⁻-T-Zellen wurden dann für 30 Minuten auf Eis mit dem gereinigten Heterominikörper M79scFvCK/CD80CH1 in einer Konzentration von 0,2 mg/ml inkubiert. Nach Waschen in PBS wurden die Zellen für 30 Minuten auf Eis mit einem FITC-konjugierten anti-Mensch-C_{kappa}-Antikörper (Coulter; Kat. Nr. 6604287), 1 : 10 verdünnt, inkubiert, wiederum in PBS gewaschen und anschließend einer Durchflußcytometrie unterzogen. Das ist in **Fig. 38** gezeigte Ergebnis veranschaulicht die Bindung des Heterominikörpers M79scFvCK/CD80-CH1 an CD28. Die Bindungsspezifität wurde durch Blockierung des Fluoreszenzsignals mit einem im Handel erhältlichen CTLA-4-Ig-Fusionsprotein (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA; Kat. Nr. 325-CT) bestätigt.

Beispiel 3: CD80-antiLe_γscFv-Heterominikörper-Konstrukte3.1 Heterominikörper antiLe_γscFvCH1/CD80CK-Konstrukt

[0166] Ein CD80-Heterominikörper mit einer anderen Antigen-spezifität (anti-Lewis-Y (LeY)) wurde konstruiert, indem die 17-1A-spezifische Antigen-Bindungsregion M79scFv durch das scFv-Fragment eines murinen monoclonalen Antikörpers, der gegen das Lewis-Y-Antigen (LeY) gerichtet ist, das auf vielen Epitheltumorzellen exprimiert wird, ersetzt wurde. Zur Konstruktionsstrategie vgl. **Fig. 1** und **3**. Zur Erzeugung der antiLe_γscFv-CH1-Kette wurde der Vektor pEF-ADA-M79scFv-CH1, beschrieben in Beispiel 1.1.2 und dargestellt in **Fig. 3**, mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BspEI gespalten, wodurch das M79scFv-Fragment einschließlich der N-terminalen eukaryontischen Leadersequenz freigesetzt wurde. Dieses scFv-Fragment wurde dann durch das Fragment des LeY-spezifischen Antikörpers ersetzt, das auch eine eukaryontische Leadersequenz an seinem N-Terminus trägt. Die Sequenz des entsprechenden EcoRI/BspEI-DNA-Fragments ist in **Fig. 6** dargestellt. Die Subclonierung wurde in dem E. coli-Stamm XL-1-Blue gemäß Standardverfahren ausgeführt (Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Das erhaltene Expressionsplasmid pEF-ADA-antiLe_γscFv-CH1 wurde mit NdeI linearisiert und in CHO-Zellen transfiziert, die bereits mit dem Expressionsplasmid pEF-DHFR-CTI-CD80-C_{kappa}, beschrieben in Beispiel 1 und dargestellt in **Fig. 7**, transfiziert worden waren. Die primäre Selektion der erhaltenen Doppeltransfektanten wurde ausgeführt, wie in Beispiel 1 beschrieben. Die Expression des Heterominikörpers antiLe_γscFvCH1/CD80CK wurde anschließend durch eine Genamplifikation erhöht, welche durch die Zugabe des DHFR-Inhibitors Methotrexat (MTX) bis zu einer Endkonzentration von 20 nM und die Erhöhung von Desoxycoformycin (dCF) bis zu einer Endkonzentration von 0,3 µM induziert wurde, wie beschrieben (Kaufmann, Methods Enzymol. 185 (1990), 537–566).

3.2 Heterominikörper antiLe_γscFvCK/CD80CH1

[0167] Zur Konstruktion des Heterominikörpers antiLe_γscFvCK/CD80CH1 wurde das M79scFv-Fragment aus dem Vektor pEF-DHFR-M79scFv-CK, beschrieben in Beispiel 1, unter Verwendung der Restriktionsenzyme EcoRI und BspEI ausgeschnitten und durch das EcoRI/BspEI-Fragment der Antigen-Bindungsregion des LeY-spezifischen Antikörpers ersetzt, wie in **Fig. 6** dargestellt. Die Subclonierung wurde in dem E. coli-Stamm XL-1-Blue gemäß Standardverfahren ausgeführt (Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)).

[0168] Das erhaltene Expressionsplasmid pEF-DHFR-antiLe_γscFvCK wurde in CHO-Zellen transfiziert, gefolgt durch die Transfektion des Expressionsplasmids pEF-ADA-CD80-CH1, das in Beispiel 1 beschrieben wurde. Um die Expression des Heterominikörpers anti-Le_γscFvCK/CD80CH1 zu erhöhen, wurde eine Genamplifikation ausgeführt, wie vorstehend für den Heterominikörper antiLe_γscFvCH1/CD80CK beschrieben wurde.

3.3.1 ELISA-Analyse des Heterominikörpers antiLe_γscFvCK/CD80CH1 und des Heterominikörpers antiLe_γscFvCH1/CD80CK mit einem immobilisierten LeY-BSA-Konjugat einem anti-CD80-Nachweisantikörper

[0169] Die Kulturüberstände der entsprechenden Transfektanten, die nach dem ersten Genamplifikationsschritt gewonnen worden waren, wurden durch einen ELISA getestet. Zu diesem Zweck wurden U-Boden-ELISA-Platten mit 96 Vertiefungen (Nunc Maxisorb) mit einem im Handel erhältlichen BSA-Konjugat eines synthetischen Lewis-Y-Antigens (Alberta Research Council, Kanada) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) beschichtet (30 µg/ml, 50 µl/Vertiefung). Die Beschichtung wurde über Nacht bei 4°C ausgeführt. Die Blockierung wurde mit 3% Rinderserumalbumin (BSA) in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Kulturüberstände aus dem ersten Amplifikationsschritt (1. Amp.) (**Fig. 7**) wurden zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur bei unterschiedlichen Verdünnungen, hergestellt in PBS, enthaltend 1% BSA, inkubiert.

[0170] Die gebundenen Heterominikörper wurden mit einem CD80-spezifischen, monoclonalen Antikörper (Immunotech; Kat. Nr. 1449), 1 : 1000 in PBS, 1% BSA verdünnt, nachgewiesen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS, 0,05% Tween-20 wurde ein Peroxidasekonjugierter, polyclonaler Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper (Fc-spezifisch), 1 : 5000 verdünnt, zugegeben und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS, 0,05% Tween-20 wurde der ELISA schließlich durch Zugabe der folgenden Substratlösung entwickelt: 22 mg ABTS (2,2-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-Diammoniumsalz) wurden in 10 ml 0,1 M Citratpuffer, pH 5,1, enthaltend 2,3 mg Natriumperborattetrahydrat, gelöst. Für negative Kontrollen wurden die Platten mit PBS anstelle der Kulturüberstände inkubiert. Der farbige Niederschlag wurde unter Verwendung eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen. Die Ergebnisse sind in **Fig. 7** dargestellt und zeigen die Spezifität der beiden Heterominikörper-Ausführungsformen für das LeY-Antigen und deren heterodimere Struktur.

3.3.2 ELISA-Analyse des Heterominikörpers antiLe_γscFvCK/CD80CH1 und des Heterominikörpers antiLe_γscFvCH1/CD80CK mit einem immobilisierten anti-His-Marker-Antikörper und einem anti-Mensch-C_κ_{pa}-Nachweisantikörper der entsprechenden Transfektanten, wobei die Konstrukte nach dem ersten Genamplifikationsschritt unter Verwendung einer His-Beschichtung gewonnen wurden

[0171] Die Kulturüberstände wurden durch einen ELISA getestet. Zu diesem Zweck wurden U-Boden-ELISA-Platten (Nunc Maxisorb) mit 96 Vertiefungen mit einem BSAfreien anti-His-Marker-Antikörper (Dianova; Kat. Nr. 910) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) beschichtet (25 µg/ml, 50 µl/Vertiefung). Die Beschichtung wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt. Die Blockierung wurde mit 3% Rinderserumalbumin (BSA) in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur ausgeführt. Die Kulturüberstände aus dem ersten Amplifikationsschritt (1. Amp.) (**Fig. 8**) wurden zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur bei unterschiedlichen Verdünnungen, hergestellt in PBS, enthaltend 1% BSA, inkubiert.

[0172] Die gebundenen Heterominikörper wurden mit einem biotinmarkierten anti-Mensch-C_κ_{pa}-Antikörper (Pierce; Kat. Nr. 31780), 1 : 1000 in PBS, 1% BSA verdünnt, nachgewiesen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS, 0,05% Tween-20 wurde Peroxidasekonjugiertes Avidin (Dako, Hamburg; Kat. Nr. P0347) zugegeben und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS, 0,05% Tween-20 wurde der ELISA schließlich durch Zugabe der folgenden Substratlösung entwickelt: 22 mg ABTS (2,2-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-Diammoniumsalz) wurden in 10 ml 0,1 M Citratpuffer, pH 5,1, enthaltend 2,3 mg Natriumperborattetrahydrat, gelöst. Für negative Kontrollen wurden die Platten mit PBS anstelle des Kulturüberstands inkubiert. Der farbige Niederschlag wurde unter Verwendung eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen. Die Ergebnisse sind in **Fig. 8** gezeigt und bestätigen die Ergebnisse des vorangegangenen ELISA.

Beispiel 4: Konstruktion von M79scFv-Heterominikörpern mit unterschiedlichen co-stimulierenden Proteinen (CD54, CD58 und CD86)

[0173] Heterominikörper wurden konstruiert, die drei weitere co-stimulierende (CD86) oder Adhäsionsproteine (CD54 und CD58) enthielten. CD54, CD58 und CD86 wurden in beide Heterominikörper-Ausführungsformen (vgl. Beispiel 1.1 und 1.2) eingeführt. Die CD54-, CD58- und CD86-Fragmente wurden erhalten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung von spezifischen Oligonucleotidprimern, die komplementär sind zu den 5'- und 3'-Enden der Nucleotidsequenz, die den extrazellulären Teil dieser Proteine codiert. Die für diese PCRs verwendeten cDNA-Matrizen wurden hergestellt durch reverse Transkription der Gesamt-RNA, die aus verschiedenen Zelllinien, wie nachstehend erwähnt, gemäß Standardverfahren präpariert wurde (Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)).

4.1: Konstruktion von zwei M79scFv-CD54-Heterominikörper-Ausführungsformen

[0174] Die CD54-Heterominikörper wurden konstruiert, indem der extrazelluläre Teil von CD80 innerhalb der in Beispiel 1 beschriebenen Heterominikörper durch denjenigen von CD54 ersetzt wurde (**Fig. 1**). Die Konstruktionsstrategie wird nachstehend beschrieben.

4.1.1: Konstruktion des Heterominikörpers M79scFvCH1/CD54CK

[0175] Das CD54-Antigen, bekannt als ICAM-1 (intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1), gehört zur Ig-Superfamilie. Es ist ein stark glycosyliertes Protein, das auf vielen lymphoiden Zellen, z. B. dendritischen Zellen, exprimiert wird. Eine ausführlichere Beschreibung wurde durch Simmons D. et al., Nature 331 (1987), 624–626, veröffentlicht. Die cDNA-Matrize wurde durch reverse Transkription der Gesamt-RNA aus TPA-stimulierten HL-60-Zellen erhalten. Um die extrazelluläre Domäne von CD54 zu amplifizieren, wurden spezifische Primer für die 5'- und 3'-Enden verwendet. Diese Primer führten auch die Restriktionsspaltstellen EcoRI und BspEI ein (5'-ICAM: CTC GAA TTC ACT ATG GCT CCC AGC AGC CCC CG; und 3'-ICAM: GAT TCC GGA CTC ATA CCG GGG GGA GAG CAC). Das weitere Clonierungs- und Expressionsverfahren entsprach dem in Beispiel 1.1 für den entsprechenden CD80-Heterominikörper beschrieben, wobei doppelt transfizierte CHO-Zellen (pEF-ADA-M79scFvCH1, pEF-DHFR-CTI-CD54-CK; **Fig. 3**) erhalten wurden, für die gezeigt wurde, daß sie den CD54-Heterominikörper in das Zellkulturmedium sezernieren.

4.1.2: Konstruktion des Heterominikörpers M79scFvCK/CD54CH1

[0176] Eine andere Ausführungsform des CD54-Heterominikörpers wurde konstruiert, indem das M79scFv- und das CD54-Fragment gegeneinander ausgetauscht wurden. Zu diesem Zweck wurden die zwei Expressi-

onsplasmide pEF-DHFR-CTI-CD54-CK und pEF-ADA-M79scFv-CH1, vorstehend beschrieben, mit NdeI bzw. BspEI gespalten. Das CD54 enthaltende Fragment wurde in das pEF-ADA-Vektorfragment cloniert, das CH1 enthält. Das erhaltene Expressionsplasmid pEF-ADA-CD54-CH1 (**Fig. 3**) wurde in transfizierte CHO-Zellen eingeschleust (vgl. Beispiel 1.2.1), die bereits mit pEF-DHFR-M79scFV-CK (**Fig. 3**) transfiziert worden waren, wie in Beispiel 1.1.1 beschrieben. Die doppelt transfizierten CHO-Zellen wurden zur Selektion gezüchtet, wie in Beispiel 1 beschrieben.

Beispiel 4.1.3: ELISA mit Zellkulturüberständen von M79scFv-CD54-Heterominikörpern

[0177] Um die 17-1A-Bindungsspezifität der beiden CD54-Heterominikörper-Ausführungsformen zu untersuchen und um die richtige Zusammenlagerung von CH1 und CK zu bestätigen, wurden zwei unterschiedliche ELISAs ausgeführt. Die spezifische Bindung an das 17-1A-Antigen und die heterodimere Struktur der Heterominikörper wurden durch Inkubation des Kulturüberstands mit einem immobilisierten rekombinanten 17-1A-Antigen und durch Nachweis der gebundenen CD54-Heterominikörper mit einem anti-CD54-Antikörper nachgewiesen. Die heterodimere Struktur der Heterominikörper wurde weiterhin durch Inkubation des Kulturüberstands mit einem immobilisierten anti-His-Marker-Antikörper, gefolgt durch einen Nachweisschritt mit einem anti-Mensch-C_{kappa}-Antikörper, bestätigt. Für Einzelheiten über beide ELISAs vgl. Beispiel 4.4 und **Fig. 9** und 10.

4.2: Konstruktion von zwei M79scFv-CD58-Heterominikörper-Ausführungsformen

[0178] Die CD58-Heterominikörper wurden konstruiert, indem der extrazelluläre Teil von CD80 innerhalb der in Beispiel 1 beschriebenen Heterominikörper durch denjenigen von CD58 ersetzt wurde (**Fig. 1**). Die Konstruktionsstrategie wird nachstehend beschrieben.

4.2.1: Konstruktion des M79scFvCH1/CD58CK-Heterominikörpers

[0179] CD58, auch bekannt als LFA-3 (Lymphocytenfunktion-assoziiertes Antigen), ist ein Protein, das zur Ig-Superfamilie gehört, und ist das Rezeptorgegenstück von CD2. Eine ausführlichere Beschreibung wurde durch Wallner B. P. et al., J. Exp. Med. 166 (1987), 923–932, veröffentlicht. Die cDNA-Matrize wurde durch reverse Transkription der Gesamt-RNA aus U937-Zellen erhalten. Um die extrazelluläre Domäne von CD58 zu amplifizieren und um die Restriktionsenzym-Spaltstellen XbaI und BspEI einzuführen, wurden spezifische 5'- und 3'-Primer verwendet (5'-LAF-3: AA TCT AGA ACC ATG GTT GCT GGG AGC GAC G; und 3'-LAF-3: AAG TCC GGA TCT GTG TCT TGA ATG ACC GCT GC). Das weitere Clonierungs- und Expressionsverfahren entsprach dem in Beispiel 1 beschriebenen, außer daß XbaI anstelle von EcoRI auf Grund einer internen EcoRI-Stelle innerhalb des CD58-DNA-Fragments verwendet wurde und ein dam-Methylase-defizienter E. coli-Stamm verwendet wurde, um eine Blockierung der BspEI-Stelle am 3'-Ende des CD58-Fragments infolge einer überlappenden dam-Stelle zu verhindern. Für die schließlich erhaltenen doppelt transfizierten CHO-Zellen (pEF-ADA-M79scFvCH1, pEF-DHFR-CTI-CD58-CK; vgl. **Fig. 3**) wurde gezeigt, daß sie den CD58-Heterominikörper in das Zellkulturmedium sezernieren.

4.2.2: Konstruktion des Heterominikörpers M79scFvCK/CD58CH1

[0180] Eine andere Ausführungsform des CD58-Heterominikörpers wurde konstruiert, indem das M79scFv- und das CD58-Fragment gegeneinander ausgetauscht wurden (vgl. **Fig. 1**). Zu diesem Zweck wurden die zwei Expressionsplasmide pEF-DHFR-CTI-CD58-CK und pEF-ADA-M79scFvCH1, vorstehend beschrieben, mit NdeI bzw. BspEI gespalten. Das CD58 enthaltende Fragment wurde in das pEF-ADA-Vektorfragment cloniert, das CH1 enthielt. Das erhaltene Expressionsplasmid pEF-ADA-CD58-CH1 (**Fig. 3**) wurde in CHO-Zellen eingeschleust, die bereits mit pEF-DHFR-M79scFV-CK transfiziert worden waren, wie in Beispiel 1 beschrieben. Die doppelt transfizierten CHO-Zellen wurden zur Selektion gezüchtet, wie in Beispiel 1 beschrieben.

Beispiel 4.2.3: ELISA mit Zellkulturüberständen von M79scFv-CD58-Heterominikörpern

[0181] Um die 17-1A-Bindungsspezifität der beiden CD58-Heterominikörper-Ausführungsformen zu untersuchen und um die richtige Zusammenlagerung von CH1 und CK zu bestätigen, wurden zwei unterschiedliche ELISAs ausgeführt. Die spezifische Bindung an das 17-1A-Antigen und die heterodimere Struktur der Heterominikörper wurden durch Inkubation des Kulturüberstands mit einem immobilisierten rekombinanten 17-1A-Antigen und durch Nachweis der gebundenen CD58-Heterominikörper mit einem anti-CD58-Antikörper gezeigt. Die heterodimere Struktur der Heterominikörper wurde weiterhin durch Inkubation des Kulturüberstands mit einem immobilisierten anti-His-Marker-Antikörper, gefolgt durch einen Nachweisschritt mit einem an-

ti-Mensch-C_{kappa}-Antikörper, bestätigt. Für Einzelheiten über beide ELISAs vgl. Beispiel 4.4.

4.3: Konstruktion von zwei M79scFv-CD86-Heterominikörper-Ausführungsformen

[0182] Die CD86-Heterominikörper wurden konstruiert, indem der extrazelluläre Teil von CD80 innerhalb der in Beispiel 1 beschriebenen Heterominikörper durch denjenigen von CD86 ersetzt wurde (**Fig. 1**). Die Konstruktionsstrategie wird nachstehend beschrieben.

4.3.1: Konstruktion des M79scFvCH1/CD86CK-Heterominikörers

[0183] Das co-stimulierende Protein CD86, auch bekannt als B7-2, gehört zur Ig-Superfamilie. Es ist ein stark glycosyliertes Protein aus 306 Aminosäuren. Eine ausführlichere Beschreibung wurde durch Freeman G. J. et al., *Science* 262 (1993), 909–911, veröffentlicht. Die cDNA-Matrize wurde durch reverse Transkription der Gesamt-RNA aus der Burkitt-Lymphom-Zelllinie Raji erhalten. Um die extrazelluläre Domäne von CD86 zu amplifizieren, wurden spezifische 5'- und 3'-Primer verwendet (5'-B7-2: 5'-AAG TCT AGA AAA TGG ATC CCC AGT GCA CTA TG-3; 3'-B7-2: 5'-AAT TCC GGA TGG GGG AGG CTG AGG GTC CTC AAG C-3'). Diese Primer führen auch XbaI- und BspEI-Spaltstellen ein, die zur Clonierung des CD86-PCR-Fragments in den Vektor Bluescript KS-CTI-M79scFv verwendet wurden. Das weitere Clonierungs- und Expressionsverfahren entsprach dem in Beispiel 1 beschriebenen, außer daß XbaI anstelle von EcoRI aufgrund einer internen EcoRI-Stelle innerhalb des CD86-DNA-Fragments verwendet wurde. Für die schließlich erhaltenen doppelt transfizierten CHO-Zellen (pEF-ADA-M79scFvCH1, pEF-DHFR-CTI-CD86-CK) wurde gezeigt, daß sie den CD86-Heterominikörper in das Zellkulturmedium sezernieren.

4.3.2: Konstruktion des M79scFvCK/CD86CH1-Heterominikörpers

[0184] Eine andere Ausführungsform des CD86-Heterominikörpers wurde konstruiert, indem das M79scFv- und das CD58-Fragment gegeneinander ausgetauscht wurden (**Fig. 1**). Zu diesem Zweck wurden die zwei Expressionsplasmide pEF-DHFR-CTI-CD86-CK und pEF-ADA-M79scFvCH1 mit NdeI bzw. BspEI gespalten. Das CD86 enthaltende Fragment wurde in das pEF-ADA-Vektorfragment cloniert, das CH1 enthält. Das erhaltene Expressionsplasmid pEF-ADA-CD86-CH1 (**Fig. 3**) wurde in CHO-Zellen eingeschleust, die bereits mit pEF-DHFR-M79scFv-CK transfiziert worden waren, wie in Beispiel 1 beschrieben. Die doppelt transfizierten CHO-Zellen (pEF-DHFR-M79scFv-CK, pEF-ADA-CD86-CH1; **Fig. 3**) wurden zur Selektion gezüchtet, wie in Beispiel 1 beschrieben.

Beispiel 4.3.3: ELISA mit Zellkulturüberständen der CD86-Heterominikörper

[0185] Um die 17-1A-Bindungsspezifität der CD86-Heterominikörper-Ausführungsformen zu untersuchen und um die richtige Zusammenlagerung von CH1 und CK zu bestätigen, wurden zwei unterschiedliche ELISAs ausgeführt. Die spezifische Bindung an das 17-1A-Antigen und die heterodimere Struktur der Heterominikörper wurden durch Inkubation des Kulturüberstands mit einem immobilisierten rekombinanten 17-1A-Antigen und durch Nachweis der gebundenen CD86-Heterominikörper mit einem anti-CD86-Antikörper gezeigt. Die heterodimere Struktur der Heterominikörper wurde weiterhin durch Inkubation des Kulturüberstands mit einem immobilisierten anti-His-Marker-Antikörper, gefolgt durch einen Nachweisschritt mit einem anti-Mensch-C_{kappa}-Antikörper, bestätigt. Für Einzelheiten über beide ELISAs vgl. Beispiel 4.4 und **Fig. 9** und **10**.

Beispiel 4.4: ELISA mit Zellkulturüberständen von M79scFv-Heterominikörpern

[0186] Zwei unterschiedliche ELISAs mit Zellkulturüberständen wurden für jeden M79scFv-Heterominikörper ausgeführt:

[0187] Die Bindung an das 17-1A-Antigen wurde unter Verwendung eines rekombinanten 17-1A-Antigens untersucht, das durch stabile Expression in CHO-Zellen erhalten wurde, wie beschrieben (Mack et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995), 7021–7025). Das rekombinante Antigen besteht aus den ersten 264 Aminosäuren des nativen 17-1A-Antigens, auch bekannt als GA 733-2 (Scala, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990), 3542–3546), gefolgt durch ein Stoppcodon. Das Antigen wurde an U-Boden-ELISA-Platten mit 96 Vertiefungen (Nunc Maxisorb) in einer Konzentration von 50 µg/ml in phosphatgepufferter Salzlösung, PBS, immobilisiert. Die Beschichtung wurde bei 4°C für 12 Stunden mit 50 µl ausgeführt, gefolgt durch das einmalige Waschen mit PBS, 0,05% Tween. Der ELISA wurde dann für 1 Stunde mit PBS/3% Rinderserumalbumin (BSA) blockiert und wiederum gewaschen. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand unverdünnt und in mehreren Verdünnungen zugegeben und für 2 Stunden inkubiert. Der spezifische Nachweis war abhängig von der An der co-stimulierenden Proteine, die mit den verschiedenen Heterominikörper-Ausführungsformen assoziiert sind. Für

spezifische Antikörper und Arbeitsverdünnungen vgl. Tabelle 1. Nach dreimaligem Waschen mit PBS, 0,05% Tween-20 wurde ein Peroxidase-konjugierter, polyclonaler Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper (Fc-spezifisch) zugegeben und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS, 0,05% Tween-20 wurde der ELISA schließlich durch Zugabe der folgenden Substratlösung entwickelt: 22 mg ABTS (2,2-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-Diammoniumsalz) wurden in 10 ml 0,1 M Citratpuffer, pH 5,1, enthaltend 2,3 mg Natriumperborattetrahydrat, gelöst. Für negative Kontrollen wurden die Platten mit PBS anstelle der Kulturüberstände inkubiert. Der farbige Niederschlag wurde unter Verwendung eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen (**Fig. 9**). Die in **Fig. 9** dargestellten Ergebnisse zeigen eindeutig, daß jeder der konstruierten M79scFV-Heterominikörper als ein voll funktionales Heterodimer im Überstand der entsprechenden Transfektanten nachgewiesen werden konnte.

[0188] Für den zweiten ELISA wurden Platten mit 96 Vertiefungen mit einem anti-His-Marker-Antikörper (Dianova, Hamburg; Kat. Nr. DIA 910), 1 : 40 verdünnt, beschichtet, wie vorstehend beschrieben. Die Überstände aller Heterominikörper-Ausführungsformen wurden rein und in mehreren Verdünnungen zugegeben. Ein biotinylierter anti-Mensch-C_{kappa}-Antikörper, gefolgt durch Peroxidase-konjugiertes Streptavidin (1 : 1000) (Dako, Hamburg; Kat. Nr. P0347), wurden zum Nachweis der gebundenen Heterominikörper verwendet (vgl. Tabelle 1). Der ELISA wurde entwickelt, wie vorstehend beschrieben. Für Ergebnisse vgl. **Fig. 10**.

Beispiel 5: Stimulierung von naiven CD4⁺CD45RO⁻-T-Zellen durch den M79scFvCK/CD80-CH1-Heterominikörper

Beispiel 5.1: Reinigung von naiven CD4⁺CD45RO⁻-T-Zellen aus dem peripheren Blut von gesunden menschlichen Blutspendern

[0189] Um die biologische Funktion des M79scFvCK/CD80CH1-Heterominikörpers zu untersuchen, wurde ein CD4⁺-T-Zell-Stimulierungsexperiment durchgeführt. CD4⁺CD45RO⁻-T-Zellen, die gewöhnlich als naiv angesehen werden, wurden aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern durch negative Selektion isoliert. Zuerst wurden einkernige Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) durch einen Ficoll-Dichtegradienten isoliert (Current Protocols of Immunology, Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach und Strober, Wiley-Interscience, 1992). Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), supplementiert mit 2% fötalem Kälberserum (FCS), wurden CD4⁺-T-Zellen unter Verwendung von im Handel erhältlichen CD4⁺-T-Zell-Säulen (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; Kat. Nr. HCD43) gereinigt. Im nächsten Schritt wurden CD45RO⁺-T-Zellen durch paramagnetische Dynabeads M450 (Dyna, Hamburg; Kat. Nr. 110.02) entfernt. Zu diesem Zweck wurden CD4⁺-T-Zellen für 30 Minuten mit dem murinen anti-Mensch-CD45RO⁺-Antikörper (UHCL-1) in einer Konzentration von 10 µg/ml inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen und danach weitere 30 Minuten mit magnetischen Kügelchen inkubiert, die mit dem Schaf-anti-Maus-IgG1-Antikörper M450 konjugiert waren. Die quantitativ an die magnetischen Kügelchen gebundenen CD4⁺CD45RO⁺-T-Zellen wurden dann durch die Anwendung eines Magneten entfernt. Die restlichen Zellen waren CD4⁺ und CD45RO⁻ mit einer Reinheit von 98%, wie mittels Durchflußcytometrie bestätigt wurde.

Beispiel 5.2: Stimulierung von naiven CD4⁺CD45RO⁻-T-Zellen durch gleichzeitige Inkubation mit dem M79scFvCK/CD80CH1-Heterominikörper und/oder dem bispezifischen, einkettigen Antikörper M79scFv-antiCD3scFv

[0190] CD4⁺CD45RO⁻-T-Zellen wurden gereinigt, wie vorstehend beschrieben. Die Stimulierung wurde in Flachboden-TPP-Platten mit 96 Vertiefungen durchgeführt. Der Stimulierungstest wurde wie folgt ausgeführt. 17-1A-transfizierte CHO-Zellen wurden als Stimulatorzellen verwendet. Diese 17-1A-transfizierte Zelllinie wurde erzeugt, indem ein DNA-Fragment, das die vollständige Aminosäuresequenz des 17-1A-Antigens codiert, auch bekannt als GA733-2 (Scala, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 3542–3546), in den eukaryontischen Expressionsvektor pEF-DHFR gemäß Standardverfahren (Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)) subcloniert wurde. Die Linearisierung des erhaltenen Plasmids mit dem Restriktionsenzym NdeI und die nachfolgende stabile Transfektion in DHFR-defiziente CHO-Zellen wurden durchgeführt, wie in Beispiel 1.1.1 beschrieben. Die Expression von Transmembran-17-1A wurde durch eine Genamplifikation erhöht, die durch die schrittweise Zugabe von ansteigenden Konzentrationen des DHFR-Inhibitors Methotrexat (MTX) bis zu einer Endkonzentration von 500 nM induziert wurde, wobei die Konzentrationsschritte zwischen 20 nM und 100 nM lagen (Kaufman, Methods Enzymol. 185 (1990), 537–566).

[0191] Diese Zellen wurden auf eine Membranexpression von 17-1A mittels Durchflußcytometrie unter Verwendung des 17-1A-spezifischen monoklonalen Antikörpers M79 (Göttlinger, Int. J. Cancer 38 (1986), 47–53) in einer Konzentration von 10 µg/ml, gefolgt durch einen polyclonalen Ziege-anti-Maus-IgG+IgM-(H + L)-Antikörper, 1 : 100 in PBS verdünnt, getestet. Als negative Kontrolle wurden untransfizierte CHO-Zellen verwendet,

während die 17-1A-positive menschliche Magenkrebs-Zelllinie Kato, erhalten von der ATCC, als positive Kontrolle diente. Die Ergebnisse sind in **Fig. 11** gezeigt.

[0192] Vor der Verwendung dieser Zellen zur T-Zell-Stimulierung wurden sie mit 14.000 Rad bestrahlt, zweimal in PBS, 2% FCS gewaschen, gezählt, in Medium verdünnt (für Einzelheiten vgl. nachstehend) und in Platten mit 96 Vertiefungen in einer Anzahl von 25.000 Zellen pro Vertiefung überimpft. 50.000 CD4⁺CD45RO⁻-T-Zellen wurden zu jeder Vertiefung zugegeben, wobei ein T-Zellen/Stimulatorzellen-Verhältnis von 2 : 1 erhalten wurde. Der M79scFvCK/CD80CH1-Heterominikörper und/oder der bispezifische, einkettige Antikörper M79scFv-antiCD3scFv wurden in mehreren Konzentrationen zugegeben, wie angegeben (Tabelle 2). Die Zellen wurden in RPMI-1640-Medium, supplementiert mit 10% menschlichem AB-Serum, 100 E/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin, 20 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 10 mM HEPES-Puffer und 50 µM Mercaptoethanol, bei 37°C bei 6% CO₂ und 100% Feuchtigkeit für bis zu 12 Tage gezüchtet.

5.3: BrdU-Proliferationstest

[0193] Um die Proliferationskinetik von CD4⁺CD45RO⁻-T-Zellen zu messen, die gleichzeitig mit dem M79scFvCK/CD80CH1-Heterominikörper und dem bispezifischen, einkettigen Antikörper M79scFv-antiCD3scFv stimuliert worden waren oder mit dem bispezifischen, einkettigen Antikörper allein stimuliert worden waren, wurde ein BrdU-Proliferationstest durchgeführt. Für Einzelheiten vgl. die Produktbeschreibung von Boehringer Mannheim; Kat. Nr. 1647229. Die in **Fig. 12** dargestellten Ergebnisse zeigen deutlich eine wesentlich erhöhte Zellproliferation, induziert durch den Heterominikörper plus den bispezifischen, einkettigen Antikörper, verglichen mit derjenigen, die durch den bispezifischen Antikörper allein induziert wurde.

5.4: Durchflußcytometrische Analyse von CD4⁺CD45RO⁻-T-Zellen, stimuliert mit dem M79scFvCK/CD80CH1-Heterominikörper und/oder dem bispezifischen, einkettigen Antikörper M79scFv-antiCD3scFv

[0194] Die CD45RO- und CD45RA-Expressionsraten auf stimulierten T-Zellen wurden mittels Durchflußcytometrie (FACS-SCAN, Becton Dickinson) am Tag 3 und 6 des Stimulierungsexperiments untersucht. Stimulierte T-Zellen sowie Kontrollen (vgl. Beispiel 5.1) wurden für 30 Minuten mit verschiedenen Kombinationen der in Tabelle 4 aufgeführten Antikörper induziert.

[0195] Die T-Zellen wurden mit den folgenden drei Antikörperkombinationen inkubiert: anti-CD45RO-FITC/anti-CD45RA-PE; anti-CD45RO-FITC/Isotyp-IgG1-PE; und anti-CD45RA-PE/Isotyp-IgG2a-FITC. Der Prozentsatz der gepimten T-Zellen, die auf den Oberflächenphänotyp CD45RO⁺/CD45RA⁻ in Abhängigkeit von den Konzentrationen des Heterominikörpers und des bispezifischen Antikörpers umschalteten, ist in den **Fig. 13** und **14** entsprechend einer Stimulierungsdauer von 3 bzw. 6 Tagen gezeigt. Das Endergebnis der T-Zell-Stimulierung nach 6 Tagen ist auch in **Fig. 33** gezeigt.

5.5: INF-γ-ELISA-Analyse des Zellkulturüberstands von stimulierten CD4⁺-T-Zellen

[0196] Um das in vitro-Priming von CD4⁺-T-Zellen durch die Kombination eines Heterominikörpers und eines bispezifischen, einkettigen Antikörpers zu bestätigen, wurde die INF-γ-Konzentration in dem T-Zell-Kulturüberstand unter Verwendung eines halbquantitativen INFγ-ELISA (Genzyme DuoSet, Genzyme Diagnostics Cambridge, MA, USA; Kat. Nr. 80-3932-00) bestimmt, der gemäß dem Benutzerhandbuch des Herstellers durchgeführt wurde. Da INF-γ typischerweise durch gepimte TH1-Zellen, aber nicht durch naive CD4⁺-T-Zellen sezerniert wird, zeigen die in den **Fig. 15** und **16** dargestellten Ergebnisse, daß ein T-Zell-Priming in Gegenwart von sowohl des Heterominikörpers als auch des bispezifischen, einkettigen Antikörpers, aber nicht mit dem bispezifischen Antikörper allein stattgefunden hat. Außerdem deutet die Sekretion von INF-γ durch die gepimten CD4⁺-T-Zellen stark auf die Differenzierung dieser Zellen zum TH1-Phänotyp hin.

Beispiel 5.6: IL-S-ELISA-Analyse des Zellkulturüberstands von stimulierten CD4⁺-T-Zellen

[0197] Ein zweiter ELISA wurde durchgeführt, um die IL-S-Sekretion von stimulierten CD4⁺-T-Zellen zu untersuchen. Jedoch wurde durch den IL-S-ELISA (Genzyme DuoSet, Genzyme Diagnostics Cambridge, MA, USA; Kat. Nr. 80-5025-00) des T-Zell-Kulturüberstands keine IL-S-Sekretion nachgewiesen, wie in den **Fig. 17** und **18** dargestellt. Da IL-5 typischerweise durch gepimte CD4⁺-T-Zellen des TH2-Phänotyps sezerniert wird, wurde gezeigt, daß die kombinierte T-Zell-Stimulierung durch den M79scFvCK/CD80CH1-Heterominikörper und den bispezifischen, einkettigen Antikörper M79scFv-antiCD3scFv überhaupt kein Priming von TH2-T-Zellen induziert.

Beispiel 5.7: IL-4-ELISA-Analyse des Zellkulturüberstands von stimulierten CD4⁺-T-Zellen

[0198] Entsprechend zu der in Beispiel 5.6 beschriebenen IL-5-Analyse wurden T-Zell-Kulturüberstände durch einen ELISA (Pharmingen; Kat. Nr. 2629KI) auf die Anwesenheit von IL-4 untersucht, ein anderes Cytokin, das typischerweise durch geprimte CD4⁺-T-Zellen des TH2-Phänotyps sezerniert wird. Da kein IL-4 nachgewiesen werden konnte, wurde bestätigt, daß die Stimulierung von naiven CD4⁺-T-Zellen mit dem M79scFvCK/CD80CH1-Heterominikörper und dem bispezifischen, einkettigen Antikörper M79scFv-antiCD3scFv kein Priming von TH2-T-Zellen induziert.

Beispiel 6: Co-Stimulierung von CD8⁺CD45RO⁻-T-Zellen durch den M79scFvCK/CD80-CH1-HeterominikörperBeispiel 6.1: Reinigung von naiven CD8⁺CD45RO⁻-T-Zellen aus dem peripheren Blut von gesunden menschlichen Spendern

[0199] Um die biologische Funktion des M79scFvCK/CD80CH1-Heterominikörpers zu untersuchen, wurde ein CD8⁺-T-Zell-Stimulierungsexperiment durchgeführt. CD8⁺CD45RO⁻-T-Zellen, die gewöhnlich als naiv angesehen werden, wurden aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern durch negative Selektion isoliert. Zuerst wurden einkernige Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) durch einen Ficoll-Dichtegradienten isoliert (Current Protocols of Immunology, Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach und Strober, Wiley-Interscience, 1992). Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), supplementiert mit 2% fötalem Kälberserum (FCS), wurden CD8⁺-T-Zellen unter Verwendung von im Handel erhältlichen CD8⁺-T-Zell-Säulen (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; Kat. Nr. HCD8C-1000) gereinigt. Zusätzlich zu dem Protokoll des Herstellers wurde 1 µg/ml eines murinen anti-Mensch-CD11b-Antikörpers zu dem bereitgestellten Antikörper-Cocktail zugegeben, um die Suppressor-T-Zellen zu entfernen, die CD11b⁺/CD28⁻ sind. Im nächsten Schritt wurden CD45RO⁺-T-Zellen durch paramagnetische Dynabeads M450 (Dyna, Hamburg; Kat. Nr. 110.02) entfernt. Zu diesem Zweck wurden CD8⁺-T-Zellen für 30 Minuten mit dem murinen anti-Mensch-CD45RO⁺-Antikörper (UHCL-1) in einer Konzentration von 10 µg/ml inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen und danach weitere 30 Minuten mit magnetischen Kügelchen inkubiert, die mit dem Schaf-anti-Maus-IgG1-Antikörper M450 konjugiert waren. Die quantitativ an die magnetischen Kügelchen gebundenen CD8⁺CD45RO⁺-T-Zellen wurden dann durch die Anwendung eines Magneten entfernt. Die restlichen Zellen waren CD8⁺CD45RO⁻CD28⁺ mit einer Reinheit von 95–98%.

Beispiel 6.2: Stimulierung von naiven CD8⁺CD45RO⁻-T-Zellen durch gleichzeitige Inkubation mit dem M79scFvCK/CD80CH1-Heterominikörper und/oder dem bispezifischen, einkettigen Antikörper M79scFv-antiCD3scFv

[0200] CD8⁺CD45RO⁻-T-Zellen wurden, wie in Beispiel 5 beschrieben, unter Verwendung der in Tabelle 3 gezeigten Konstruktkonzentrationen stimuliert.

[0201] Der BrdU-Proliferationstest sowie die FACS-Analyse wurden durchgeführt, wie in Beispiel 5 beschrieben. Für Ergebnisse vgl. **Fig.** 19, 20, 21 und 34.

Beispiel 6.3: TNF-α-ELISA-Analyse des Zellkulturüberstands von stimulierten CD8⁺-T-Zellen

[0202] Um das in vitro-Priming von CD8⁺-T-Zellen durch die Kombination eines Heterominikörpers und eines bispezifischen Antikörpers zu bestätigen, wurde die TNF-α-Konzentration in dem T-Zell-Kulturüberstand unter Verwendung eines halbquantitativen TNF-α-ELISA (Genzyme DuoSet, Genzyme Diagnostics Cambridge, MA, USA; Kat. Nr. 80-3932-00) bestimmt, der gemäß dem Benutzerhandbuch des Herstellers durchgeführt wurde. Da TNF-α typischerweise durch geprimte, aber nicht durch naive CD8⁺-T-Zellen sezerniert wird, zeigen die in **Fig.** 22 dargestellten Ergebnisse, daß ein T-Zell-Priming in Gegenwart von sowohl des Heterominikörpers als auch des bispezifischen Antikörpers, aber nicht mit dem bispezifischen Antikörper allein stattgefunden hat.

Beispiel 6.4: Cytotoxische Aktivität von in vitro-geprimten CD8⁺-T-Lymphocyten

[0203] Während des Priming-Prozesses erwerben anfänglich naive CD8⁺-T-Zellen üblicherweise die Fähigkeit, eine Zielzellen-Cytotoxizität in einer CD80 (B7-1)-unabhängigen Weise zu vermitteln. Die CD80 (B7-1)-Unabhängigkeit ist folglich ein hervorragender biologischer Marker für geprimte T-Zellen. Daher wurden anfänglich naive CD8⁺CD11b⁻CD45RO⁻-T-Zellen, die für 6 Tage geprimt worden waren, wie in Beispiel 6.2 beschrieben, als Effektorzellen in einem ⁵¹Cr-Freisetzungstest verwendet. Die T-Zell-Cytotoxizität wurde durch den bispezifischen, einkettigen Antikörper M79scFv-antiCD3scFv auf 17-1A-positive Kato-Zellen umgelenkt. Wie in **Fig.** 35 dargestellt, zeigte sich, daß in vitro-geprimte CD8⁺-T-Zellen eine starke Cytotoxizität gegen Ka-

to-Zellen in einem 20-stündigen ^{51}Cr -Freisetzungstest zeigen, welche selbst die cytotoxische Aktivität von frischen PBMCs übersteigt. Im Gegensatz dazu zeigten naive CD8^+ -T-Zellen keine signifikanten cytotoxischen Wirkungen. Wie aufgrund der CD80 (B7-1)-Unabhängigkeit erwartet, zeigten in vitro geprinte CD8^+ -T-Zellen keine erhöhte umgelenkte Cytotoxizität in Gegenwart des Heterominikörpers M79scFvCK- CD80CH1 . Folglich konnte das Priming von naiven CD8^+ -T-Zellen durch den Heterominikörper M79scFvCK/ CD80CH1 in Kombination mit einem geeigneten primären Signal zusätzlich zur Veränderung des CD45RA/RO -Phänotyps und der Cytokinsekretion durch einen dritten Parameter eindeutig nachgewiesen werden. Der ^{51}Cr -Freisetzungstest wurde ausgeführt, wie durch Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021–7025, beschrieben.

Beispiel 7: Heterominikörper M79scFvCK-antiCD3scFv/ CD80CH1

[0204] Eine andere Ausführungsform des CD80 -Heterominikörpers, dargestellt in **Fig. 23**, wurde durch Addition eines antiCD3scFv-Fragments über einen $\text{Glycin}_4\text{Serin}_1$ -Linker an den C-Terminus der M79scFvCK-Polypeptidkette konstruiert, wie in Beispiel 1 beschrieben. Zu diesem Zweck wurde das DNA-Fragment, welches diese Polypeptidkette codiert, aus dem in Beispiel 1 beschriebenen Expressionsplasmid pEF-DHFR-M79scFvCK ausgeschnitten und in den Vektor pMa (Stanssens, Nucleic Acids Res. 17 (1998), 441–4454) unter Verwendung der Restriktionsenzyme EcoRI und Sall (Boehringer Mannheim) subcloniert. Das anti- CD3scFv -Fragment wurde mit der DNA-Matrize, die den bispezifischen, einkettigen Antikörper M79scFv-antiCD3scFv codiert, beschrieben durch Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021–7025, unter Verwendung der folgenden Primer mittels PCR amplifiziert. Der 5'-Primer VHTR66CKSAC (5'-CCT GAG CTC GCC CGT CAC AAA GAG CTT CAA CAG GGG AGA GTG TGG AGG TGG TGG ATC CGA TAT C-3') führte eine SacI-Stelle ein, und der 3'-Primer VLTR66SallNotXba führte die Spaltstellen Sall, NotI und Xba ein (5'-ATT CTA GAG CGG CCG CGT CGA CTA TTT CAG CTC CAG CTT GGT CCC AGC-3'). Das erhaltene PCR-Fragment wurde gemäß Standardverfahren (Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)) unter Verwendung der Restriktionsenzym-Spaltstellen SacI und Xba (Boehringer Mannheim) in den pMa-Vektor cloniert. Im letzten Schritt wurde das gesamte M79scFvCK-antiCD3scFv-Fragment, dargestellt in **Fig. 32**, mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Sall aus dem pMa-Vektor ausgeschnitten und in den eukaryontischen Expressionsvektor pEF-DHFR, beschrieben durch Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021–7025, subcloniert. Das erhaltene Expressionsplasmid wurde in DHFR-defiziente CHO-Zellen transfiziert, bevor diese mit dem Expressionsplasmid pEF-ADA- CD80-CH1 , beschrieben in Beispiel 1, transfiziert wurden. Die doppelte Transfektion und die Selektion der CHO-Zellen sowie die Herstellung und die Reinigung des Heterominikörpers wurden ausgeführt, wie in Beispiel 1 beschrieben.

[0205] Um die Bindung des Heterominikörpers M79scFvCK-antiCD3scFv/ CD80CH1 an das 17-1A-Antigen zu zeigen und um das Vorhandensein eines richtig gefalteten CD80 sowie die heterodimere Struktur des Heterominikörpers zu bestätigen, wurde ein ELISA mit Zellkulturüberständen nach der primären Selektion und nach dem ersten Genamplifikationsschritt ausgeführt. Ein rekombinantes 17-1A-Antigen wurde immobilisiert, und der gebundene Heterominikörper wurde mit einem anti- CD80 -Antikörper nachgewiesen, wie in Beispiel 1.2.3 beschrieben. Die Ergebnisse sind in **Fig. 40** gezeigt.

[0206] Die Erhöhung der Expressionsrate infolge einer Genamplifikation wurde auch durch einen ELISA überwacht. Dafür wurde ein rekombinantes 17-1A-Antigen immobilisiert und mit dem Kulturüberstand inkubiert, der den Heterominikörper M79scFvCK-anti- CD3scFv/CD80CH1 enthält, und der gebundene Heterominikörper wurde mit einem Peroxidase-konjugierten anti-His-Marker-Antikörper (Roche; Kat. Nr. 1965085), 1 : 500 verdünnt, nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in **Fig. 41** gezeigt. Das allgemeine ELISA-Verfahren wurde durchgeführt, wie in Beispiel 4.4 beschrieben.

[0207] Die Wechselwirkung des C-terminal angeordneten scFv-Fragments mit CD3 auf menschlichen T-Zellen wurde mittels Durchflußcytometrie bestätigt. Zu diesem Zweck wurden CD11b -positive CD8^+ -T-Zellen isoliert, da diese T-Zell-Untergruppe bekanntermaßen CD28 -negativ ist. Die Isolierung der CD11b -positiven CD8^+ -T-Zellen wurde mit im Handel erhältlichen CD8^+ -T-Zell-Säulen ausgeführt, wie in Beispiel 6.1 beschrieben, außer daß kein CD11b -Antikörper zu dem Antikörper-Cocktail des Herstellers zugegeben wurde. Im nächsten Schritt wurden CD11b -positive T-Zellen durch paramagnetische Dynabeads M450 (DynaL, Hamburg; Kat. Nr. 110.02) positiv selektiert. Zu diesem Zweck wurden CD8^+ -T-Zellen für 30 Minuten mit einem murinen anti-Mensch- CD11b -Antikörper in einer Konzentration von $10\ \mu\text{g/ml}$ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen und danach weitere 30 Minuten mit magnetischen Kügelchen inkubiert, die mit einem Schafanti-Maus-IgG-Antikörper konjugiert waren. Die an die magnetischen Kügelchen gebundenen CD11b -positiven CD8^+ -T-Zellen wurden dann durch die Anwendung eines Magneten isoliert, und anschließend wurde durch eine übliche Durchflußcytometrie bestätigt, daß sie weder CD28 noch CTLA-4 exprimieren. Die CD11b -positiven CD8^+ -T-Zellen wurden dann für 30 Minuten auf Eis mit dem gereinigten Heterominikörper M79scFvCK-antiCD3scFv/ CD80CH1 in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Nach Waschen in PBS wurden die Zellen mit einem FITC-konjugierten anti-Mensch- C_{kappa} -Antikörper (Coulter; Kat. Nr. 660287), 1 : 10

verdünnt, inkubiert, wiederum in PBS gewaschen und anschließend einer Durchflußcytometrie unterzogen. Die in **Fig. 42** dargestellten Ergebnisse zeigen eindeutig die Bindung des Heterominkörpers an menschliches CD3 auf T-Zellen, da beide Rezeptorgegenstücke von CD80 in der besonderen T-Zell-Untergruppe fehlen, die in diesem Experiment verwendet wurde. Diese Ergebnisse veranschaulichen außerdem die Funktionalität eines Polypeptids mit einer Rezeptor- oder Ligandenfunktion, wenn es in einer C-terminalen Position innerhalb eines Heterominkörpers angeordnet ist.

[0208] Ein zweites antiCD3scFv-Derivat des Heterominkörpers M79scFvCK/CD80CH1 wurde durch Insertion eines PCR-DNA-Fragments, welches das antiCD3scFv-Fragment des bispezifischen, einkettigen Antikörpers (bscAb) M79scFv-antiCD3scFv codiert, beschrieben durch Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021–7025, in die BspEI-Restriktionsstelle des Expressionsplasmids pEF-DHFR-M79scFv-CK erhalten (vgl. Beispiel 1.2.1). Das antiCD3scFv-Fragment wurde mit der DNA-Matrize, die bscAbM79scFv-antiCD3scFv codiert, unter Verwendung des 5'-Primers VHTR66BspEI (5'-GTC ACC GTC TCC TCC GGA G-3') und des 3'-Primers VLTR66BspEI (3'-GTG TCC GGA TTT CAG CTC CAG CTT GGT CC-3') mittels PCR amplifiziert und vor der Clonierung in pEF-DHFR-M79scFv-CK mit BspEI gespalten. Die richtige Orientierung des clonierten Fragments wurde unter Verwendung des 5'-Primers VHTR66BspEI (5'-GTC ACC GTC TCC TCC GGA G-3'), der unmittelbar stromaufwärts der M79scFv-DNA-Sequenz innerhalb des Expressionsvektors pEF-DHFR hybridisiert, und des Primers 3'-Hinge-Sequenz (5'-GGT GTG GGT GTC ACC-3') mittels PCR überprüft. Das erhaltene Expressionsplasmid pEF-DHFR-bscAbM79scFvantiCD3scFv-CK (vgl. **Fig. 44**) wurde zusammen mit dem Expressionsplasmid pEF-ADA-CD80-CH1 in CHO-Zellen transfiziert, wie in Beispiel 1.2.1 beschrieben. Es ist bemerkenswert, daß in diesem Fall das Polypeptid mit einer Rezeptor- oder Ligandenfunktion, fusioniert an den N-Terminus der C_{kappa} Domäne des erhaltenen Heterominkörpers (vgl. **Fig. 43**), mit dem bispezifischen, einkettigen Antikörper M79scFvantiCD3scFv (Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021–7025) identisch ist. Die Genamplifikation sowie die Herstellung und Reinigung des Heterominkörpers wurden ausgeführt, wie in Beispiel 1.2.2 beschrieben.

[0209] Um die richtige Faltung des CK-Arms des Heterominkörpers bscAbM79scFvantiCD3scFv-CK/CD80CH1 sowie die heterodimere Struktur des rekombinanten Moleküls zu bestätigen, wurde die Bindung an ein immobilisiertes 17-1A-Antigen durch einen ELISA nachgewiesen, der mit Zellkulturüberständen nach der primären Selektion und nach dem ersten Genamplifikationsschritt ausgeführt wurde. Der gebundene Heterominkörper wurde mit einem Peroxidase-konjugierten anti-His-Marker-Antikörper (Roche; Kat. Nr. 1965085), 1 : 500 verdünnt, nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in **Fig. 45** gezeigt. Das allgemeine ELISA-Verfahren wurde durchgeführt, wie in Beispiel 4.4 beschrieben.

[0210] Um das Vorhandensein eines richtig gefalteten CD80 innerhalb des Heterominkörpers bscAbM79scFv-antiCD3scFv-CK/CD80CH1 zu bestätigen, wurde der folgende ELISA mit Zellkulturüberständen nach der primären Selektion und nach dem ersten Genamplifikationsschritt ausgeführt:

[0211] Ein monoklonaler Antikörper gegen menschliches CD80 (Immunotech; Kat. Nr. 1449), 1 : 200 verdünnt, wurde an eine ELISA-Platte immobilisiert, gefolgt durch die Inkubation mit Zellkulturüberständen. Anschließend wurde der mit dem anti-CD80-Antikörper abgefangene Heterominkörper mit einem Peroxidase-konjugierten anti-His-Marker-Antikörper (Roche; Kat. Nr. 1965085), 1 : 500 verdünnt, nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in **Fig. 46** gezeigt. Das allgemeine ELISA-Verfahren wurde durchgeführt, wie in Beispiel 4.4 beschrieben.

[0212] Zusammenfassend veranschaulichen diese Ergebnisse, daß die Heterominkörper-Anordnung auch Polypeptide mit komplexeren Proteinstrukturen und/oder einer komplexeren Rezeptor- oder Ligandenfunktion, wie z. B. bispezifische, einkettige Antikörper, tragen können.

Beispiel 8: CD80-M79scFv-Konstrukte

8.1: CD80-M79scFv-(VL/VH)-Konstrukt mit einem kurzen (Gly₄Ser₁)₁-Linker

[0213] Ein Protein wurde konstruiert, das aus dem einkettigen Fv-Fragment (scFv) des murinen anti-17-1A-Antikörpers M79 und dem extrazellulären Teil des co-stimulierenden menschlichen Proteins CD80 (B7-1), verknüpft über einen (Gly₄Ser₁)₁-Linker, besteht (**Fig. 24**). Der M79-Antikörper wurde erhalten, wie durch Göttlinger et al., Int. J. Cancer 38 (1986), 47–53, beschrieben. Das M79-scFv-Fragment wurde cloniert, wie durch Mack et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021–7025, beschrieben. Das vollständige Plasmid wurde in mehreren Schritten cloniert. Zuerst wurde ein als CTI bezeichneter Polylinker unter Verwendung der Restriktionsenzym-Spaltstellen XbaI und Sall (Boehringer Mannheim) in den Bluescript KS-Vektor (GenBank®-Hinterlegungsnummer X52327) inseriert. Die Einführung des Polylinkers CTI stellte zusätzliche Spaltstellen bereit, sowie die Sequenz, die den (Gly₄Ser₁)₁-Linker, einen Marker aus 6 Resten der Aminosäure Histidin und ein Stoppcodon codiert, wie in **Fig. 2** gezeigt. Der Vektor Bluescript KS+CTI wurde durch Spaltung mit den Restriktionsenzymen EcoRV und XmaI (Boehringer Mannheim und New England Biolabs) präpariert, um ihn mit dem M79scFv-Fragment zu ligieren (T4-DNA-Ligase, Boehringer Mannheim), das mit EcoRV und

BspEI gespalten worden war. Der erhaltene Vektor Bluescript KS+CTI+M79scFv wurde noch einmal mit EcoRI (Boehringer Mannheim) und BspEI gespalten, um das CD80-DNA-Fragment zu inserieren, das vorher unter Verwendung derselben Enzyme hergestellt wurde. Vor der Subclonierung wurde das CD80-Fragment mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung von spezifischen Oligonucleotidprimern erhalten, die komplementär sind zu den 5'- und 3'-Enden der Nucleotidsequenz, die den extrazellulären Teil von CD80 codiert (Freeman G. J. et al., *J. Immunol.* 143 (1989), 2714–2722). Diese Primer führten auch eine EcoRI- und eine BspEI-Spaltstelle ein (5'-CD80-Primer: 5'-GCA GAA TTC ACC ATG GGC CAC ACA CGG AGG CAG-3'; 3'-CD80-Primer: 5'-TGG TCC GGA GTT ATC AGG AAA ATG CTC TTG CTT G-3'). Die für diese PCR verwendete cDNA-Matrize wurde hergestellt durch reverse Transkription der Gesamt-RNA, die aus der Burkitt-Lymphom-Zelllinie Raji gemäß Standardverfahren (Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, (1989)) präpariert wurde.

[0214] Das co-stimulierende CD80-Protein gehört zur Ig-Superfamilie. Es ist ein stark glycosyliertes Protein aus 262 Aminosäuren. Eine ausführlichere Beschreibung wurde durch Freeman G. J. et al., *J. Immunol.* 143 (1989), 2714–2722, veröffentlicht.

[0215] Im letzten Schritt wurde das gesamte CD80-M79scFv-(VL/VH)-DNA-Fragment (**Fig. 25**) durch Spaltung des Vektors Bluescript KS+CTI+CD80+M79scFv-(VL/VH) mit EcoRI und Sall (Boehringer Mannheim) isoliert und anschließend in den eukaryontischen Expressionsvektor pEF-DHFR, beschrieben bei Mack et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995), 7021–7025, cloniert, der das Dihydrofolatreduktase-Gen als Selektionsmarker enthält. Das endgültige Plasmid wurde mit dem Restriktionsenzym NdeI (Boehringer Mannheim) linearisiert und mittels Elektroporation in CHO-Zellen eingeschleust. Die Elektroporationsbedingungen waren 260 V/960 µF unter Verwendung einer BioRad-Gene PulserTM-Vorrichtung. Die stabile Expression wurde in DHFR-defizienten CHO-Zellen durchgeführt, wie durch Kaufmann R. J. et al., *Methods Enzymol.* 185 (1990), 537–566, beschrieben. Die Zellen wurden zur Selektion in Nucleosid-freiem α -MEM-Medium, supplementiert mit 10% dialysiertem FCS und 2 mM, gezüchtet. Zur Herstellung des bifunktionalen CD80-M79scFv-(VL/VH)-Konstrukts wurden die Zellen in Rollerflaschen (Falcon) für 7 Tage in 300 ml Kulturmedium gezüchtet. Das Protein wurde mit Hilfe seines His-Markers, der an den C-Terminus gebunden ist (vgl. **Fig. 24**), unter Verwendung einer Ni-NTA-Säule (Mack et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995), 7021–7025) gereinigt. Um die Bindungseigenschaften zu untersuchen, wurde unterschiedliche ELISAs durchgeführt:

Beispiel 8.1.1: ELISA mit einem Zellkulturüberstand unter Verwendung eines anti-His-Marker-Nachweises

[0216] Die Bindung an das 17-1A-Antigen wurde unter Verwendung eines löslichen 17-1A-Antigens untersucht, welches, wie beschrieben (Mack et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995), 7021–7025), erhalten wurde durch die stabile Expression der DNA-Sequenz, welche die ersten 264 Aminosäuren des nativen 17-1A-Antigens, auch bekannt als GA733-2 (Scala, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990), 3542–3546), gefolgt durch ein Stoppcodon, codiert, in CHO-Zellen. Das Antigen wurde an U-Boden-ELISA-Platten mit 96 Vertiefungen (Nunc Maxisorb) in einer Konzentration von 50 µg/ml in phosphatgepufferter Salzlösung, PBS, immobilisiert. Die Beschichtung wurde bei 4°C für 12 Stunden mit 50 µl, gefolgt durch einen Waschschrift mit PBS, 0,05% Tween, ausgeführt. Der ELISA wurde dann für 1 Stunde mit PBS/3% Rinderserumalbumin (BSA) blockiert und wiederum gewaschen. Nun wurde der Zellkulturüberstand unverdünnt und in mehreren Verdünnungen zugegeben und für 2 Stunden inkubiert. Als Nachweissystem wurden nacheinander ein muriner IgG1-anti-His-Marker-Antikörper (Dianova, Hamburg), 1 : 200 verdünnt, und ein Peroxidase-konjugierter, polyclonaler Ziege-anti-Maus-IgG-(Fc)-Antikörper (Dianova, Hamburg) zugegeben. Der ELISA wurde durch Zugabe einer ABTS-Substratlösung (2,2-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure), Sigma A-1888, Steinheim) entwickelt, wie in Beispiel 2.1 beschrieben. Die Ergebnisse wurden unter Verwendung eines ELISA-Lesegeräts bei 405 nm gemessen. Die Ergebnisse sind in **Fig. 26** gezeigt. Es konnte erkennbar keine Bindungsaktivität gemessen werden. Als negative Kontrollen wurden die Platten mit PBS anstelle der Antikörperkonstrukte inkubiert. Als positive Kontrolle diente der bereits beschriebene (Mack et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995), 7021–7025) bispezifische, einkettige anti-17-1A/anti-CD3-Antikörper.

8.1.2: ELISA mit einem Zellkulturüberstand unter Verwendung eines anti-CD80-Nachweises

[0217] Die Immobilisierung des 17-1A-Antigens, die Blockierung und die Inkubation der Zellkulturüberstände wurden durchgeführt, wie vorstehend beschrieben. Der Nachweis wurde mit einem murinen IgG1-anti-CD80-Antikörper (Dianova, Hamburg), 1 : 1000 verdünnt, gefolgt durch einen Peroxidase-konjugierten, polyclonalen Ziege-anti-Maus-IgG-(Fc)-Antikörper (Dianova, Hamburg), 1 : 5000 verdünnt, ausgeführt. Der ELISA wurde mit einer ABTS-Substratlösung entwickelt, und die OD-Werte wurden gemessen, wie vorstehend beschrieben. Jedoch konnte wieder keine Bindungsaktivität nachgewiesen werden. Als positive Kontrolle wurde der bispezifische, einkettige anti-17-1A/anti-CD3-Antikörper (Mack et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995), 7021–7025) verwendet und mit dem beschriebenen anti-His-Marker-Antikörper nachgewiesen. Die Ergebnisse

sind in **Fig. 27** gezeigt.

8.1.3: ELISA-Analyse eines gereinigten rekombinanten CD80-M79scFv-Konstrukts

[0218] Da die ELISAs mit Zellkulturüberständen zum Nachweis einer spezifischen Antigenbindung alle negativ waren, wurde lösliches CD80-M79scFv mittels Proteinreinigung aus dem Überstand einer Rollerflaschenkultur (300 ml) erhalten, um die Möglichkeit auszuschließen, daß kein rekombinantes Protein in den Überstand sezerniert wurde. Die Reinigung wurde unter Verwendung einer Nickel-NTA-Säule ausgeführt, wie beschrieben (Mack M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021–7025). Die ELISA-Vertiefungen wurden mit dem Protein beschichtet, das aus der Nickel-NTA-Säule eluiert wurde. Der Nachweis des bifunktionalen CD80-M79scFv-Konstrukts wurde unabhängig von seiner 17-1A-Antigen-Bindungsaktivität unter Verwendung von entweder einem anti-His-Marker-Antikörper (vgl. Beispiel 8.1.1) als auch einem anti-CD80-Antikörper (vgl. Beispiel 8.1.2) in verschiedenen Experimenten, gefolgt jeweils durch einen anti-Maus-IgG-(Fc)-Antikörper, durchgeführt. Die Entwicklung des ELISA sowie die Messung der OD-Werte wurden ausgeführt, wie vorstehend beschrieben. Die Ergebnisse sind in **Fig. 28** dargestellt und bestätigen das Vorhandensein des CD80-M79scFv-Konstrukts im Zellkulturüberstand.

8.2: CD80-M79scFv-(VH/VL)-Konstrukt mit einem (Gly₄Ser₁)₁-Linker

[0219] Um die Anordnung der variablen Ig-Regionen innerhalb des M79scFv-Fragments von VL/VH in VH/VL zu verändern, wurde eine zweistufige Fusions-PCR unter Verwendung der Oligonucleotidprimer 5'-VHBSRRV: AGG TGT ACA CTC CGA TAT C(A,C)A (A,G)CT GCA G(G,C)A GTC (A,T)GG; 3'-VHGS 15: 5'-GGA GCC GCC GCC GCC AGA ACC ACC ACC ACC TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CCA G-3'; 5'-VLGS15: 5'-GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT TCT GAC ATT CAG CTG ACC CAG TCT CCA-3'; und 3'-VLBspEI: 5'-AAT CCG GAT TTG ATC TCG AGC TTG GTC CC-3' gemäß dem durch Mack et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021-7025, beschriebenen Verfahren durchgeführt (vgl. auch Beispiel 2.1). Das PCR-Fragment, das das VH/VL-scFv-Fragment codiert, wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRV/BspEI gespalten und in den Vektor Bluescript KS+CTI inseriert, der bereits durch Spaltung mit EcoRV/Xmal präpariert worden war (vgl. Beispiel 8.1). Anschließend wurde das umgedrehte M79scFv-(VH/VL)-Fragment mit den Restriktionsenzymen BspEI/Sall ausgeschnitten und in das Plasmid pEF-DHFR+CTI+CD80-M79scFv-(VLNH) unter Verwendung von BspEUSall eingeführt, wodurch das M79scFv-VLNH-Fragment ersetzt wurde (vgl. **Fig. 25**). Die Transfektion und die Zellkulturverfahren wurden ausgeführt, wie vorstehend beschrieben. Die Analyse der Antigenbindung wurde unter Verwendung des beschriebenen 17-1A-ELISA durchgeführt (Beispiel 8.1.2). Jedoch konnte keine 17-1A-Bindungsaktivität des anders angeordneten CD80-M79scFv-Konstrukts nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in **Fig. 29** dargestellt.

8.3: CD80-M79scFv-(VH/VL)-Konstrukt mit einem langen (Gly₄Ser₁)₃-Linker

[0220] Zuerst wurde das M79scFv-(VH/VL)-Fragment durch eine zweistufige Fusions-PCR erhalten, wie vorstehend in Beispiel 8.2 beschrieben. Das PCR-Fragment, welches das VH/VL-scFv-Fragment codiert, wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRV/BspEI gespalten und in den mit EcoRV/Xmal gespaltenen Bluescript KS+CTI-Vektor subcloniert (vgl. Beispiel 8.1). In einem weiteren Schritt wurde ein längerer Glycin-Serin-Linker (Gly₄Ser₁)₃, bestehend aus 15 Aminosäuren, eingeführt. Dafür mußte ein anderer Oligonucleotidlinker (ACCGS15BAM), welcher derart konstruiert wurde, daß er den (Gly₄Ser₁)₃-Linker codiert und mit BspEI und BamHI kompatible überhängende Enden bereitstellt, in den Bluescript KS+CTI+M79scFv-(VH/VL)-Vektor (Beispiel 8.2) inseriert werden. Die Nucleotidsequenz des Linkers ist in **Fig. 30** gezeigt.

[0221] Das Plasmid Bluescript KS+CTI+M79scFv-(VH/VL) einschließlich der codierenden Sequenz des (Gly₄Ser₁)₃-Linkers wurde mit BspEI und Sall gespalten, und das erhaltene DNA-Fragment (Gly₄Ser₁)₃+M79scFv-(VH/VL) wurde in den mit BspEUSall gespaltenen Vektor pEF-DHFR inseriert, der das CD80 codierende Fragment enthält (Beispiel 8.1). Auf diese Weise wurde das M79scFv-(VLNH)-Fragment zusammen mit dem kurzen (Gly₄Ser₁)₁-Linker ersetzt (vgl. **Fig. 25**). Zur Transfektion und für das Zellkulturverfahren vgl. Beispiel 8.1. Die Antigen-spezifische Bindung wurde durch einen 17-1A-ELISA untersucht, wie vorstehend beschrieben (Beispiel 8.1.1), und der Nachweis des funktionalen rekombinanten Proteins in dem Zellkulturüberstand wurde mit einem anti-His-Marker-Antikörper, gefolgt durch einen anti-Maus-IgG-(Fc)-Antikörper durchgeführt (vgl. Beispiel 8.1.1). Der bispezifische, einkettige anti-17-1A/anti-CD3-Antikörper (Mack et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021–7025) diente als positive Kontrolle. Die Entwicklung des ELISA und die Messung der OD-Werte wurden ausgeführt, wie vorstehend beschrieben (Beispiel 8.1.1). Jedoch war keine Antigenbindung nachweisbar. Die Ergebnisse sind in **Fig. 31** dargestellt.

Beispiel 9: Unvorhersagbare Expressionsergebnisse in Säuger-Wirtszellen von rekombinanten Proteinen, die Oligomerisierungsdomänen tragen, welche in *E. coli* etabliert wurden

[0222] Um herauszufinden, ob die Durchführbarkeit von Polypeptid-Oligomerisierungsstrategien in Säuger-Wirtszellen durch ihre erfolgreiche Verwendung in *E. coli* vorhergesagt werden kann, wurde zwei unterschiedliche Oligomerisierungsdomänen, die in bakteriellen Expressionssystemen charakterisiert worden waren, in Fusionsproteinen getestet, die durch Säugerzellen exprimiert werden (Pack, *Biotechnology* 11 (1993), 1271; Rheinacker, *J. Immunol.* 157 (1996), 2989). Das erste Fusionsprotein, das getestet wurde, besteht aus zwei funktionalen Domänen, dem 17-1A-spezifischen M79scFv-Fragment am N-Terminus und dem menschlichen IL-2 am C-Terminus. Zwischen diesen zwei funktionalen Domänen wurde entweder eine Dimerisierungs- oder eine Tetramerisierungsdomäne inseriert, wobei die in **Fig. 47** bzw. **48** gezeigten Polypeptidketten erhalten wurden. Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Sall in den Expressionsvektor pEF-DHFR cloniert und in DHFR-defiziente CHO-Zellen transfiziert, wie beschrieben (Mack, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995), 7021–7025) (es wird angemerkt, daß die beiden in **Fig. 47** und **48** gezeigten DNA-Sequenzen eine interne Erkennungsstelle für EcoRI tragen, so daß eine teilweise Spaltung mit diesem Restriktionsenzym erforderlich ist). Die Kulturüberstände der transfizierten CHO-Zellen sowie die entsprechenden Zellysate, hergestellt gemäß Standardverfahren, wurden durch einen ELISA getestet. Ein immobilisiertes rekombinantes 17-1A-Antigen wurde mit dem Kulturüberstand oder dem Zellysat inkubiert, und das gebundene Konstrukt wurde mit einem Peroxidase-konjugierten anti-His-Marker-Antikörper (Roche; Kat. Nr. 1965085), 1 : 500 verdünnt, nachgewiesen. Das allgemeine ELISA-Verfahren wurde durchgeführt, wie in Beispiel 4.4 beschrieben. Die in **Fig. 50** dargestellten Ergebnisse zeigen, daß nur das tetramere, aber nicht das dimere Konstrukt in dem Überstand vorkommt und folglich als ein sekretierbares und voll funktionales Protein in Säugerzellen hergestellt wird, obwohl beide im Zellysat gut nachweisbar sind. Zusammenfassend wurde gezeigt, daß die Dimerisierungsdomäne nicht allgemein für Oligomerisierungsstrategien in Säuger-Wirtszellen verwendbar ist.

[0223] Um die vielversprechende Tetramerisierungsdomäne weiter zu testen, wurde sie in ein anderes Fusionsprotein inseriert, das dem M79scFv-IL-2-Konstrukt sehr ähnlich ist.

[0224] Dieses Polypeptid besteht aus dem DC8scFv-Fragment (Schäkel, *Eur. J. Immunol.* 28 (1998), 4084–4093) am N-Terminus und der extrazellulären Domäne des menschlichen erbB2 am C-Terminus (es wird angemerkt, daß die extrazelluläre Domäne des menschlichen erbB2 so gut wie menschliches IL-2 durch Säugerzellen sezerniert wird). Die vollständige Polypeptidkette ist in **Fig. 49** dargestellt. Das entsprechende DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Sall auch in den Expressionsvektor pEF-DHFR cloniert und in DHFR-defiziente CHO-Zellen transfiziert, wie beschrieben (Mack, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995), 7021–7025). Der Kulturüberstand der transfizierten CHO-Zellen sowie das entsprechende Zellysat, hergestellt gemäß Standardverfahren, wurden mit einem erbB2-spezifischen Sandwich-ELISA getestet, der auf zwei anti-erbB2-Antikörpern (chimärer 7C1 und muriner Her81) basierte, die unterschiedliche Epitope erkennen, wodurch die gleichzeitige Bindung an das Antigen ermöglicht wird. Der chimäre 7C1, immobilisiert an eine ELISA-Platte, wurden mit mehreren Verdünnungen des Kulturüberstands oder des Zellysats inkubiert, wodurch das tetramere DC8scFv-erbB2_{EC}-Konstrukt abgefangen wurde, das dann mit dem murinen Her81, gefolgt durch einen Fc-spezifischen, Peroxidase-konjugierten, polyclonalen Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper (Dianova, Hamburg; Kat. Nr. 115-035-071), 1 : 5000 verdünnt, nachgewiesen werden konnte. Als positive Kontrolle wurden äquivalente Verdünnungen des Kulturüberstands und des Zellysats des tetrameren M79scFv-IL-2-Konstrukts parallel zu dem vorstehend beschriebenen ELISA untersucht. Die Ergebnisse sind in **Fig. 51A** dargestellt. Das allgemeine ELISA-Verfahren wurde durchgeführt, wie in Beispiel 4.4 beschrieben.

[0225] Die in **Fig. 51B** dargestellten Ergebnisse zeigen, daß im Gegensatz zu dem tetrameren M79scFv-IL-2-Konstrukt das eng verwandte tetramere DC8scFv-erbB2_{EC}-Konstrukt in dem Überstand nicht nachweisbar ist und folglich nicht als ein sekretierbares und voll funktionales Protein in Säuger-Wirtszellen herstellbar ist, obwohl es zweifelsfrei in dem Zellysat vorhanden ist. Zusammenfassend wurde gezeigt, daß auch die Tetramerisierungsdomäne nicht allgemein für Oligomerisierungsstrategien in Säuger-Wirtszellen verwendbar ist.

[0226] Obwohl beide Oligomerisierungsdomänen für die Polypeptid-Oligomerisierung in *E. coli* gut etabliert sind und in der Literatur als geeignet für Fusionsproteine wie die in diesem Beispiel getesteten in Betracht gezogen werden (Rheinacker, *J. Immunol.* 157 (1996), 2989), versagen sie im allgemeinen eindeutig beim Erreichen dieses Ziels in Säuger-Wirtszellen. Folglich scheint es ein häufiges Prinzip zu sein, daß die erfolgreiche Verwendung von Oligomerisierungsdomänen in *E. coli* nichts über deren allgemeine Verwendbarkeit in Säuger-Wirtszellen aussagt.

Beispiel 10: Konstruktion eines Heterominikörpers mit Effektor-domänen, die in allen vier Positionen vorliegen

[0227] Die Heterominikörper-Anordnung ermöglicht prinzipiell die Addition von vier verschiedenen Effektor-

domänen an die zwei N- und die zwei C-terminalen Positionen, die im Kern der über eine Disulfidbrücke verknüpften C_{H1}- und C_{kappa}-Domänen vorhanden sind (vgl. **Fig. 52**). Obwohl die vorherigen Beispiele zeigten, daß Effektor-domänen wie einkettige Fv's(scFv's) und co-stimulierende Moleküle ihre Funktionalität an den N-Termini des Heterominkörpers beibehalten, ist unklar, ob zwei Effektor-domänen an die C-terminalen Positionen von C_{H1} und C_K (kappa) gleichzeitig funktionell gebunden sein können. Eine ungeeignete Faltung, eine sterische Behinderung durch die N-terminalen Sequenzen oder eine gegenseitige Behinderung können die Aktivität von Effektor-domänen, die an die C-Termini von Heterominkörpern gebunden sind, beeinträchtigen oder die Expression solcher Heterominkörper in Säugerzellen verhindern.

[0228] Um zu zeigen, daß erstens Heterominkörper hergestellt werden können, wobei alle vier Positionen mit Effektor-domänen verbunden sind, und daß zweitens zwei C-terminal angehängte Domänen ihre biologische Aktivität beibehalten, wurde der in **Fig. 53** dargestellte Heterominkörper konstruiert. In diesem Molekül entspricht ein einkettiges Fv-Fragment ("HD70-scFv") den Nucleotiden 96 bis 842, wie in den beiden in **Fig. 55a** und **55b** gezeigten Nucleotidsequenzen veranschaulicht ist. Der entsprechende Antikörper HD70, beschrieben in WO 98/46645, ist N-terminal an die menschliche C_{H1}-Domäne gebunden, die an ihrem C-Terminus den menschlichen entzündlichen Cytokin-Granulocyten/Makrophagen koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF) plus eine Hexahistidinsequenz zur Erleichterung der Reinigung trägt. Für die zweite Polypeptidkette wies auch die menschliche C_K-Domäne ein HD70-scFv-Fragment gebunden an deren N-Terminus auf, wobei aber das menschliche entzündliche Cytokin Interleukin-2 (IL-2) an deren C-Terminus gebunden war. Um eine flexible Bindung bereitzustellen, wurde ein Serin-Glycin-Linker zwischen die C_{H1}- und C_K-Domänen und den C-terminal gebundenen Cytokinen eingeführt. Das HD70-scFv erkennt spezifisch das menschliche Epithelzellen-Adhäsionsmolekül (EpCAM; auch als 17-1A-Antigen bezeichnet).

[0229] Plasmidexpressionsvektoren, die HD70--CH1--GM-CSF- und HD70-CK-IL-2-Ketten codieren, wurden konstruiert. Die vorher erwähnten Säuger-Expressionsvektoren wurden verwendet (pEF-DHFR; pEF-ADA). Die Anordnung der verschiedenen Domänen codierenden DNA-Sequenzen in den zwei Expressionsvektoren ist in **Fig. 54** gezeigt. Für eine geeignete Sekretion in Säugerzellen wurde eine Sequenz, die eine Peptid-Leadersequenz aus IgG codiert, an die 5'-Enden der Konstrukte angehängt. Die vollständigen Nucleotid- und Aminosäuresequenzen der zwei codierenden Sequenzen für die HD70--CH1--GM-CSF- und HD70-CK-IL-2-Ketten sind auch in **Fig. 55** gezeigt.

Beispiel 11: Herstellung und Charakterisierung eines anti-EpCAM-Heterominkörpers mit zwei verschiedenen Cytokinen, gebunden an dessen C-Termini

[0230] Um zu testen, ob der in **Fig. 53** gezeigte Heterominkörper exprimiert und sezerniert wird, wurden Ovarzellen des Chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) unter Verwendung von Superfect (Qiagen) nacheinander mit den Vektoren transfiziert, welche die zwei Ketten des Heterominkörpers codieren, und stabil exprimierende Zellen wurden selektiert, wie bereits beschrieben. Zellkulturüberstände von stabil transfizierten CHO-Zellen wurden mittels FACS auf das Vorhandensein einer Bindungsaktivität für CHO-Zellen untersucht, die das menschliche EpCAM stabil exprimieren (vgl. vorherige Beispiele). Zum Nachweis der Heterominkörper-Bindung an EpCAM-positive CHO-Zellen wurde ein Maus-anti-Mensch-GM-CSF-Antikörper (Biosource; Kat. Nr. AHC 2812) verwendet. Der zweite Antikörper wurde durch einen FITC-markierten Schaf-anti-Maus-Antikörper (Sigma; Kat. Nr. F6257) nachgewiesen. Mit dem Überstand aus untransfizierten CHO-Zellen wurde keine Bindung beobachtet (**Fig. 56**, oberes Bild). Ansteigende Mengen des Überstands aus stabil transfizierten CHO-Zellen riefen eine zunehmende Verschiebung des Fluoreszenz-Mittelwerts nach rechts hervor, was auf ein zunehmendes Ausmaß der Heterominkörper-Bindung an EpCAM-positive CHO-Zellen hinweist (**Fig. 56**, unteres Bild). Dies zeigt, daß mindestens eine der Ketten exprimiert und sezerniert wurde, während ein funktionales EpCAMspezifisches scFv an deren N-Terminus beibehalten wird.

[0231] Anschließend wurde untersucht, ob die EpCAM-Aktivität im Überstand von transfizierten CHO-Zellen mit der Immunreaktivität für die Cytokine GM-CSF und IL-2 physikalisch verbunden ist. Zu diesem Zweck wurde ein ELISA entwickelt, der anti-EpCAMscFv's durch ihre Bindung an die rekombinante extrazelluläre Domäne von EpCAM abfängt (Micromet), welches verwendet wurde, um die ELISA-Platten zu beschichten. Die gebundenen Moleküle wurden dann mit spezifischen Antikörpern auf das Vorhandensein einer Immunreaktivität für menschliches IL-2 (Pharmingen; Kat. Nr. 18951D, + FITCmarkierter Ziege-anti-Ratte-Antikörper (Sigma; Kat. Nr. F6258)) bzw. menschlichen GM-CSF (Biosource; Kat. Nr. AHC 2812, + FITC-markierter Schaf-anti-Maus-Antikörper (Sigma; Kat. Nr. F6257)) getestet. Wie in **Fig. 57** (Spalte 2) gezeigt, fing das gebundene EpCAM tatsächlich eine Aktivität ab, die mit Antikörpern gegen sowohl IL-2 als auch GM-CSF stark immunreaktiv war. Diese Reaktivitäten wurden im Überstand von untransfizierten CHO-Zellen (Spalte 1) nicht beobachtet. Diese Daten zeigen, daß beide Heterominkörperketten exprimiert und sezerniert wurden und daß die Cytokine, die C-terminal an die Heterominkörperketten gebunden sind, in einer Konformation vorliegen, die durch ihre jeweiligen Antikörper erkannt werden kann.

[0232] Ein wichtiges Merkmal der Heterominkörper-Anordnung ist die feste physikalische Bindung der zwei

Polypeptidketten. Um zu untersuchen, ob IL-2 und GM-CSF, die Teil verschiedener Polypeptidketten sind (vgl. **Fig. 53**), in einem Heterominikörper tatsächlich physikalisch verknüpft sind, wurde ein ELISA entwickelt, bei dem die Moleküle, die in dem CHO-Zellkulturüberstand enthalten sind, an der ELISA-Platte durch einen Antikörper gegen menschlichen GM-CSF (Biosource, vgl. vorstehend) abgefangen und anschließend auf eine Reaktivität mit einem anti-IL-2-Antikörper (Pharmingen, vgl. vorstehend, und alkalische Phosphatase-konjugiertes Streptavidin, Dako; Kat. Nr. D0396) untersucht. Desgleichen wurde das Abfangen mit einem anti-IL-2-Antikörper (vgl. vorstehend) ausgeführt, und der anschließende Nachweis wurde unter Verwendung eines biotinylierten anti-GM-CSF-Antikörpers (Biosource; Kat. Nr. AHC 2919), gefolgt durch alkalische Phosphatase-konjugiertes Streptavidin (Dako; Kat. Nr. D0396) durchgeführt. Die in **Fig. 58** (Spalte 2) dargestellten Ergebnisse zeigen, daß Antikörper gegen GM-CSF oder IL-2 tatsächlich in der Lage sind, IL-2- bzw. GM-CSF-Immunreaktivitäten auszufällen. Dies zeigt, daß sowohl GM-CSF als auch IL-2 innerhalb eines Moleküls eng verbunden sind. Der Überstand von Kontroll-CHO-Zellen zeigen keine der Reaktivitäten (**Fig. 58**, Spalte 1).

[0233] Ein anderes wichtiges Merkmal der Heterominikörper-Anordnung ist die kovalente Verknüpfung der zwei Ketten über eine Disulfidbrücke. Um zu zeigen, daß die Expression der zwei Ketten in CHO-Zellen ein kovalent verknüpftes Molekül ergab, das Reaktivitäten für sowohl IL-2 als auch GM-CSF zeigt, wurde ein Heterominikörper aus stabil transfizierten CHO-Zellen mit Hilfe einer Kationenaustauscher- und Kobaltchelate-Affinitätschromatographie gereinigt. Wie in **Fig. 59** (Bahn 1) gezeigt, ergab diese Reinigung eine deutlich sichtbare Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 116 kDa nach einer nichtreduzierenden SDS-PAGE, gefolgt durch eine Coomassie-Blau-Färbung. Die Übereinstimmung dieser Bande mit dem richtig zusammengelagerten Heterominikörper wurde durch ein Western-Blot-Verfahren unter Verwendung eines biotinylierten Antikörpers gezeigt, der für die menschliche C κ -Domäne spezifisch ist (Pierce; Kat. Nr. 31780). Der Antikörper wurde durch ein Streptavidin/alkalische Phosphatase-Konjugat (Dako; Kat. Nr. D0396) nachgewiesen. Die Immunfärbung für C κ wanderte gleichzeitig mit der Coomassie-Blaugefärbten 116 kDa-Bande (**Fig. 59**, Bahn 2). Das Molekulargewicht von 116 kDa steht im Einklang mit der Summe der berechneten Molekulargewichte der HD70--CH1--GM-CSF (54,4 kDa)- und HD70--CK--IL-2 (55,4 kDa)-Ketten. Kohlenhydrateinheiten, die an die N-Glycosylierungsstellen in den zwei VH-HD70-Domänen gebunden sind, können zu dem Unterschied von 6,2 kDa beitragen. Wie durch das Western-Blot-Verfahren gezeigt wurde, war das Heterominikörpermolekül von 116 kDa auch mit Antikörpern immunreaktiv, die für menschliches IL-2 (**Fig. 59**, Bahn 3) und menschlichen GM-CSF (Bahn 4) spezifisch sind. Diese Daten zeigen, daß es möglich ist, ein richtig zusammengelagertes Heterominikörpermolekül in CHO-Zellen herzustellen, das für zwei verschiedene Cytokine immunreaktiv ist.

[0234] Die Herstellung von pharmazeutisch nützlichen Heterominikörpern erfordert, daß N- und C-terminal gebundene Effektor-domänen ihre richtigen biologischen Aktivitäten beibehalten. Um zu testen, ob die C-terminal gebundenen Cytokine GM-CSF und IL-2 in dem Heterominikörper noch biologisch aktiv waren, wurde deren Aktivität in einem Proliferationstest bestimmt. Sowohl IL-2 als auch GM-CSF kann die Proliferation von Immunzellen initiieren, die deren jeweilige Rezeptoren mit einer hohen Affinität tragen. Der gereinigte Heterominikörper wurde zu Zellkulturen von TF-1 (eine menschliche Erythroleukämie-Linie; bereitgestellt durch DSMZ, Braunschweig, Deutschland) und CL96 (eine murine T-Zelllinie; beschrieben bei Marcucci, Nature 291 (1981), 79–81) zugegeben, die in Antwort auf den menschlichen GM-CSF bzw. das menschliche IL-2 proliferieren. In beiden Fällen wurde eine Zellproliferation, gemessen durch das Reagens WST-1 (Boehringer Mannheim; Kat. Nr. 1644807), durch GM-CSF in TF-1-Zellen (**Fig. 60**) und durch IL-2 in CL96-Zellen (**Fig. 61**) in einer Form induziert, wobei die Cytokine physikalisch an die C-Termini des Heterominikörpers gebunden sind (**Fig. 53**). Dies zeigt, daß beide Effektorfunktionen in den zwei C-terminalen Positionen des Heterominikörpers ihre volle biologische Aktivität beibehalten können.

[0235] Zusammenfassend wurde gezeigt, daß die Heterominikörper-Anordnung die Herstellung von multivalenten, hochgradig aktiven Molekülen ermöglicht, die bis zu vier funktionale Effektor-domänen aufweisen können, welche in entweder ihren N- oder C-terminalen Positionen gebunden sind. Es wird in Betracht gezogen, daß noch andere Effektor-domänen an die N- und C-Termini der gebundenen Effektor-domänen angehängt werden können (vgl. **Fig. 52**).

Tabelle 1

Antikörper	Typ	Firma	Kat. Nr.	Verdünnung
anti-Mensch- CD54	Maus-Ig1	Immunotech	0544	1:1000
anti-Mensch- CD58	Maus-IgG2	Immunotech	0861	1:1000
anti-Mensch- CD80	Maus-IgG1	Immunotech	1449	1:1000
anti-Mensch- CD86	Maus-IgG1	R&D Systems	MB141	1:1000
anti-Maus-IgG, Peroxidase- konjugiert	Ziege	Dianova, Hamburg	115-037- 071	1:5000
anti-Mensch-CK, biotinyliert	Ziege	Pierce	31780	1:1000
Streptavidin		Dako, Hamburg	P0347	1:1000

Tabelle 2

T-Zellen	Konzentrationen des M79scFvCK/CD80CH1-Heterominkörpers	Konzentration des bispezifischen einkettigen Antikörpers M79scFv-antiCD3scFv
CD4+CD45RO-	500ng/ml	250ng/ml
CD4+CD45RO-	500ng/ml	50ng/ml
CD4+CD45RO-	500ng/ml	10ng/ml
CD4+CD45RO-	500ng/ml	2ng/ml
CD4+CD45RO-	500ng/ml	0ng/ml
CD4+CD45RO-	0ng/ml	250ng/ml
CD4+CD45RO-	0ng/ml	50ng/ml
CD4+CD45RO-	0ng/ml	10ng/ml
CD4+CD45RO-	0ng/ml	2ng/ml
CD4+CD45RO-	0ng/ml	0ng/ml
CD4+CD45RO- ohne 17-1A- positive CHO-Zellen	500ng/ml	250ng/ml
PBMC	500ng/ml	250ng/ml
PBMC	0ng/ml	250ng/ml
PBMC	0ng/ml	0ng/ml

Tabelle 3

Zellen	Heterominkörper CD80 Konzentration	M79SCFV-ANTICD3 Konzentration
CD8+CD45RO-	500ng/ml	250ng/ml
CD8+CD45RO-	500ng/ml	50ng/ml
CD8+CD45RO-	500ng/ml	10ng/ml
CD8+CD45RO-	500ng/ml	2ng/ml
CD8+CD45RO-	500ng/ml	0ng/ml
CD8+CD45RO-	0ng/ml	250ng/ml
CD8+CD45RO-	0ng/ml	50ng/ml
CD8+CD45RO-	0ng/ml	10ng/ml
CD8+CD45RO-	0ng/ml	2ng/ml
CD8+CD45RO-	0ng/ml	0ng/ml
CD8+CD45RO- ohne 17-1A- positive CHO-Zellen	500ng/ml	250ng/ml
PBMC	500ng/ml	250ng/ml
PBMC	0ng/ml	250ng/ml
PBMC	0ng/ml	0ng/ml

Tabelle 4

Antikörper	Typ	Konjugation	Firma	Verdünnung
anti-Mensch- CD45R0	murines IgG2a	Fluorescein- isothiocyanat (FITC)	DAKO, Hamburg, Deutschland	1:50
anti-Mensch- CD45RA	murines IgG1	R-Phyco- erythrin (PE)	Coulter, Immunotech	1:50
Isotyp IgG2a	murines IgG2a	FITC	Coulter, Immunotech	1:25
Isotyp IgG1	murines IgG1	PE	Coulter, Immunotech	1:100
anti-Mensch- CD4	murines IgG2a	TRI- COLOR®	Caltag, vertrieben durch Medac, Hamburg	1:50
anti-Mensch- CD8	murines IgG2a	TRI- COLOR®	Caltag, vertrieben durch Medac, Hamburg	1:200

Patentansprüche

1. Eine multifunktionale Verbindung, herstellbar in einer Säuger-Wirtszelle als ein sekretierbares und voll funktionales Heterodimer aus zwei Polypeptidketten, wobei die eine der Polypeptidketten als einzigste konstante Domänenregion einer schweren Immunglobulinkette die C_{H1}-Domäne umfasst, und die andere Polypeptidkette die konstante C_L-Domäne einer leichten Immunglobulinkette umfasst, wobei die multifunktionale Verbindung weiterhin, fusioniert an die konstanten Domänenregionen, mindestens zwei und bis zu vier (Poly)peptide mit unterschiedlichen Rezeptor- oder Ligandenfunktionen umfasst, wobei weiterhin mindestens zwei der unterschiedlichen (Poly)peptide keine intrinsische Affinität füreinander haben, und wobei die Polypeptidketten durch die konstanten Domänen verbunden sind.
2. Multifunktionale Verbindung nach Anspruch 1, wobei die funktionalen Domänen, mit Rezeptor- oder Ligandenfunktion, C- und/oder N-terminal an die konstante Immunglobulindomänen gekoppelt sind.
3. Multifunktionale Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, umfassend mindestens drei funktionale Domänen mit Rezeptor- oder Ligandenfunktion.
4. Multifunktionale Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, umfassend vier funktionale Domänen mit Rezeptor- oder Ligandenfunktion.
5. Multifunktionale Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei mindestens zwei Domänen mit Rezeptor- oder Ligandenfunktion N-terminal an die konstanten Immunglobulindomänen gekoppelt sind.
6. Multifunktionale Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei mindestens eine der Domänen mit Rezeptor- oder Ligandenfunktion in der Form eines scFv-Fragments oder eines funktionalen Teils davon vorliegt.
7. Multifunktionale Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei mindestens eine der Domänen mit Rezeptor- oder Ligandenfunktion ein T-Zell co-stimulierender Ligand, eine Antigen-bindende Region spezifisch für ein Tumor-assoziiertes Antigen oder eine proteinartige Verbindung, welche das Primär-Aktivierungssignal für T-Zellen liefert, ist.
8. Multifunktionale Verbindung nach einem der Ansprüche 6 oder 7, wobei das scFv-Fragment oder der

funktionale Teil davon die V_H - und die V_L -Regionen des murinen anti-Mensch 17-1a-Antikörpers M79, die V_H - und die V_L -Regionen des anti-Lewis-Y-Antikörpers, wie dargestellt in **Fig. 6**, die V_H - und die V_L -Regionen des anti-CD3-Antikörpers TR66, und/oder die V_H - und die V_L -Regionen des menschlichen anti-Mensch EpCAM-Antikörpers, wie in **Fig. 55** gezeigt, umfasst.

9. Multifunktionale Verbindung nach Anspruch 7, wobei der T-Zell-co-stimulierende Ligand ein Zelloberflächenmolekül oder ein Fragment davon ist, exprimiert auf antigenpräsentierenden Zellen (APC).

10. Multifunktionale Verbindung nach Anspruch 9, wobei die antigenpräsentierende Zelle eine dendritische Zelle ist.

11. Multifunktionale Verbindung nach Anspruch 9, wobei das Zelloberflächenmolekül aus der Gruppe bestehend aus B7-1, B7-2, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, LFA-3 und CD137-Ligand ausgewählt ist.

12. Multifunktionale Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei mindestens eine der Domänen mit Rezeptor- oder Ligandenfunktion ein immunmodulierendes Effektormolekül oder ein Fragment davon ist.

13. Multifunktionale Verbindung nach Anspruch 12, wobei das immunmodulierende Effektormolekül oder das Fragment aus der Gruppe bestehend aus Zytokinen, Chemokinen, Macrophagenmigrationsfactor (MIF), T-Zell-Rezeptoren und löslichen MHC-Molekülen ausgewählt ist.

14. Multifunktionale Verbindung nach Anspruch 13, wobei das Zytokin aus der Gruppe bestehend aus Interleukinen, Interferonen, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, TNFs und VEGF ausgewählt ist.

15. Multifunktionale Verbindung nach Anspruch 13, wobei das Chemokin aus der Gruppe bestehend aus IL-8, Eotaxin, $GRO\alpha$, $GRO\beta$, $GRO\gamma$, IP10, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , NAP-2, RANTES, I309, Lymphotactin und SDF-1 ausgewählt ist.

16. Multifunktionale Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei mindestens eine der Domänen mit Rezeptor- oder Ligandenfunktion ein FAS-Ligand (CD 95 L) oder ein Fragment davon ist.

17. Multifunktionale Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei mindestens eine der Domänen mit Rezeptor- oder Ligandenfunktion ein Wachstumsfaktor oder ein Fragment davon ist.

18. Multifunktionale Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei mindestens eine der Domänen mit Rezeptor- oder Ligandenfunktion ein Angiogenese-Inhibitor oder ein Fragment davon ist.

19. Multifunktionale Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 18, wobei die konstante Domäne einer leichten Immunglobulinkette vom κ -Typ ist.

20. Multifunktionale Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 19, wobei die konstanten Immunglobulindomänen und die funktionalen Rezeptor-Liganden-Domänen durch einen Polypeptidlinker verbunden sind.

21. Multifunktionale Verbindung nach Anspruch 20, wobei der Polypeptidlinker eine Ig-Hinge-("Scharnier"-)Region oder eine Vielzahl von Glycin, Alanin und/oder Serin umfasst.

22. Multifunktionale Verbindung nach Anspruch 21, wobei die Ig-Hinge-Region eine IgG-Hinge-Region ist.

23. Multifunktionale Verbindung nach Anspruch 22, wobei die IgG-Hinge-Region die obere Hinge-Region von menschlichem IgG3 ist.

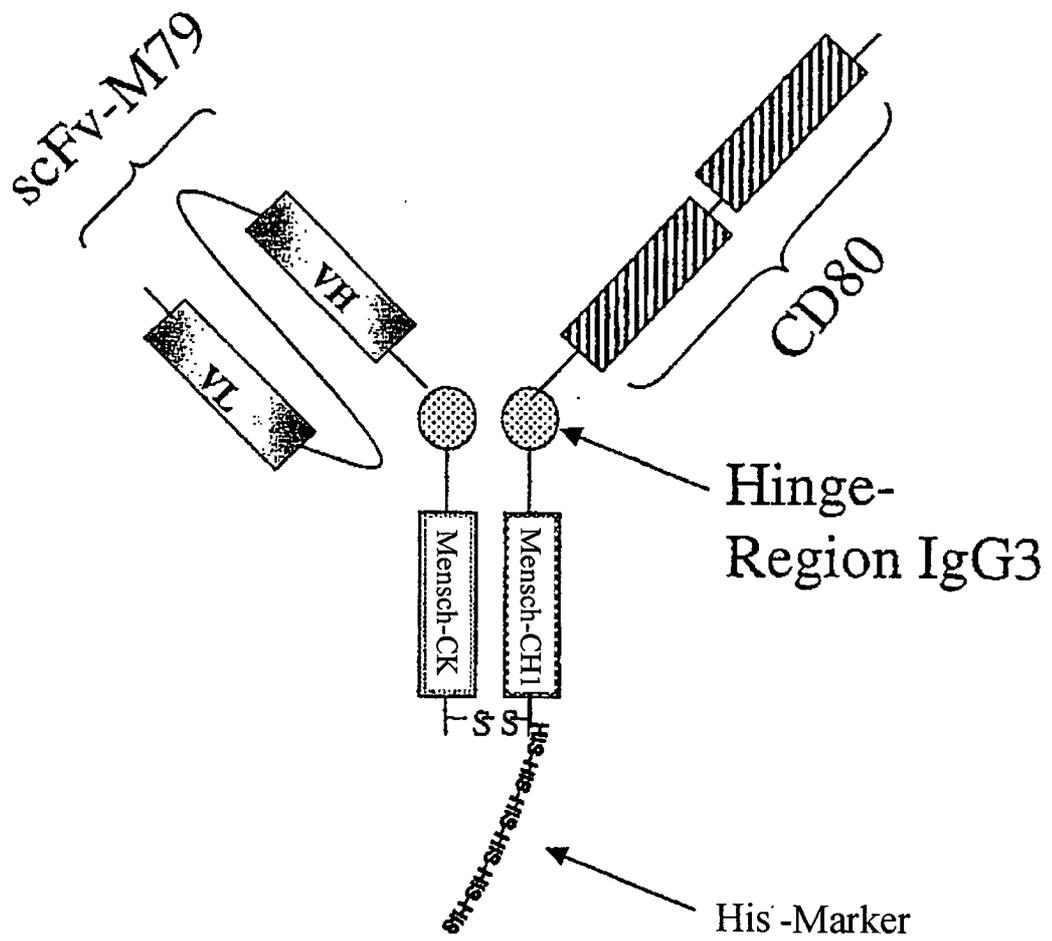
24. Multifunktionale Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 23, wobei die funktionalen Domänen mit Rezeptor- oder Ligandenfunktion GM-CSF, IL-2 und/oder (ein) scFv-Fragment(e), umfassend die V_H - und die V_L -Region des menschlichen anti-Mensch EpCAM-Antikörpers, wie in **Fig. 55** gezeigt, umfassen.

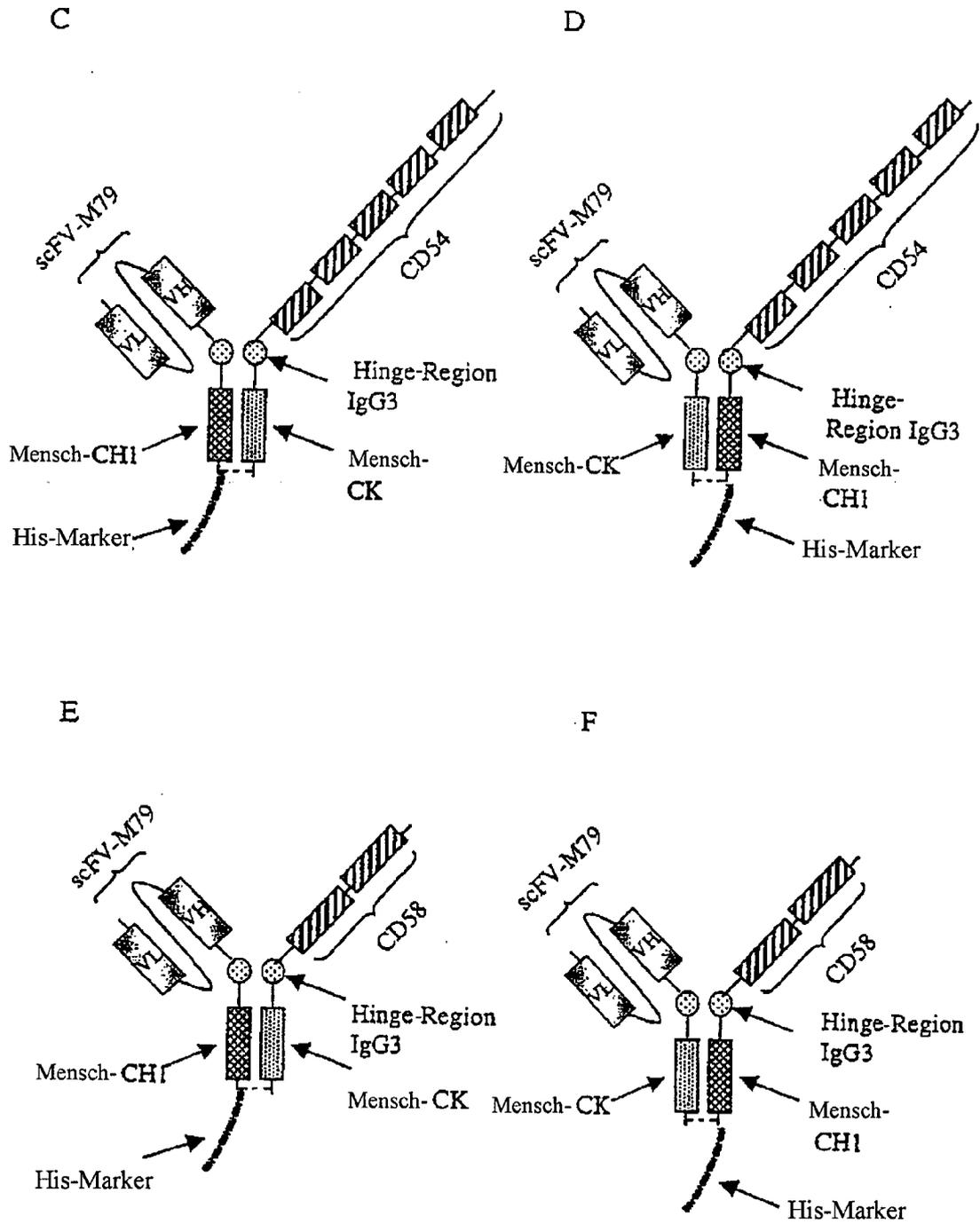
25. Multifunktionale Verbindung nach Anspruch 24, wobei das GM-CSF und das IL-2 Cterminal an die konstanten CH1- oder CL-Domänen gekoppelt sind und wobei das/die scFv-Fragment(e), umfassend die V_H - und die V_L -Regionen des menschlichen anti-Mensch EpCAM-Antikörpers N-terminal an die konstante C_{H1} - oder C_L -Domänen gekoppelt ist/sind.

26. Multifunktionale Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 25, wobei die C_{H1}-Domäne auf ein Hystidin-Tag, GST, Staphylococcusprotein A, Lex A, ein FLAG-tag oder ein MYC-tag begrenzt ist.
27. Multifunktionale Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 26, wobei die funktionalen Domänen mit Rezeptor- oder Ligandenfunktion eine Nicht-Immunglobulin-domäne ist oder davon abgeleitet ist.
28. Polynucleotid, kodierend die zwei Polypeptidketten der multifunktionalen Verbindung wie in einem der Ansprüche 1 bis 27 definiert.
29. Vektor, umfassend mindestens ein Polynucleotid nach Anspruch 28.
30. Säugetier-Wirtszelle, umfassend mindestens einen Vektor nach Anspruch 29.
31. Säugetier-Wirtszelle nach Anspruch 30, welche eine CHO-Zelle oder eine Myelomazelle ist.
32. Verfahren zur Herstellung der multifunktionalen Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 27, umfassend das Züchten der Wirtszelle nach Anspruch 30 oder 31 unter Bedingungen, die die Synthese und Sekretion der multifunktionalen Verbindung erlauben, und Gewinnen der multifunktionalen Verbindung aus der Kultur.
33. Verbindung, umfassend die multifunktionale Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 27, das Polynucleotid aus Anspruch 28 oder den Vektor aus Anspruch 29 und, gegebenenfalls, eine proteinartige Verbindung, welche in der Lage ist das primäre Aktivierungssignal für T-Zellen zu liefern.
34. Verbindung nach Anspruch 33, welche ein Arzneimittel ist, weiterhin gegebenenfalls umfassend einen pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder das Verdünnungsmittel und/oder Exzipient.
35. Verbindung nach Anspruch 33, welche eine diagnostische Verbindung ist, weiterhin gegebenenfalls geeignete Nachweismittel umfassend.
36. Verwendung der multifunktionalen Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 27, das Polynucleotid aus Anspruch 28 und/oder der Vektor aus Anspruch 29 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verhinderung und/oder Behandlung bösartigen Zellwachstums.
37. Verwendung nach Anspruch 36, wobei das bösartige Zellwachstum in Beziehung steht zu Bösartigkeiten von hämatopoetischen Zellen oder zu soliden Tumoren.
38. Verwendung nach Anspruch 37, wobei die Bösartigkeiten der hämatopoetischen Zellen Lymphome oder Leukämien sind.
39. Verwendung nach Anspruch 37, wobei die soliden Tumore Karzinome, Melanome oder Sarkome sind.
40. Kit, umfassend die multifunktionale Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 27 und, gegebenenfalls, eine proteinartige Verbindung, welche in der Lage ist, das primäre Aktivierungssignal für T-Zellen zu liefern.
41. Verbindung nach Anspruch 33, Arzneimittel nach Anspruch 34, diagnostische Verbindung nach Anspruch 35 oder Kit nach Anspruch 40, wobei die proteinartige Verbindung, welche in der Lage ist, das primäre Aktivierungssignal für T-Zellen zu liefern, ein bi-spezifischer Antikörper ist, welcher mit dem T-Zell-Antigen CD3 in Wechselwirkung steht.

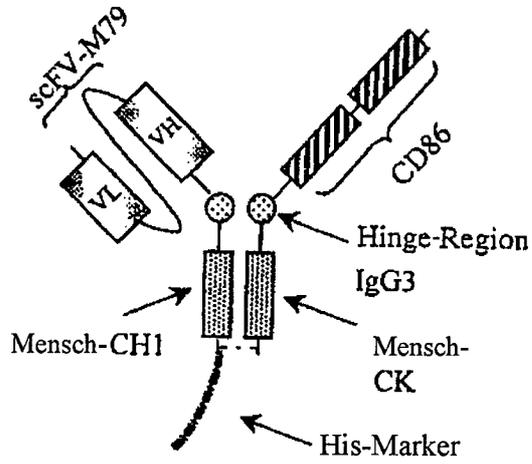
Es folgen 75 Blatt Zeichnungen

B

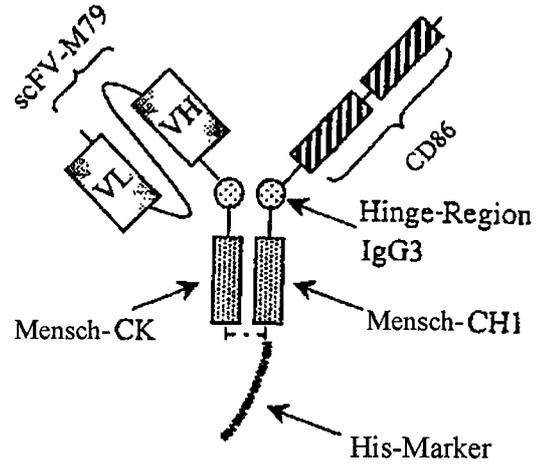




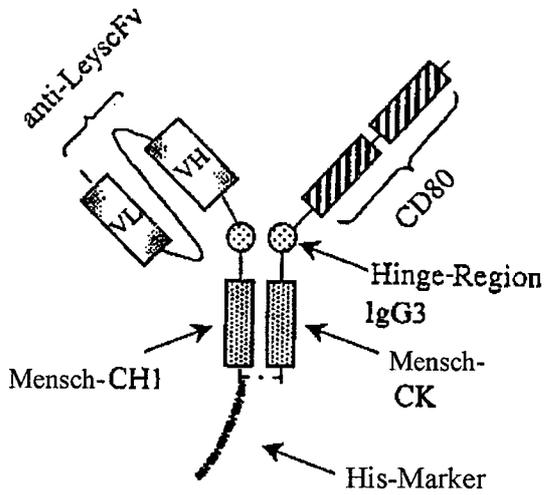
G



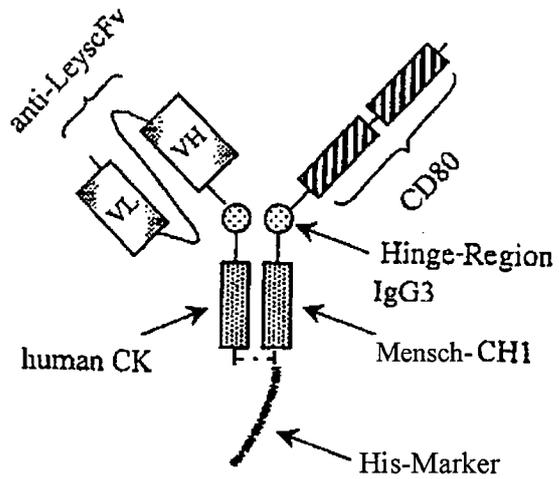
H



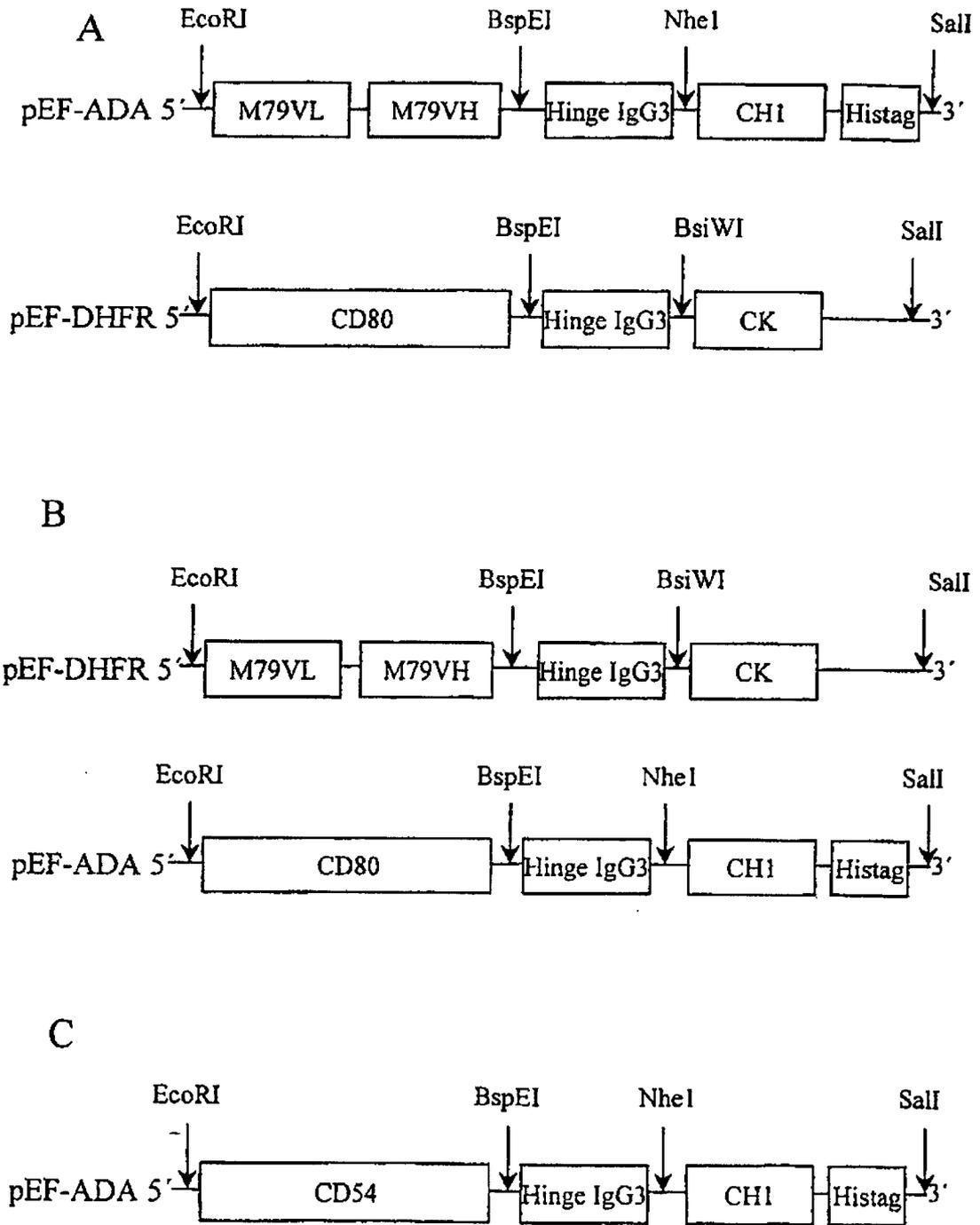
I



J

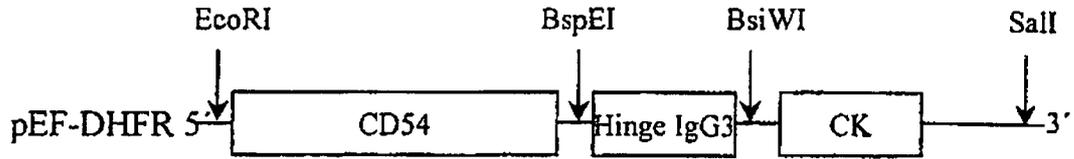


Figur 3

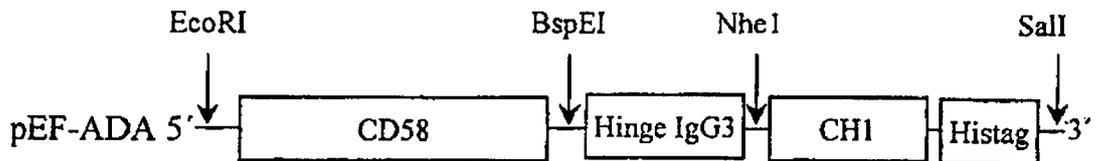


Histag = His-Marker; Hinge IgG3 = Hinge-Region IgG3

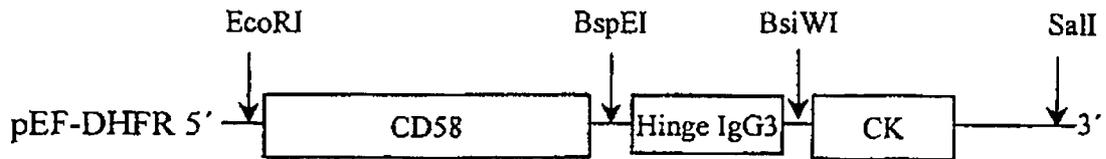
D



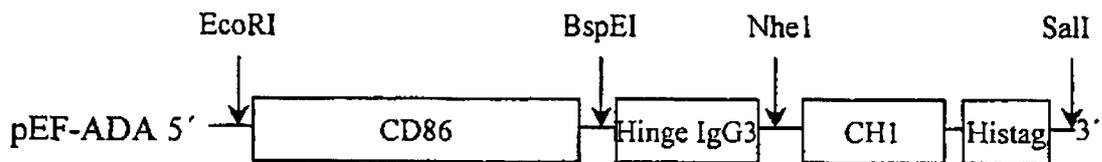
E



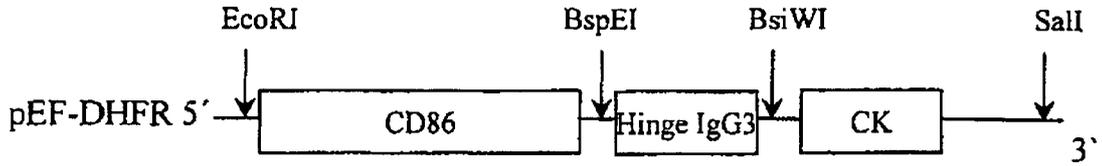
F



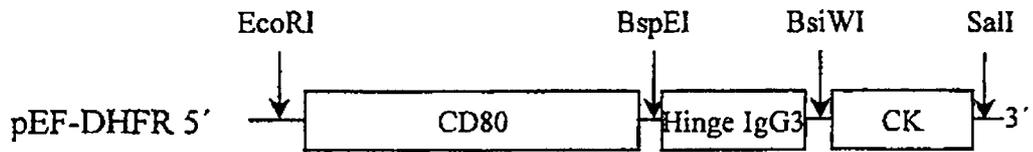
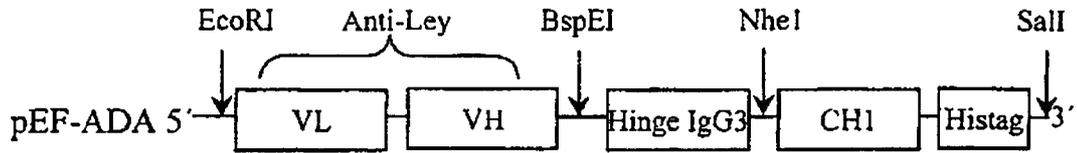
G



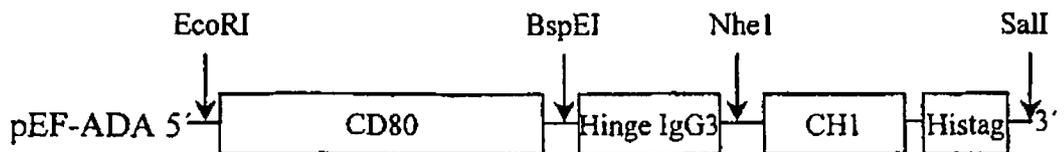
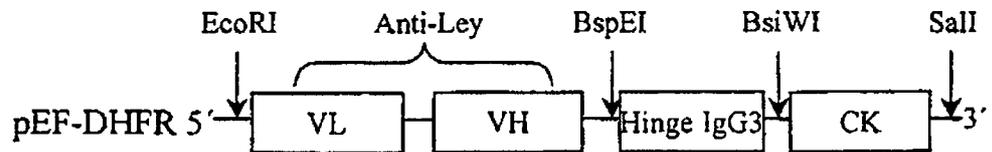
H

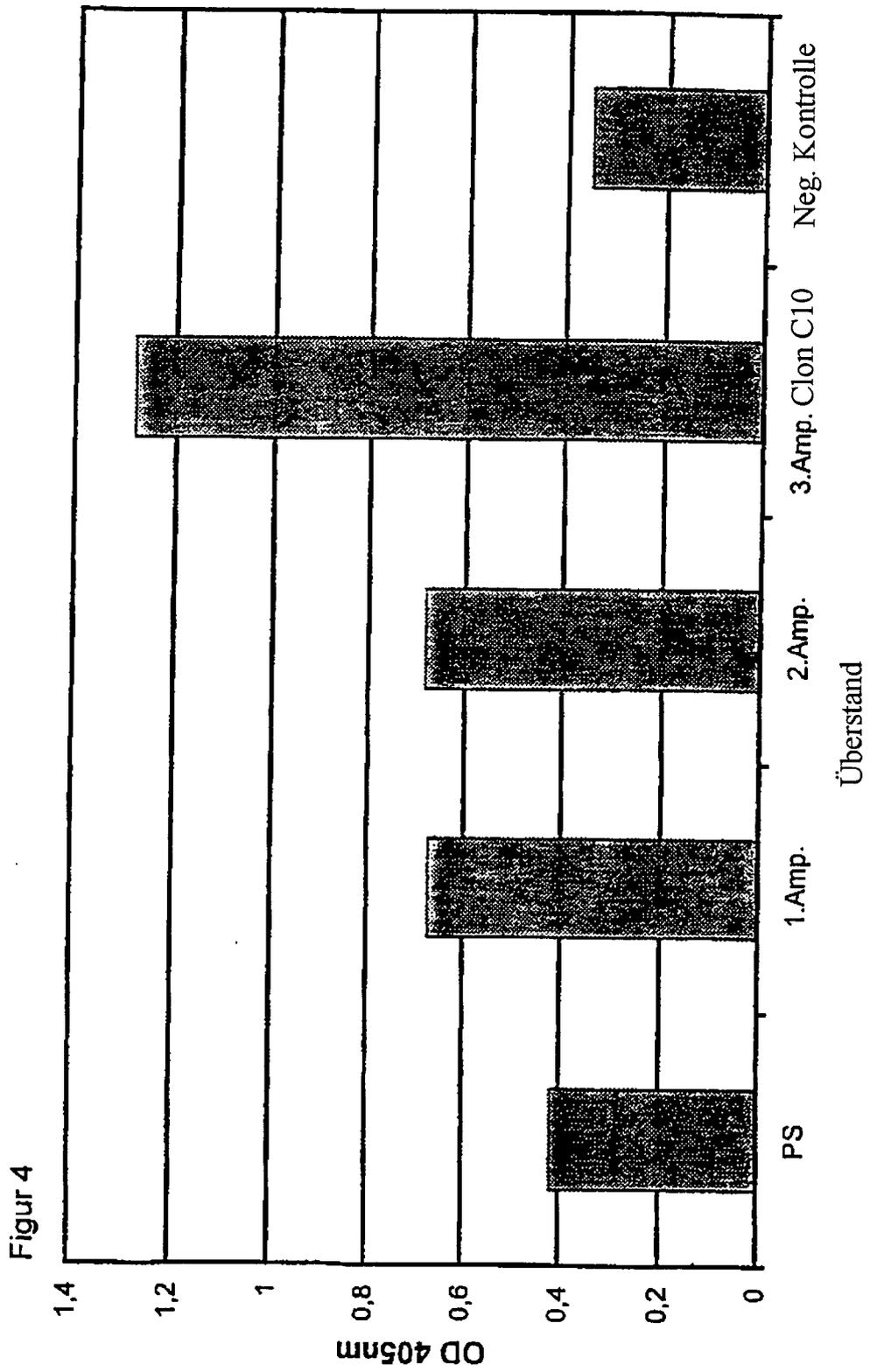


I

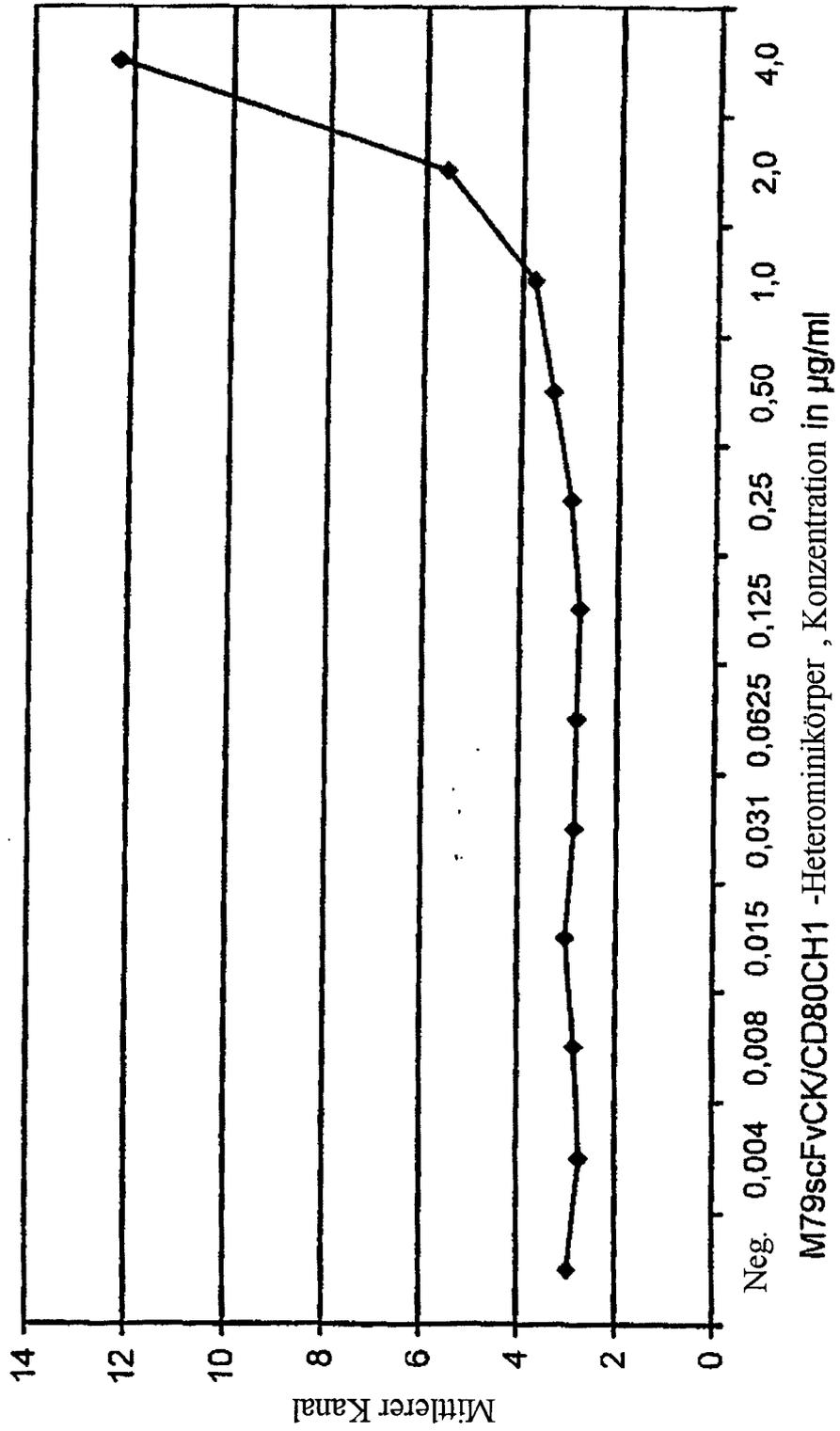


J





Figur 5



Figur 6

```

      Esori    10          19          28          37          45          55
5' GAAT TCC ACC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT ACA
      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
      M G W S C I I L F L V A T A T

      64          73          82          91          100          109
GGT GTA CAC TCC GAT ATC GGT GTG ACT CAG GAA TCT GCA CTC ACC ACA TCA CCT
      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
      G V H S D I V V T Q E S A L T T S P

      118          127          136          145          154          163
GGT GAA ACA GTC ACA CTC ACT TGT CGC TCA AGT ACT GGG GCT GTT ACA ACT AGT
      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
      G E T V T L T C R S S T G A V T T S

      172          181          190          199          208          217
AAC TAT GCC AAC TGG GTC CAA GAA AAA CCA GAT CAT TTA TTC ACT GGT CTA ATA
      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
      N Y A N W V Q E K P D H L F T G L I

      226          235          244          253          262          271
GGT GGT ACC AAC AAC CGA GTT CCA GGT GTT CCT GCC AGA TTC TCA GGC TCC CTG
      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
      G G T N N R V P G V P A R F S G S L

      280          289          298          307          316          325
ATT GGA GAC AAG GCT GCC CTC ACC ATC ACA GGG GCA CAG ACT GAG GAT GAG GCA
      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
      I G D K A A L T I T G A Q T E D E A

      334          343          352          361          370          379
ATA EAT TTC TGT GCT CTA TGG TAC AGC AAC CAT TGG GTG TTC GGT GGA GGA ACC
      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
      I Y F C A L W Y S N H W V F G G G T

      388          397          406          415          424          433
AAA CTC GAG GTC CTA GGT GGT GGT GGT TCT GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT
      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
      K L E V L G G G G S G G G G S G G G

      442          451          460          469          478          487
GGT TCT CAG GTC CAG CTG CAG GAG TCT GGA CCT GGC CTG GTG GCG CCC TCA CAG
      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
      G S Q V Q L Q E S G P G L V A P S Q
    
```

```

          495          505          514          523          532          541
AGC CTG TCC ATC ACA TGC ACC ATC TCA GGG TTC TCA TTA ACT AAG TAT GGT GTA
-----
S   L   S   E   T   C   T   E   S   G   F   S   L   T   K   Y   G   V

          550          559          568          577          586          595
CAC TGG GTT CGC CAG CCT CCA GGA AAG GGT CTG GAG TGG CTG GTC GTG ATA TGG
-----
H   W   V   R   Q   P   P   G   K   G   L   E   W   L   V   V   I   W

          604          613          622          631          640          649
ACT GAT GGA GGC ACA TCC TAT TAT TCA GGT CTC AAA TCC AGA CTG AGC ATC ACC
-----
T   D   G   G   T   S   Y   N   S   A   L   K   S   R   L   S   I   S

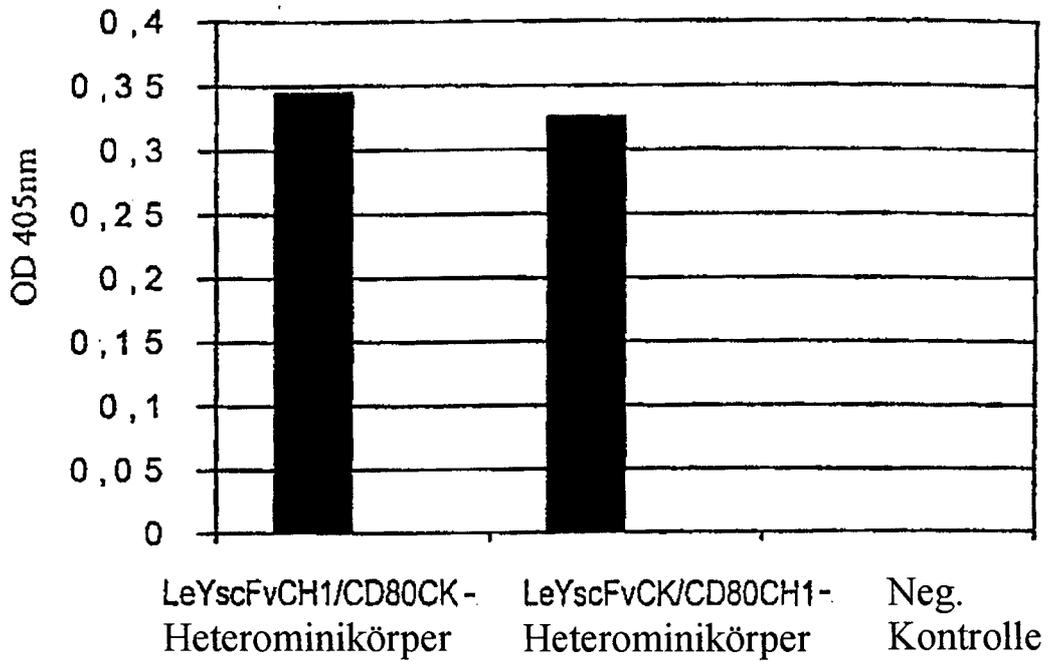
          658          667          676          685          694          703
AAG GAC AAC TCC AAG AGC CAA GGT TTC TTA AAA ATG AAC AGT CTC CAA ACT GAT
-----
K   D   N   S   K   S   Q   V   F   L   K   M   N   S   L   Q   T   D

          712          721          730          739          748          757
GAC ACA GCC ATG TAC TAC TGT GCC AGA CAG GAT AGA TAC GAC GGT GGA ATT GCT
-----
D   T   A   M   Y   Y   C   A   R   Q   D   R   Y   D   G   G   I   A

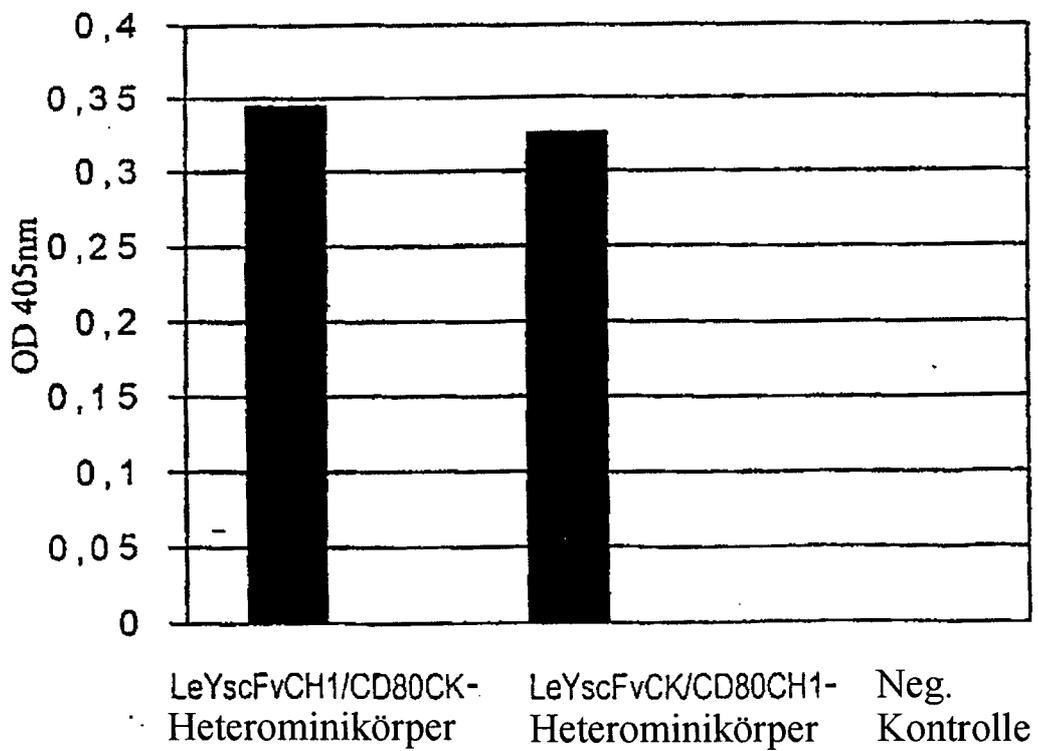
          765          775          784          855EI
TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCC GGA 3'
-----
Y   W   G   Q   G   T   T   V   T   V   S   S

```

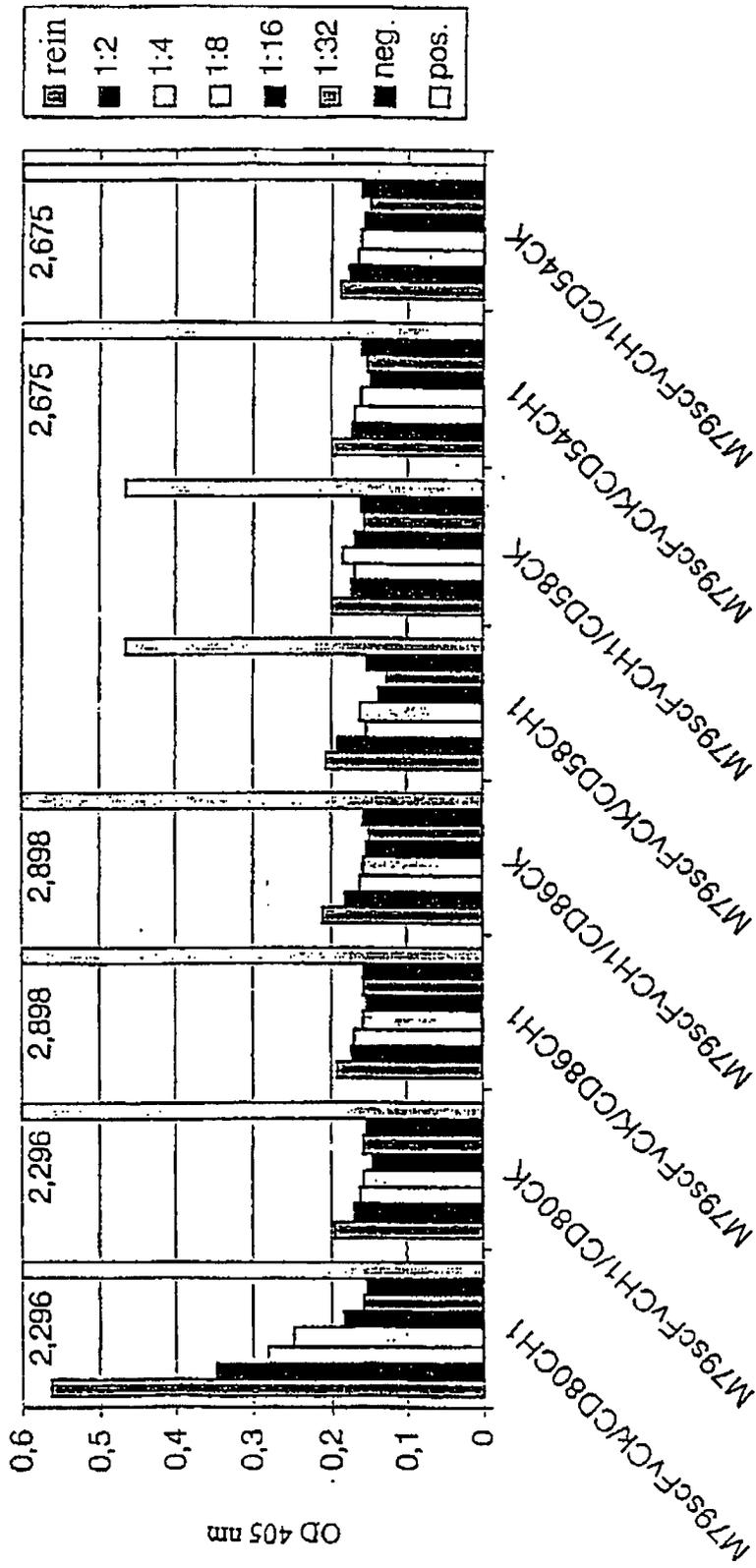
Figur 7



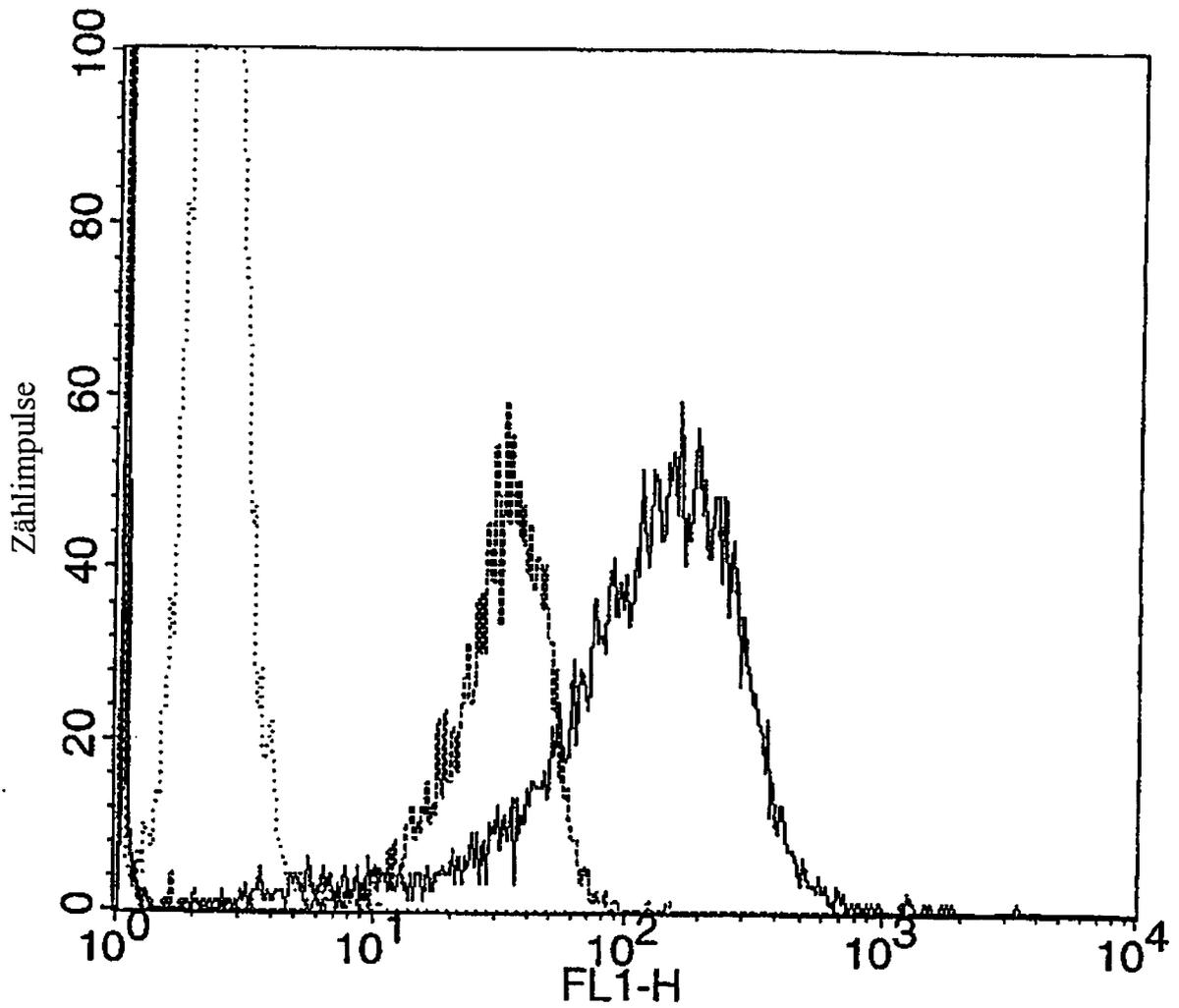
Figur 8



Figur 9

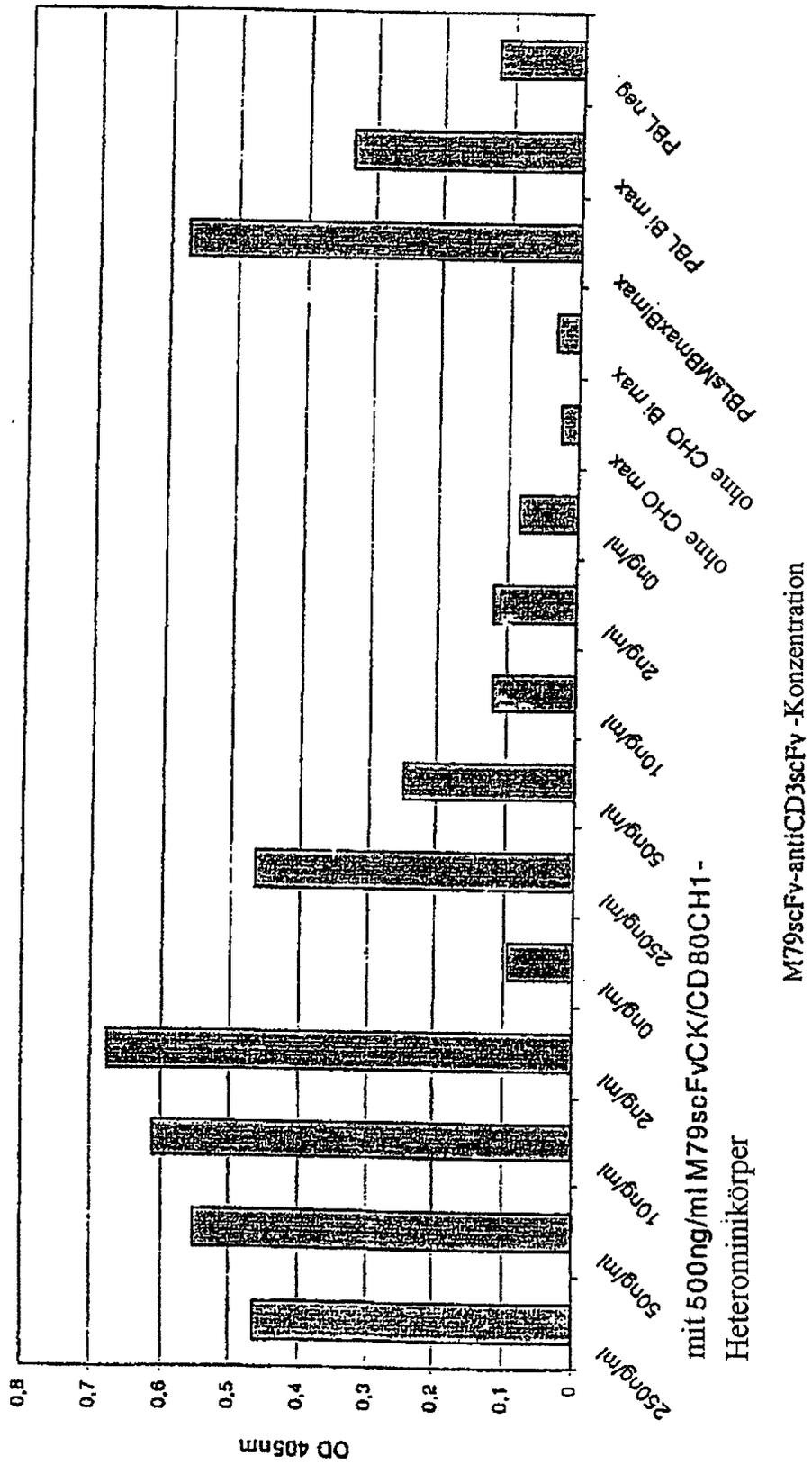


Figur 11

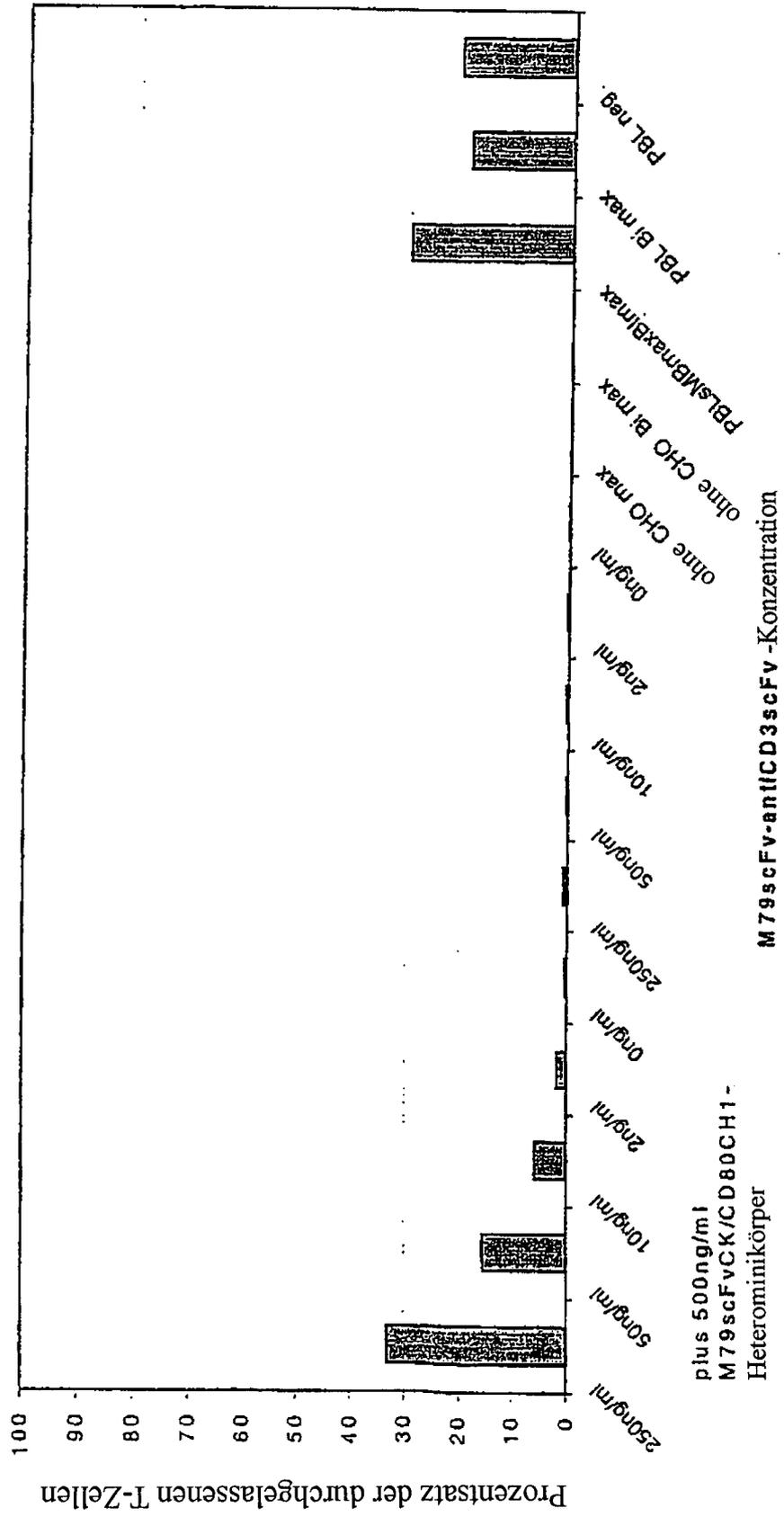


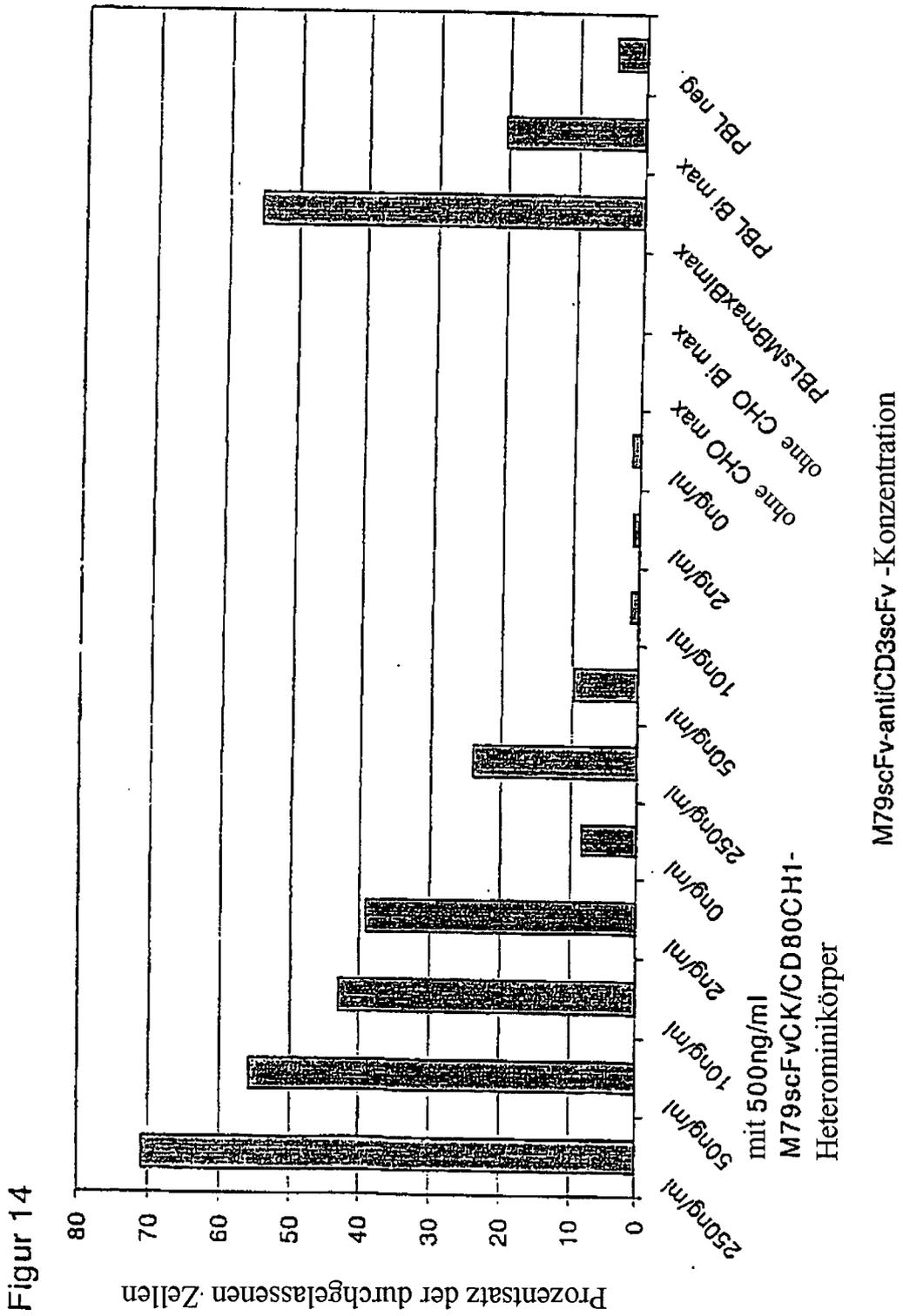
- M79 auf 17-1A-transfizierten CHO-Zellen
- M79 auf untransfizierten CHO-Zellen
- - - M79 auf Kato-Zellen

Figur 12

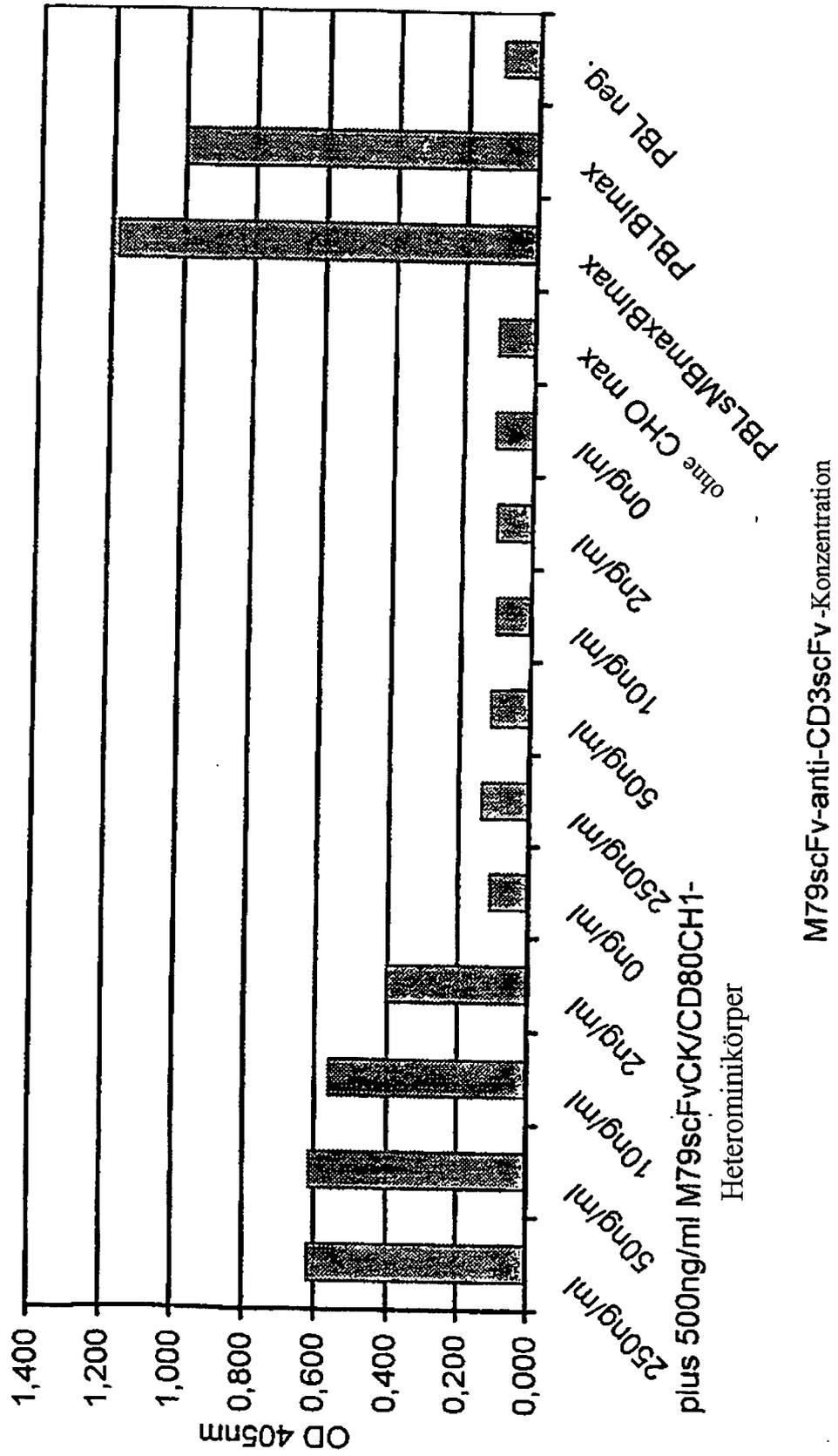


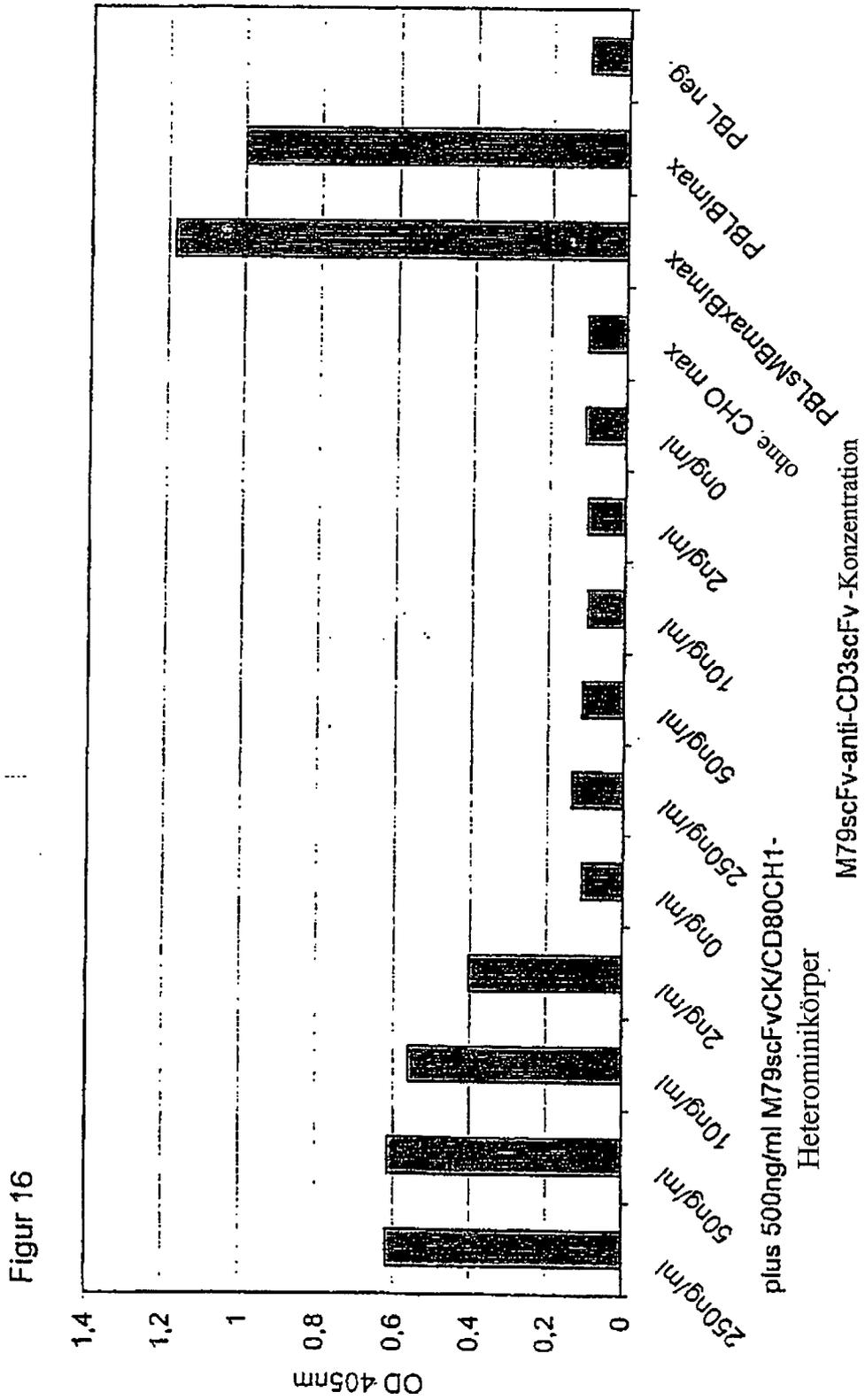
Figur 13



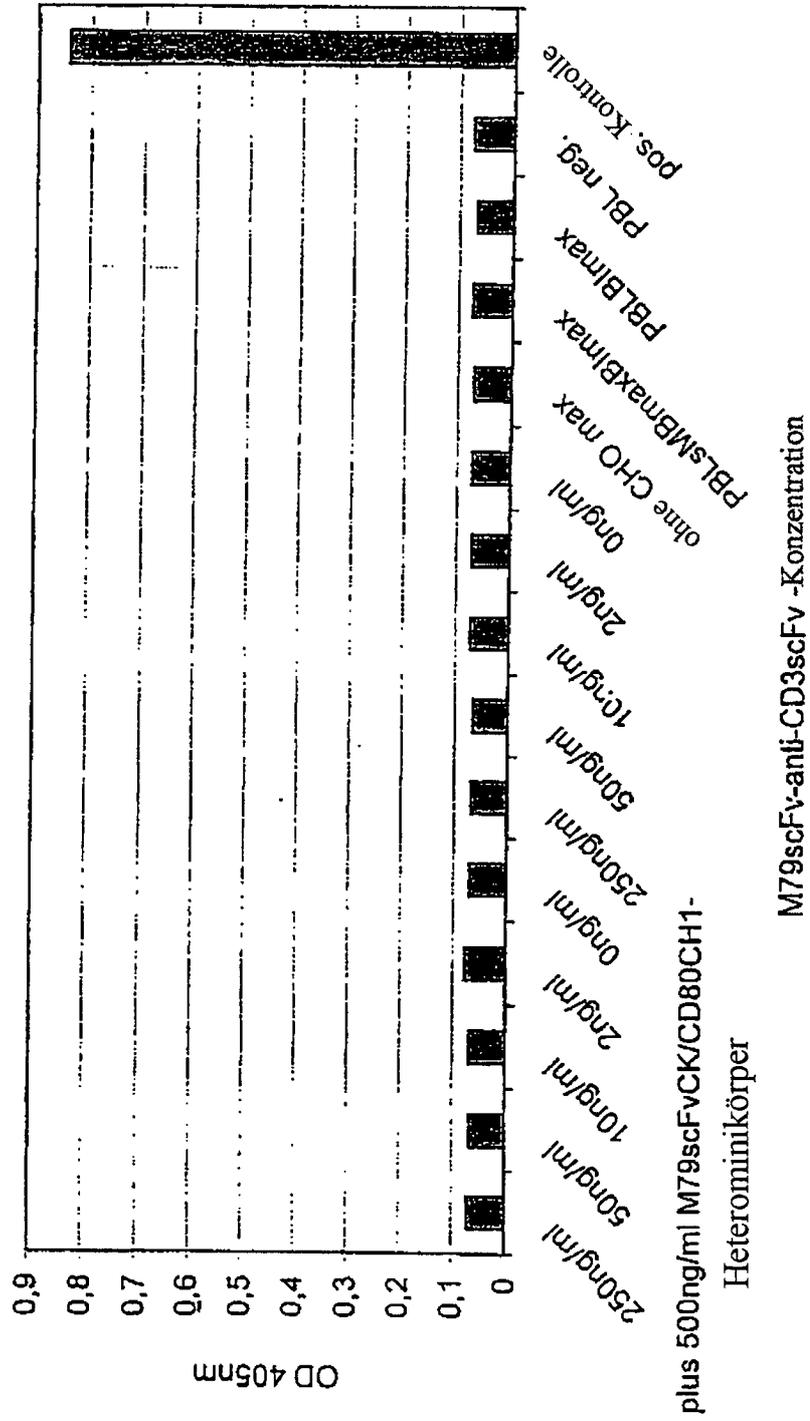


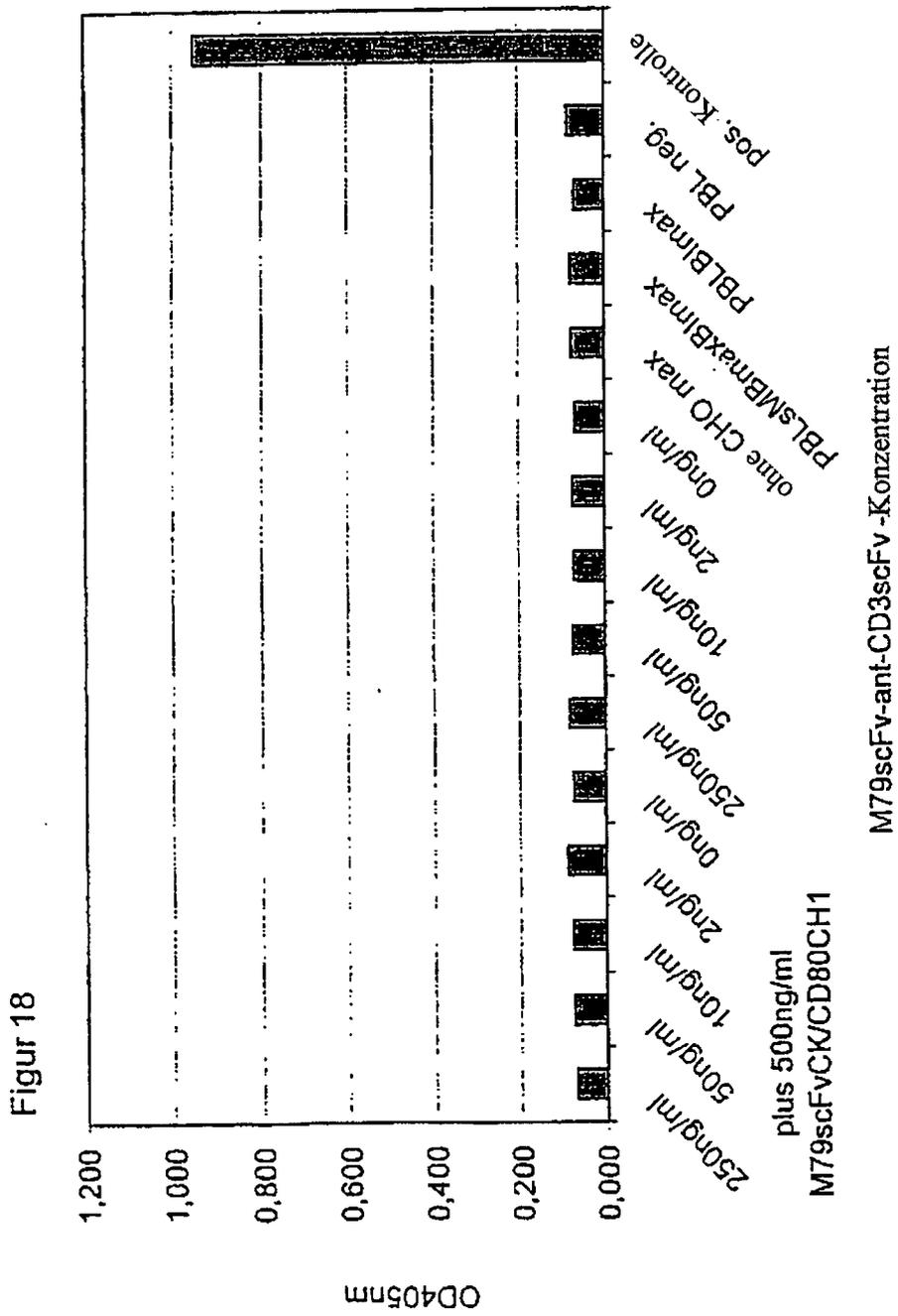
Figur 15



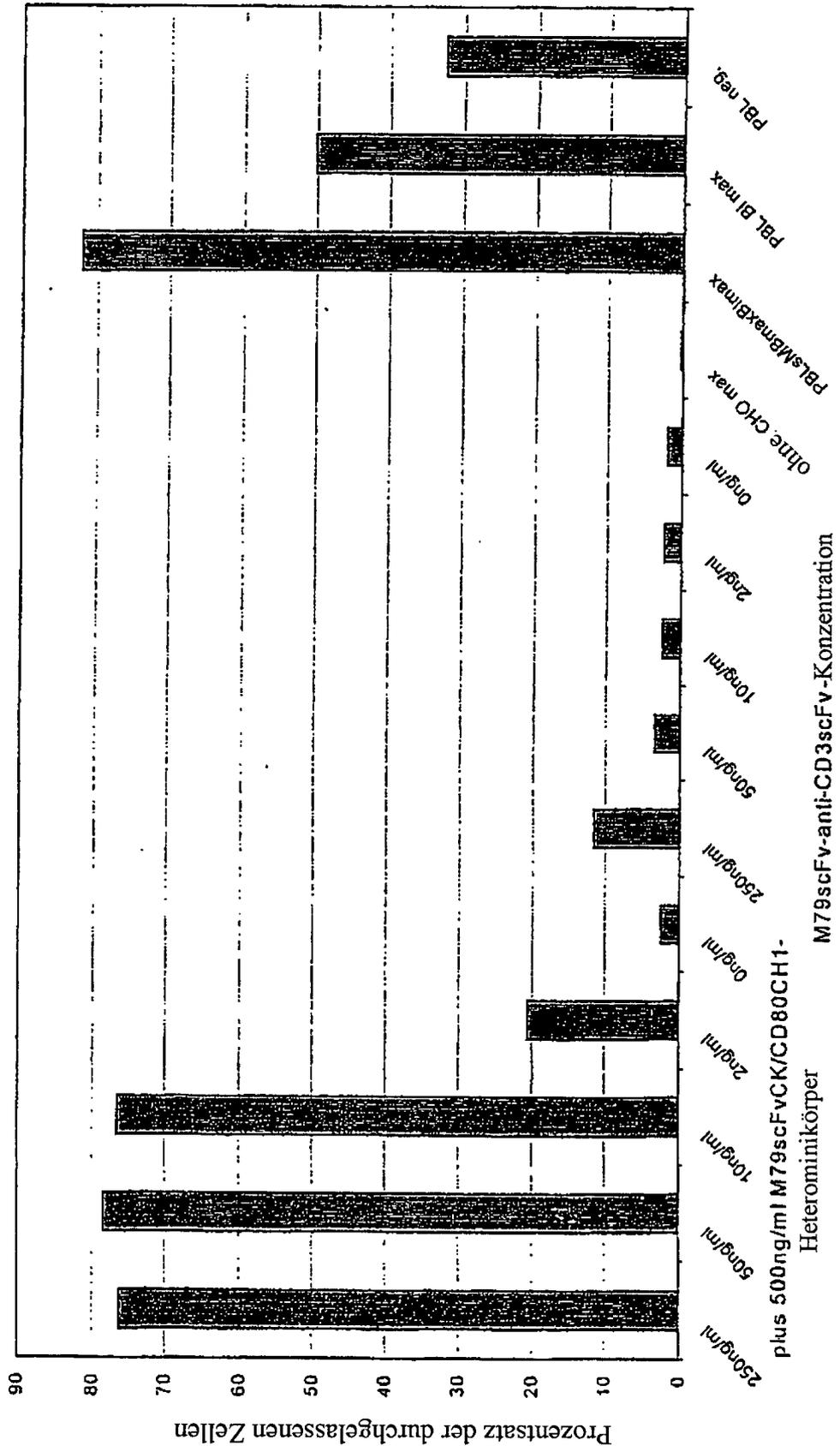


Figur 17

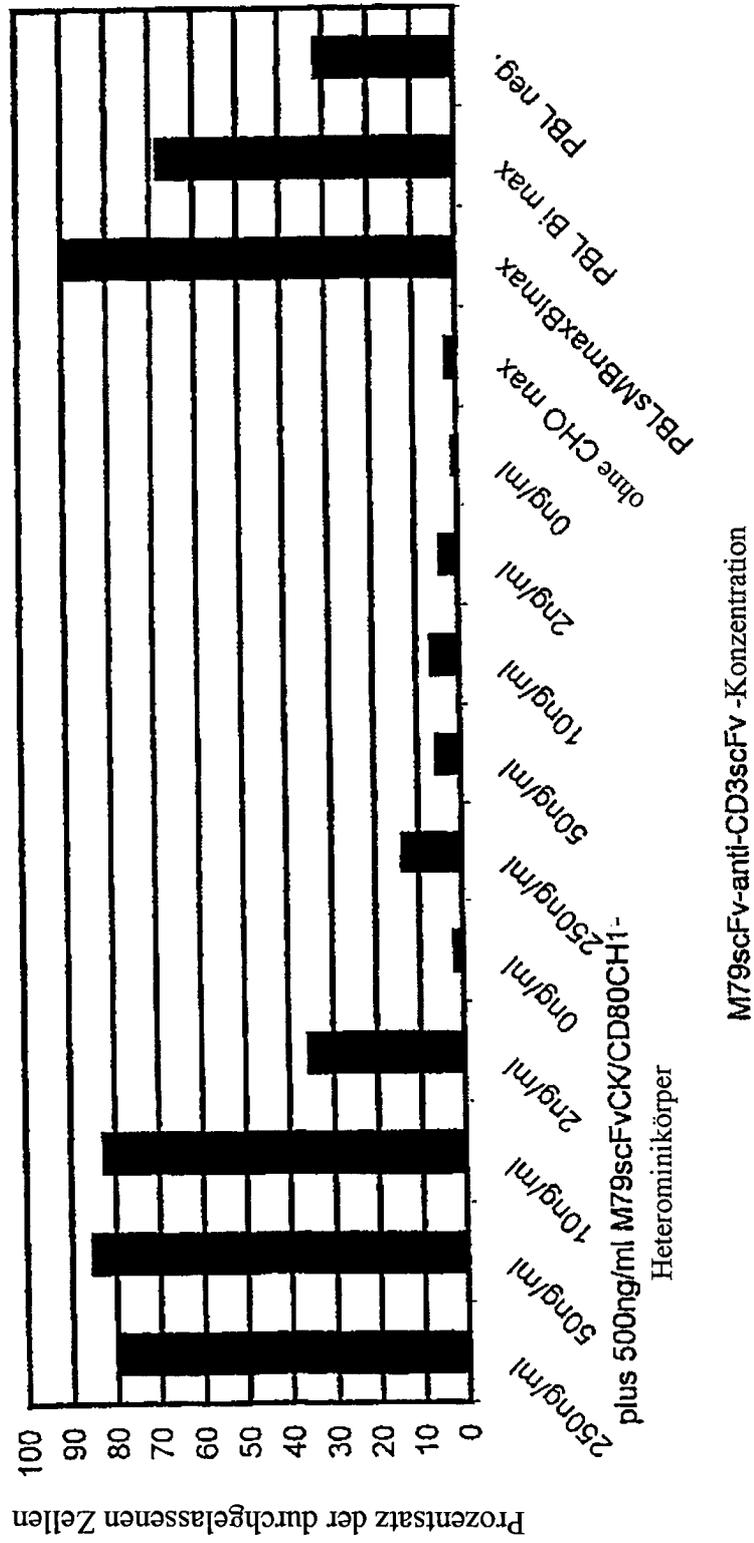


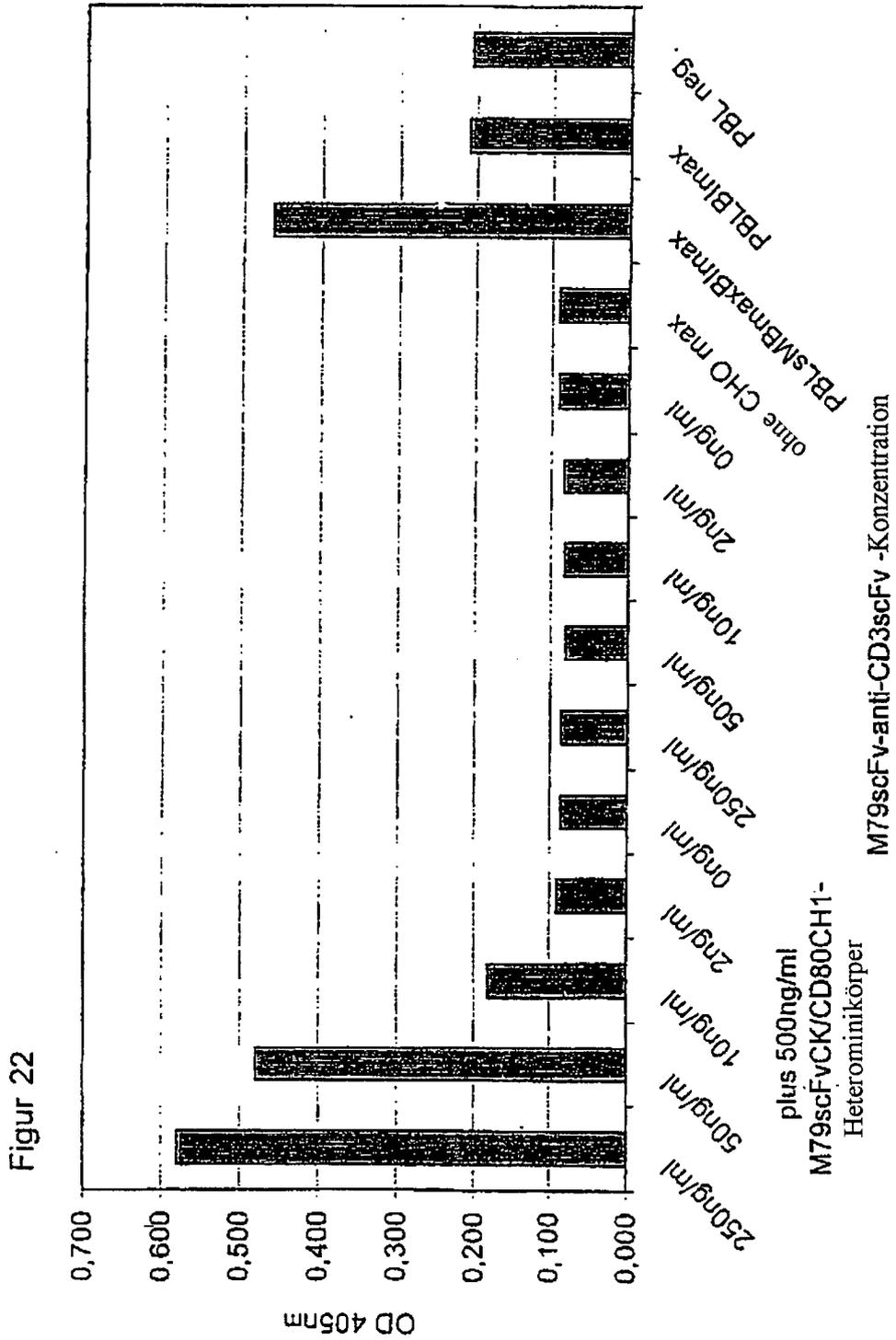


Figur 20

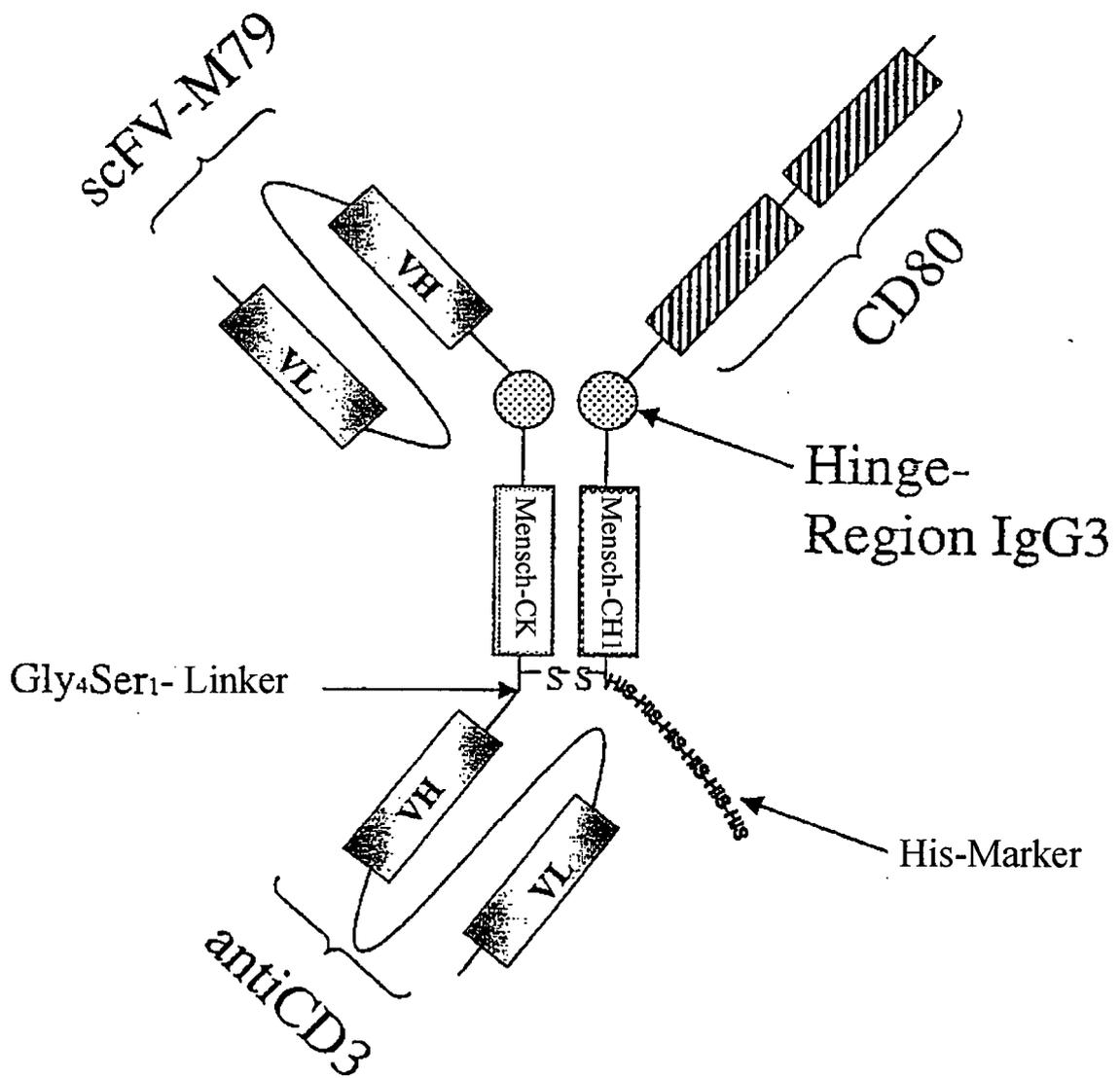


Figur 21



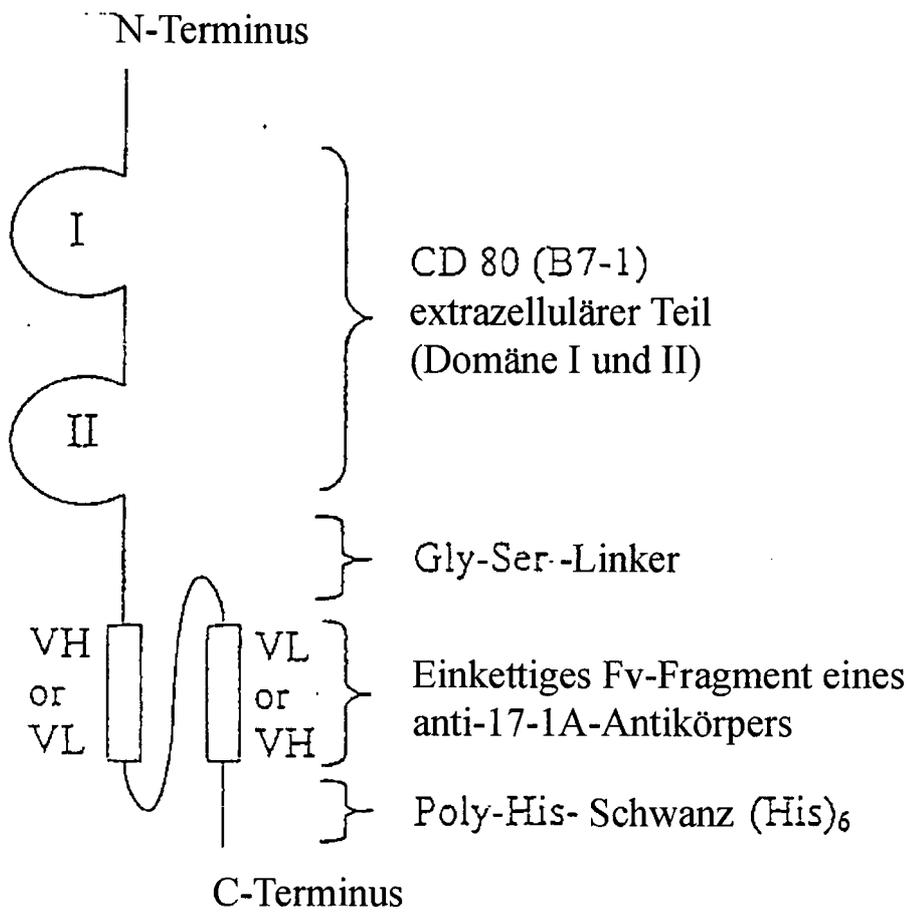


Figur 23

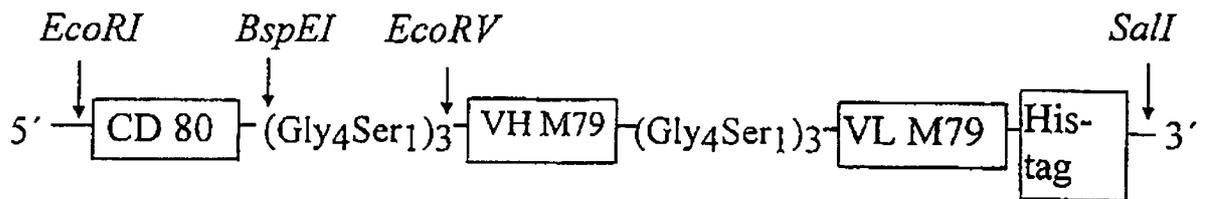
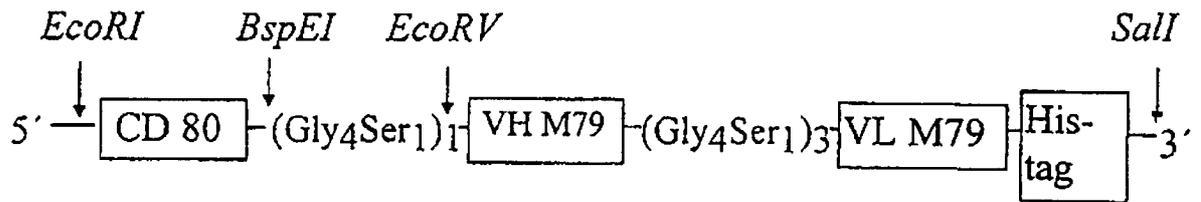
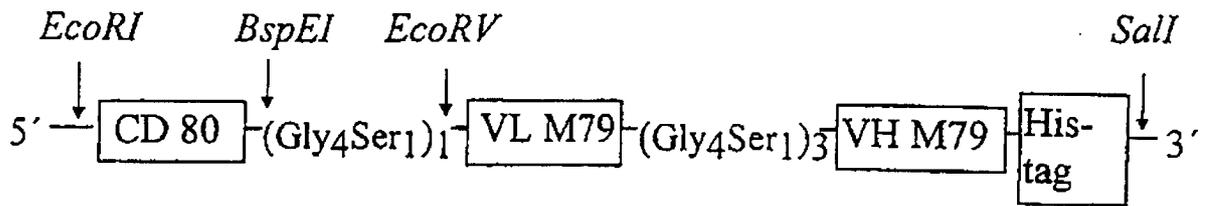


Figur 24

Rekombinantes bifunktionales, einkettiges Protein



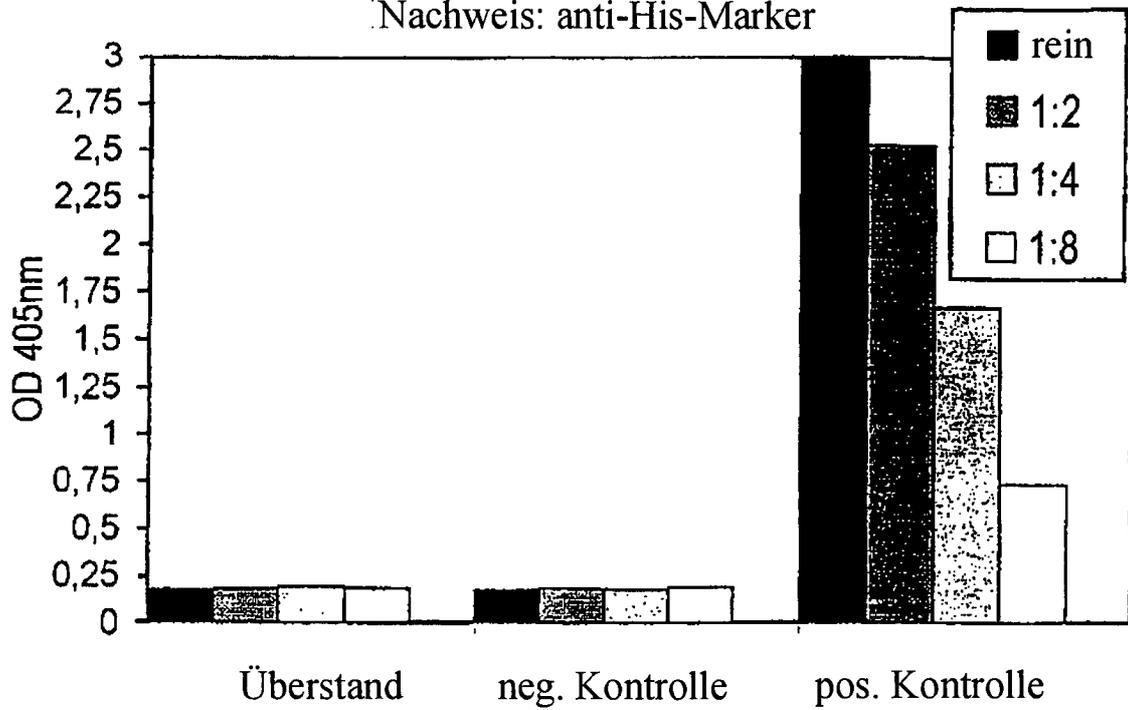
Figur 25



His-tag = His-Marker

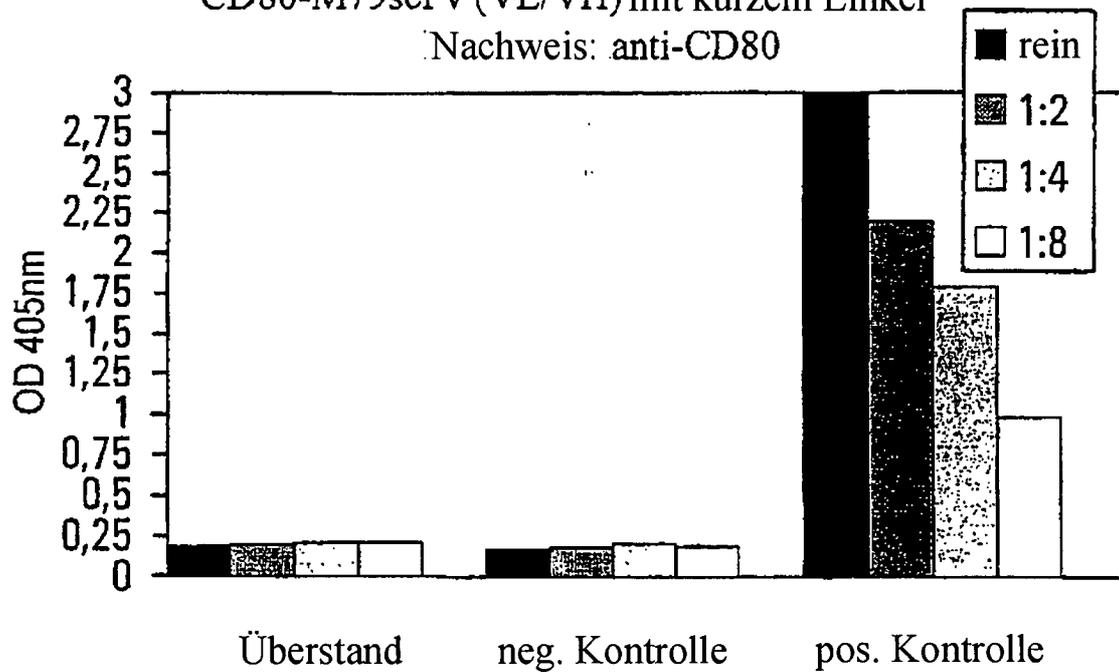
Figur 26

ELISA-Analyse
 CD80-M79scFv (VL/VH) mit kurzem Linker
 Nachweis: anti-His-Marker



Figur 27

ELISA-Analyse
 CD80-M79scFv (VL/VH) mit kurzem Linker
 Nachweis: anti-CD80

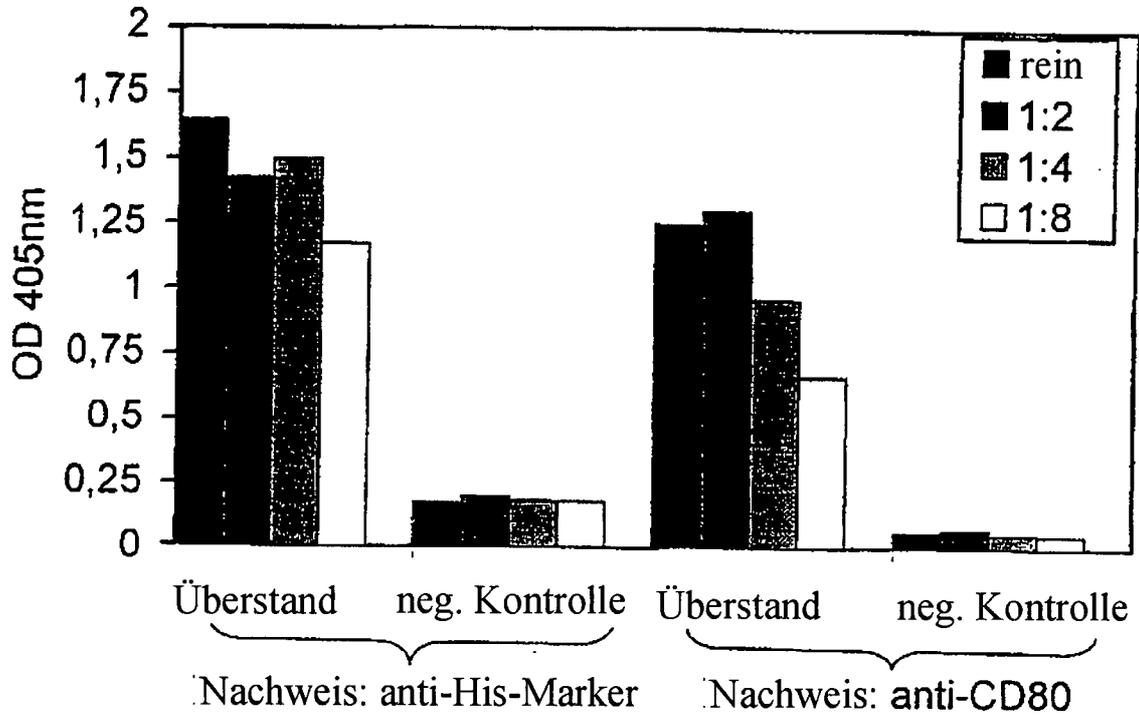


Figur 28

ELISA-Analyse

CD80-M79scFv (VL/VH) mit kurzem Linker

Nachweis: anti-His-Marker oder anti-CD80 (wie angegeben)

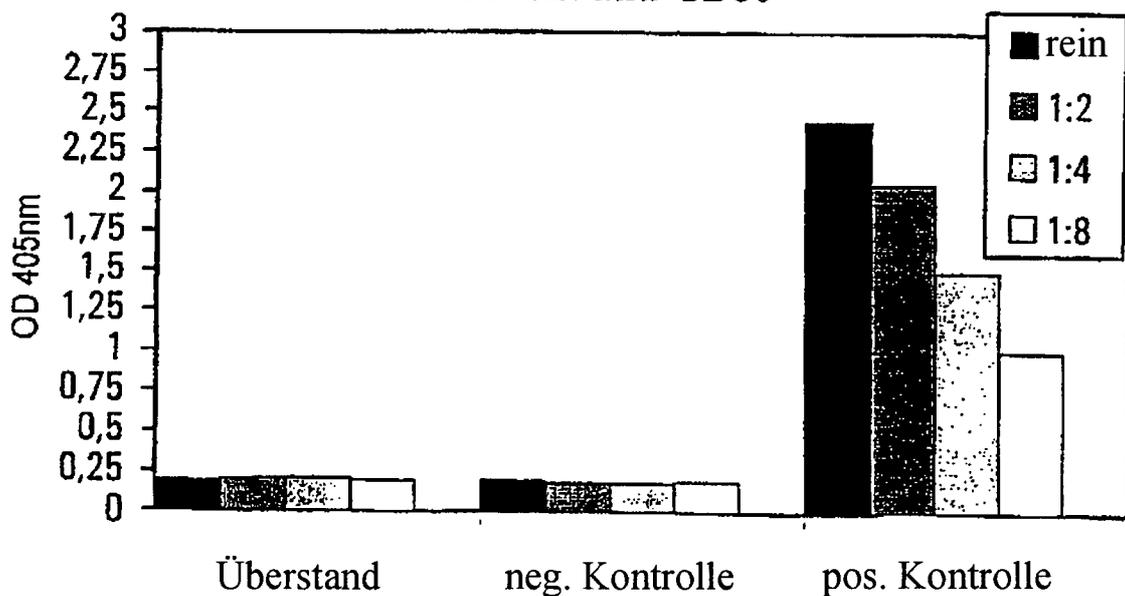


Figur 29

ELISA-Analyse

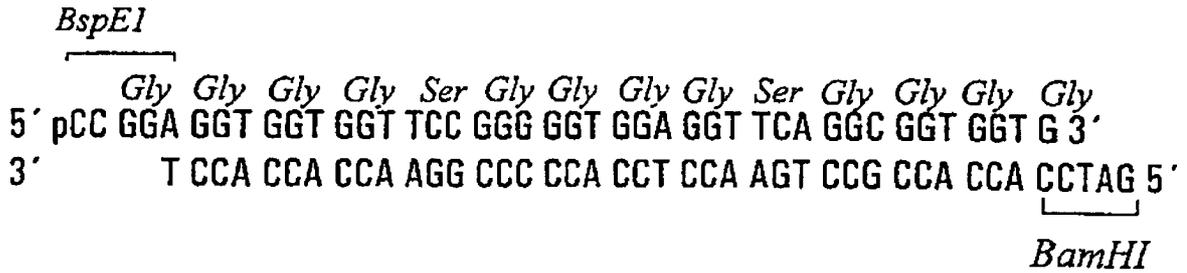
CD80-M79 scFv (VH/VL) mit kurzem Linker

Nachweis: anti-CD80



Figur 30

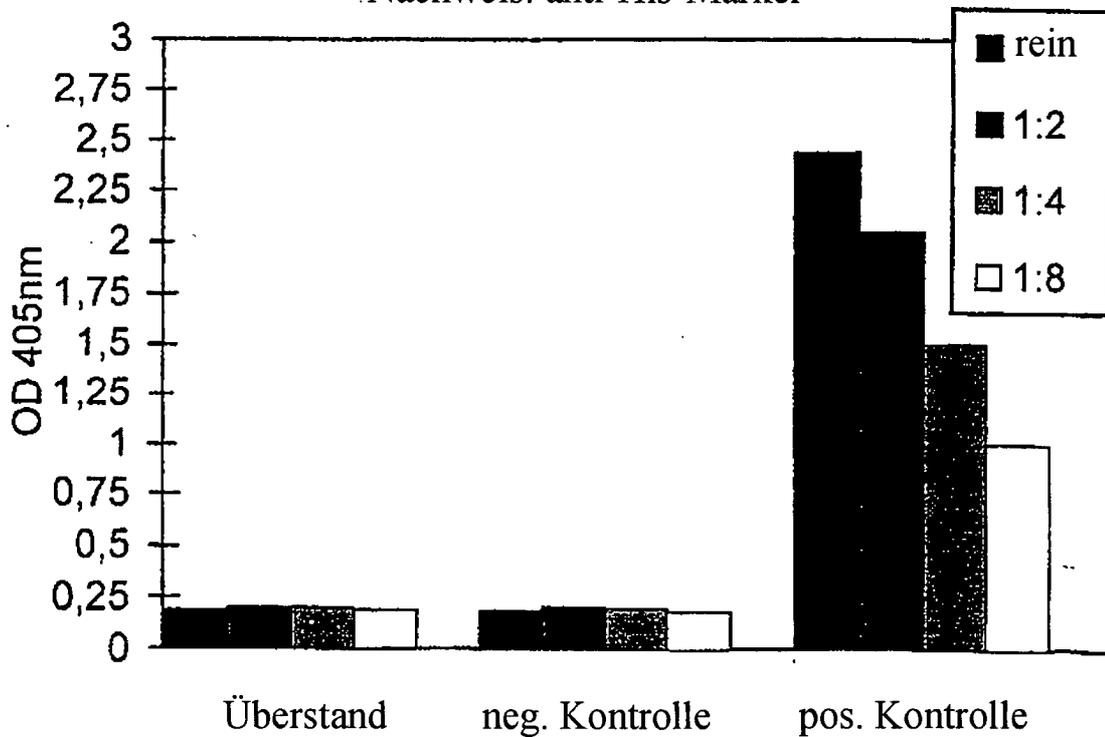
DNA-Sequenz des als ACCGS15 BAM bezeichneten doppelsträngigen Oligonucleotids



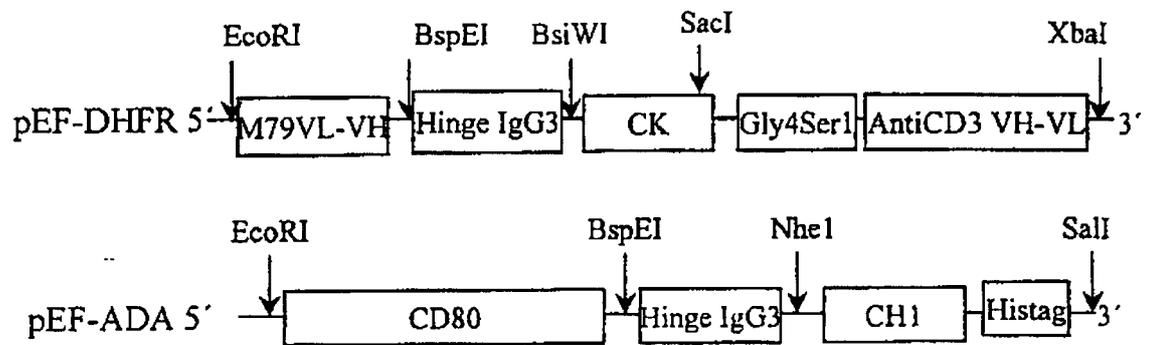
Figur 31

ELISA-Analyse
 CD80-M79scFv (VH/VL) mit langem Linker

Nachweis: anti-His-Marker

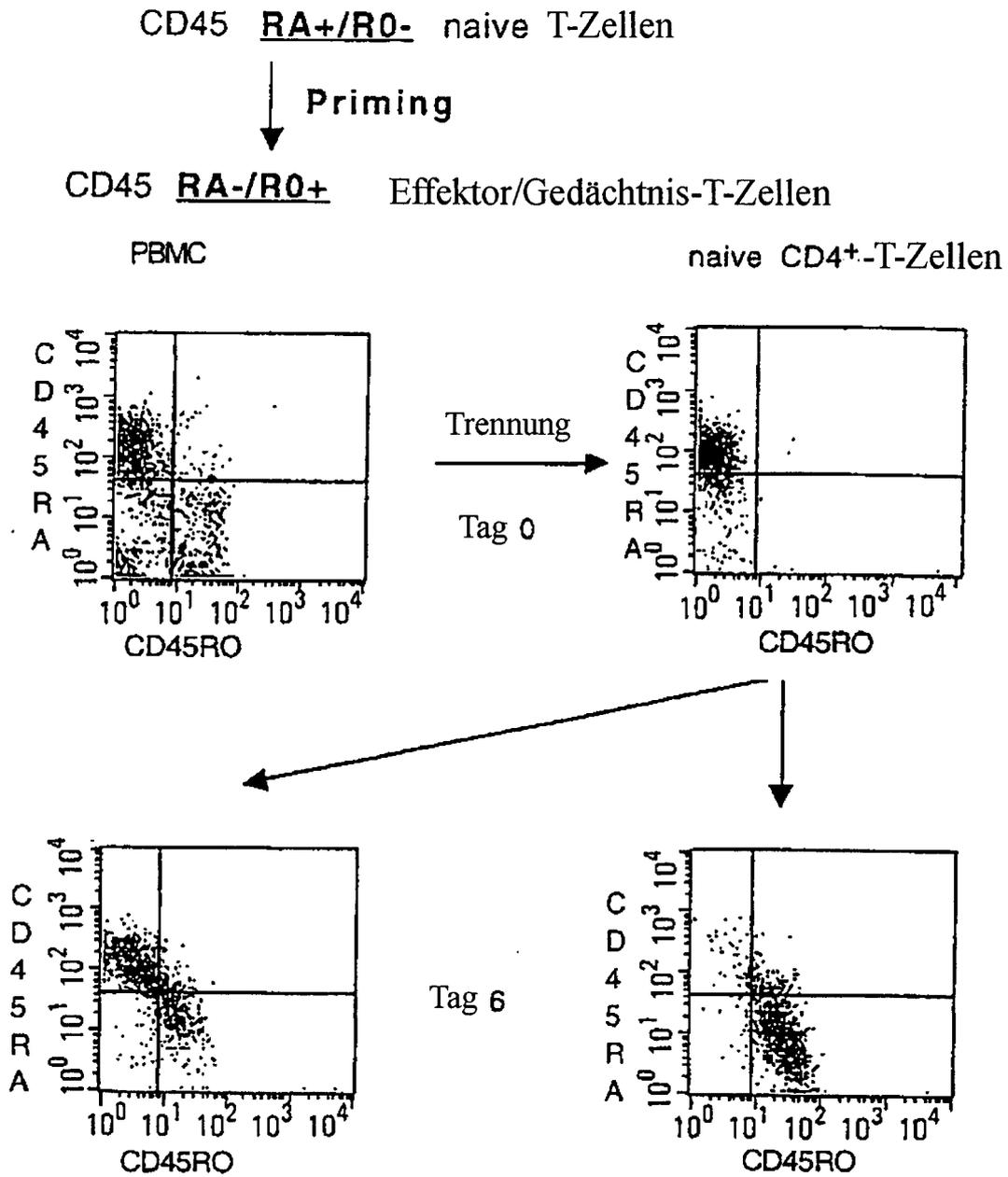


Figur 32



Hinge IgG3 = Hinge-Region IgG3; Histag = His-Marker

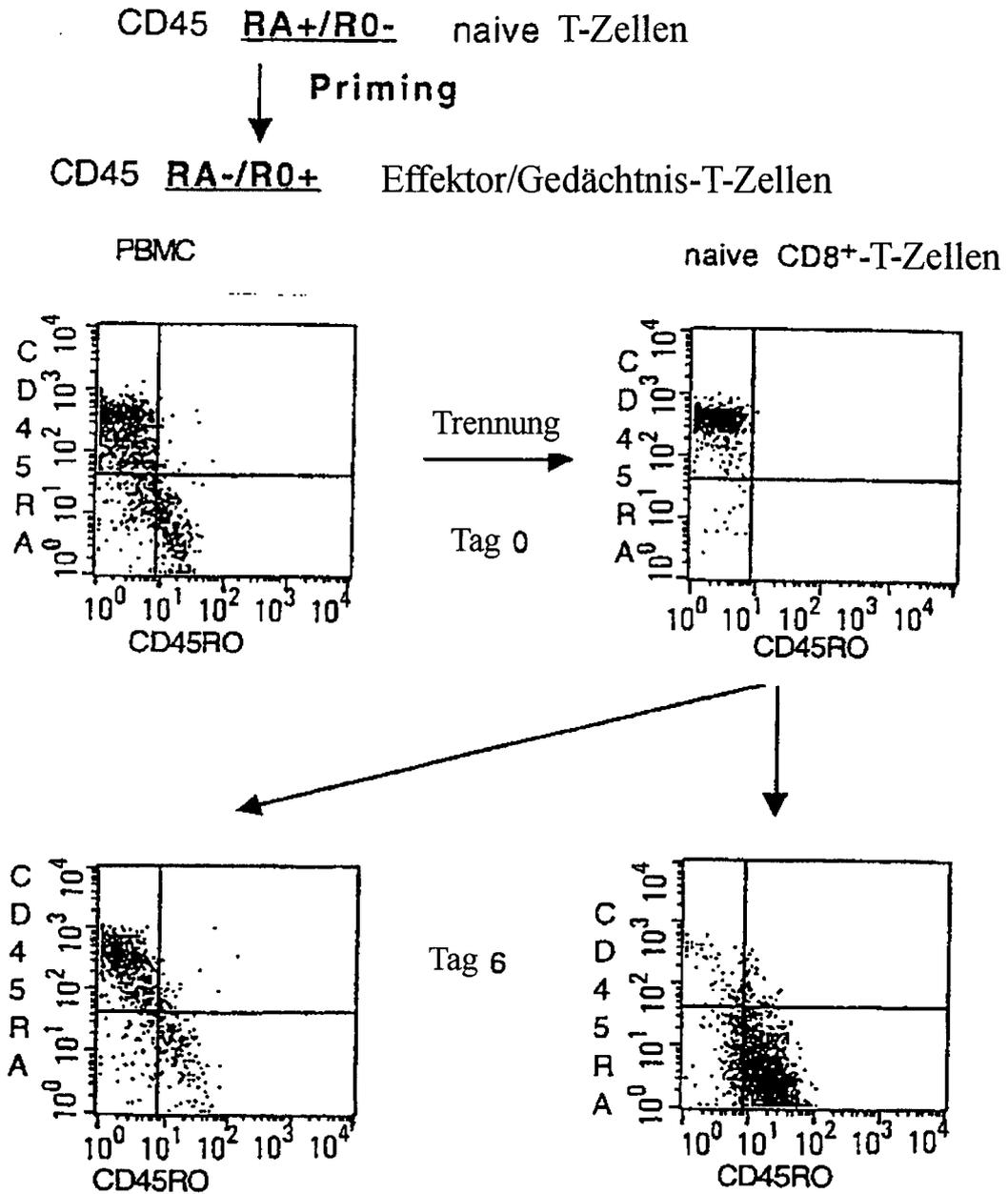
Figur 33 Phänotypwechsel



Primäres Signal allein :
M79scFv-antiCD3scFv

Primäres und co-stimulierendes Signal:
M79scFv-antiCD3scFv- und
M79scFvCK/CD80CH1-
Heterominkörper

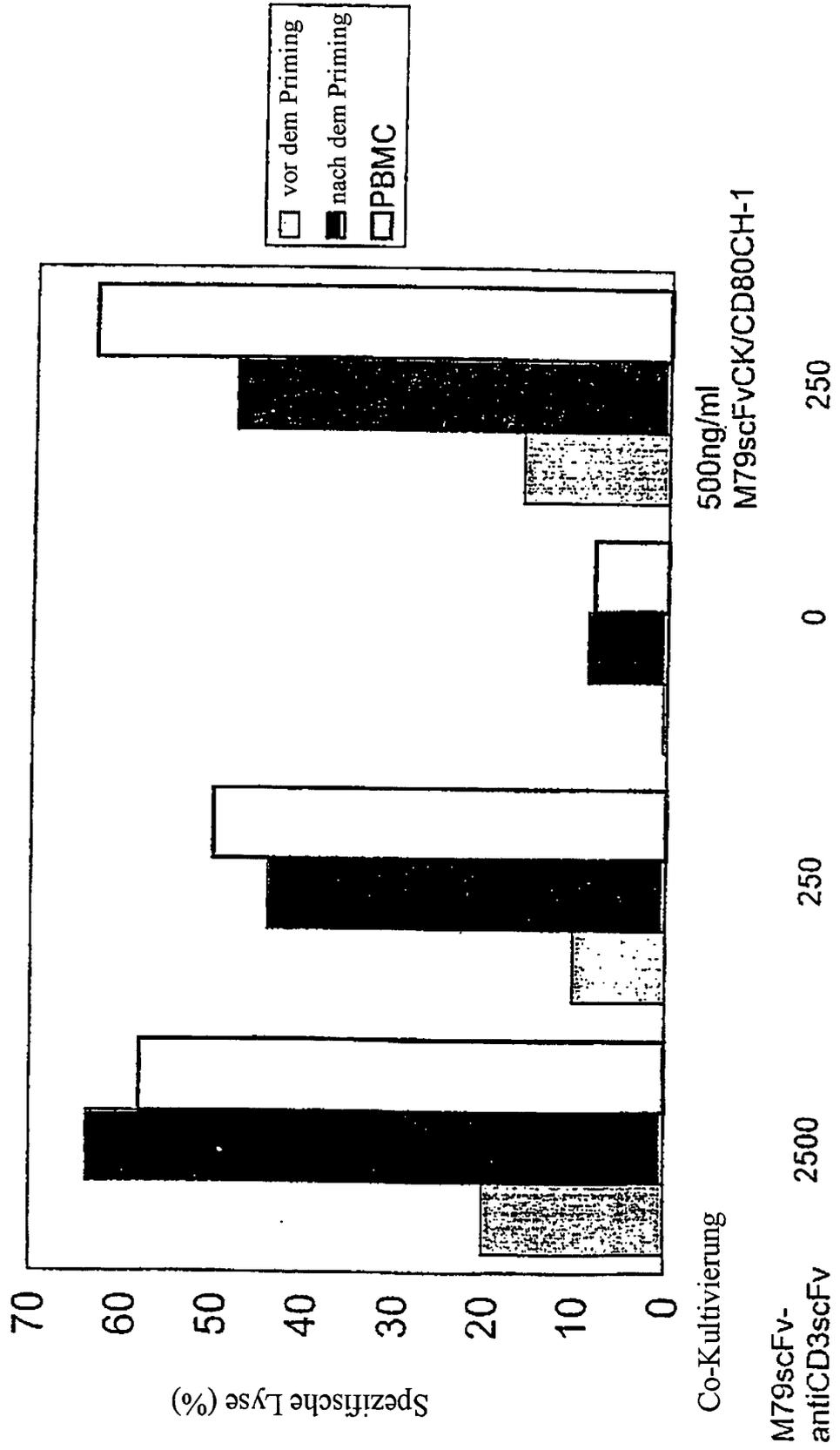
Figur 34 Phänotypwechsel



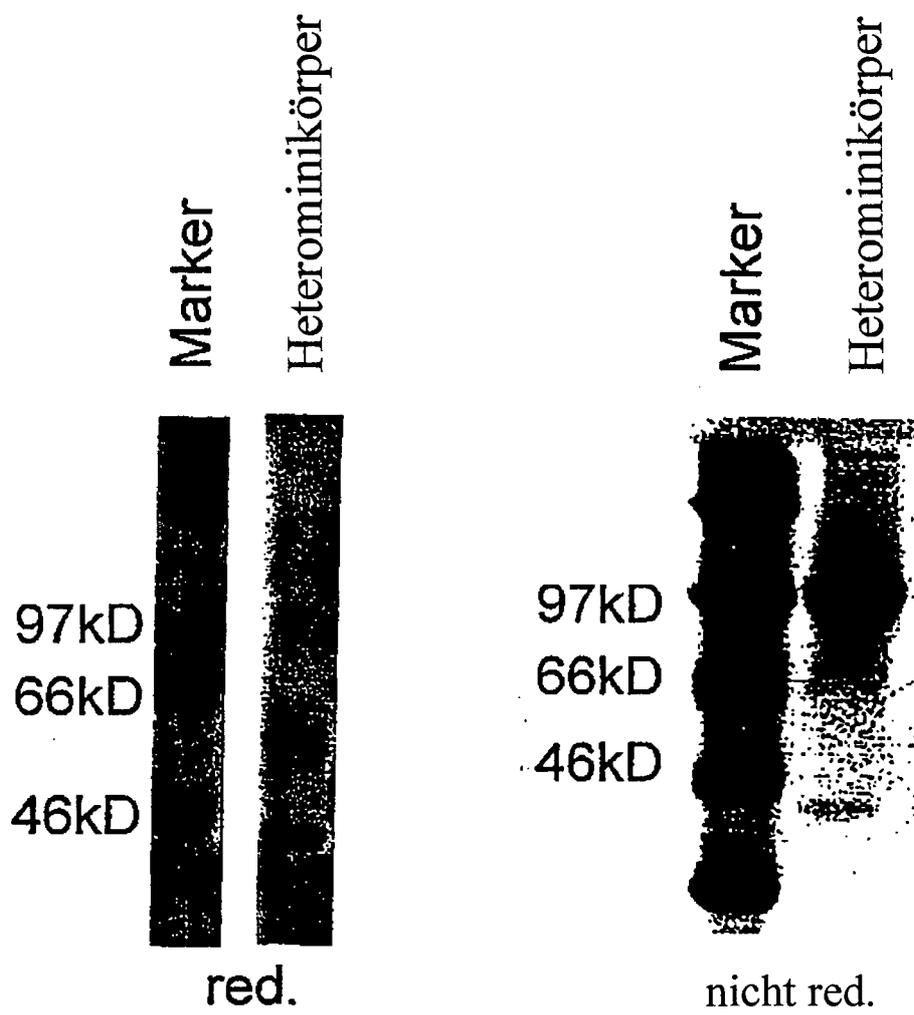
Primäres Signal allein :
M79scFv-antiCD3scFv

Primäres und co-stimulierendes Signal:
M79scFv-antiCD3scFv- und
M79scFvCK/CD80CH1-
Heterominikörper

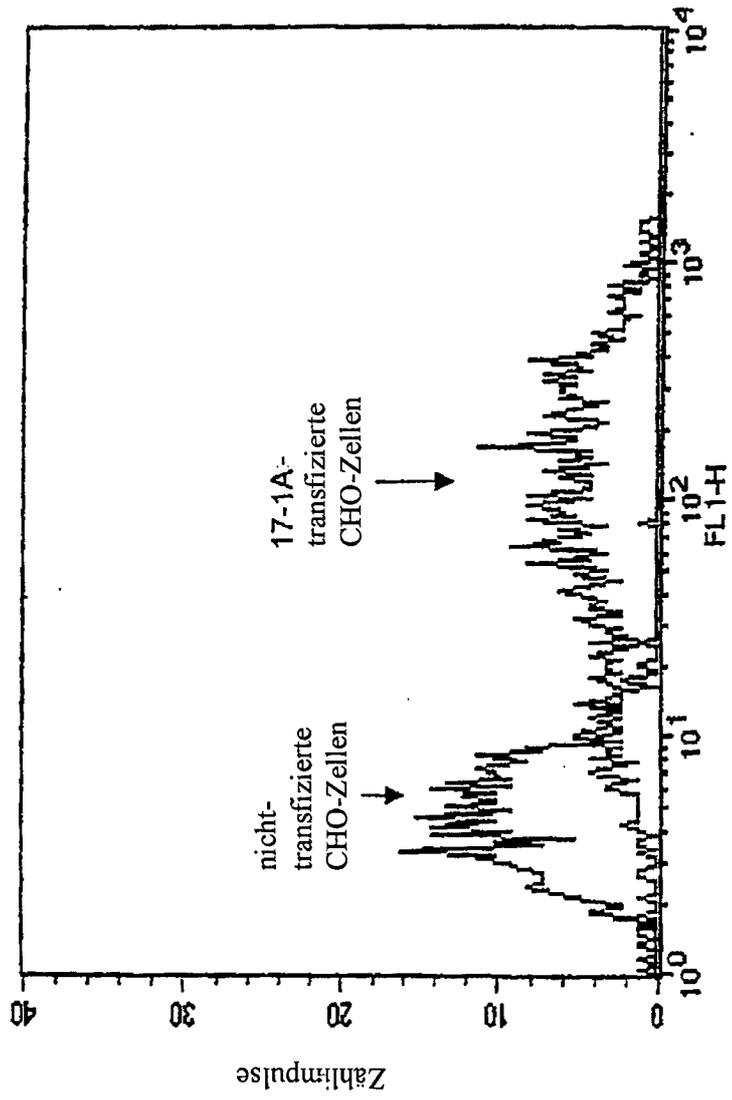
Figur 35

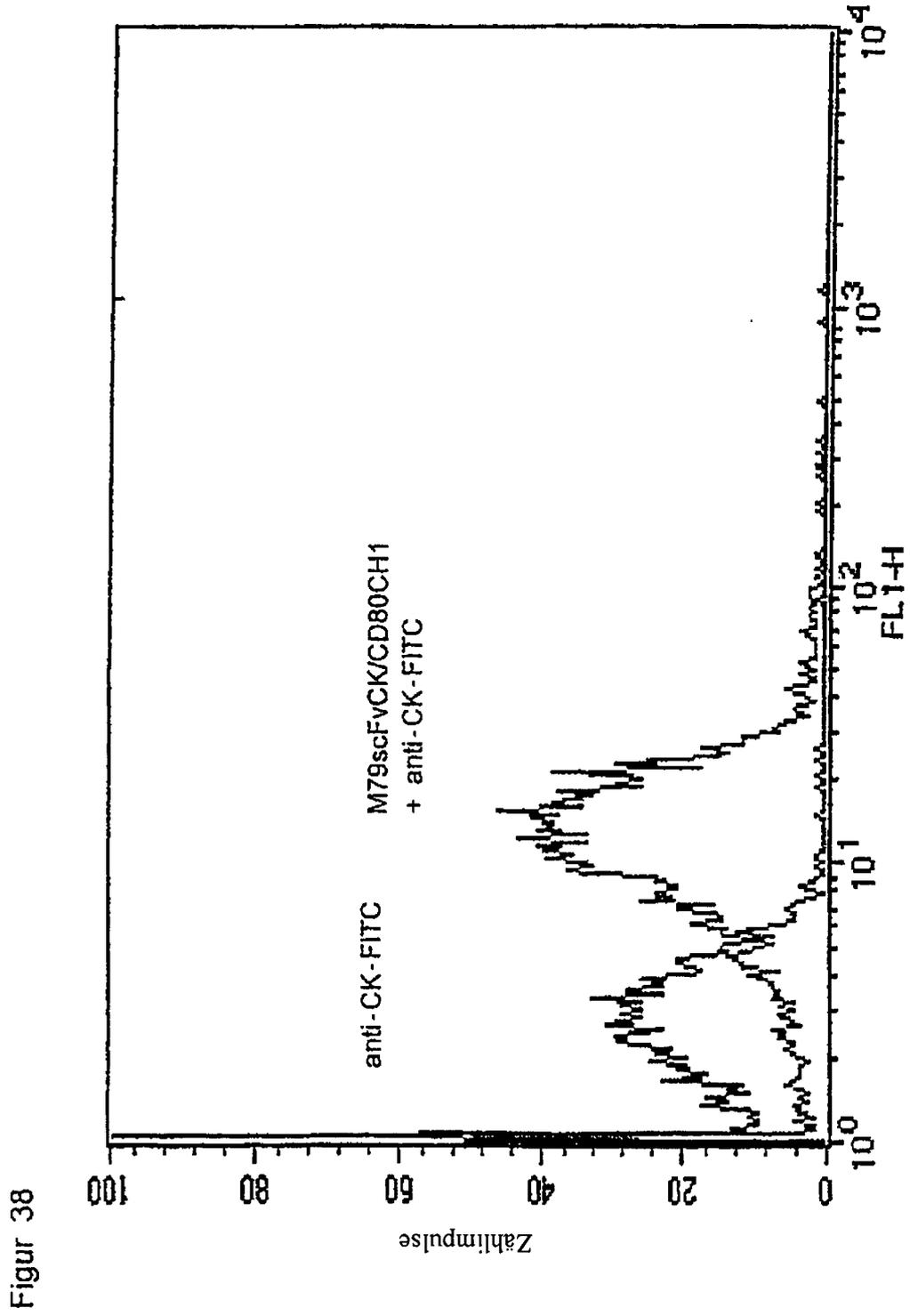


Figur 36

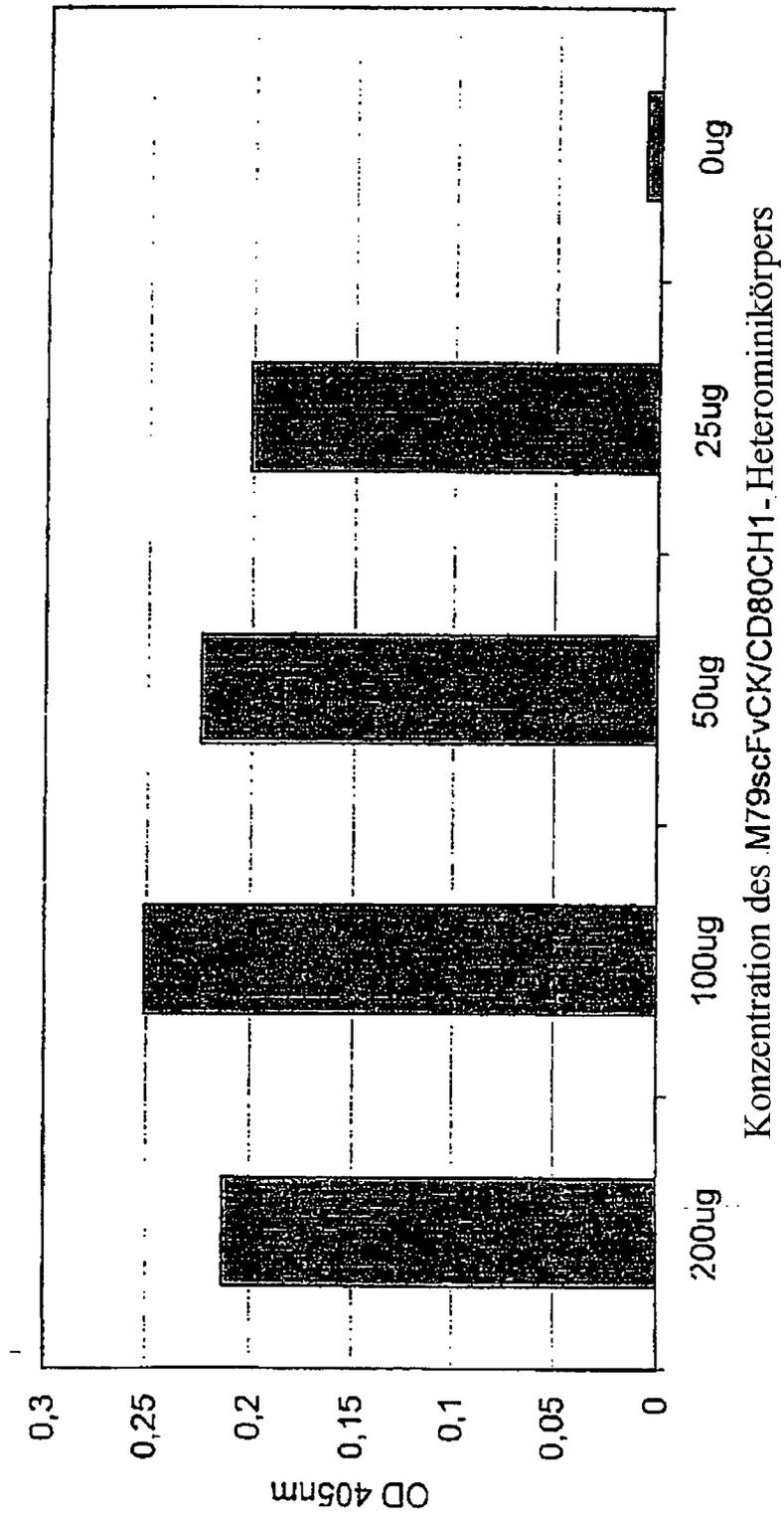


Figur 37

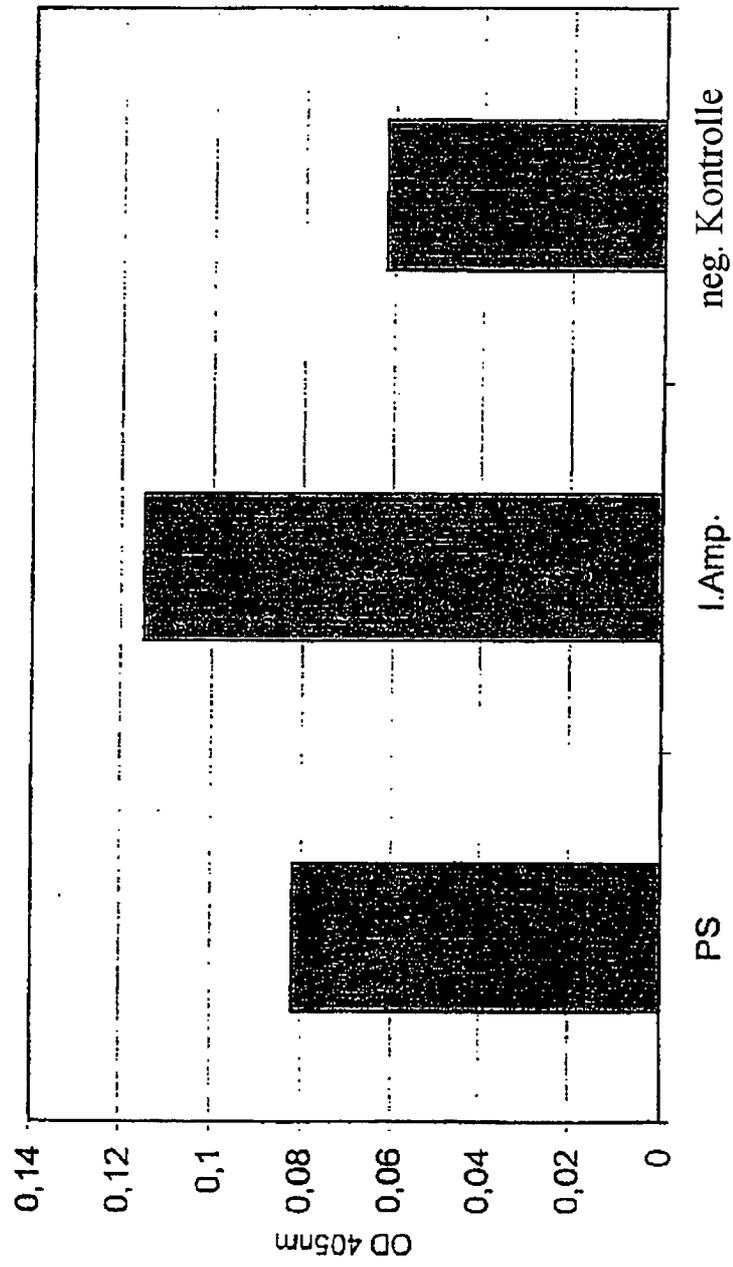




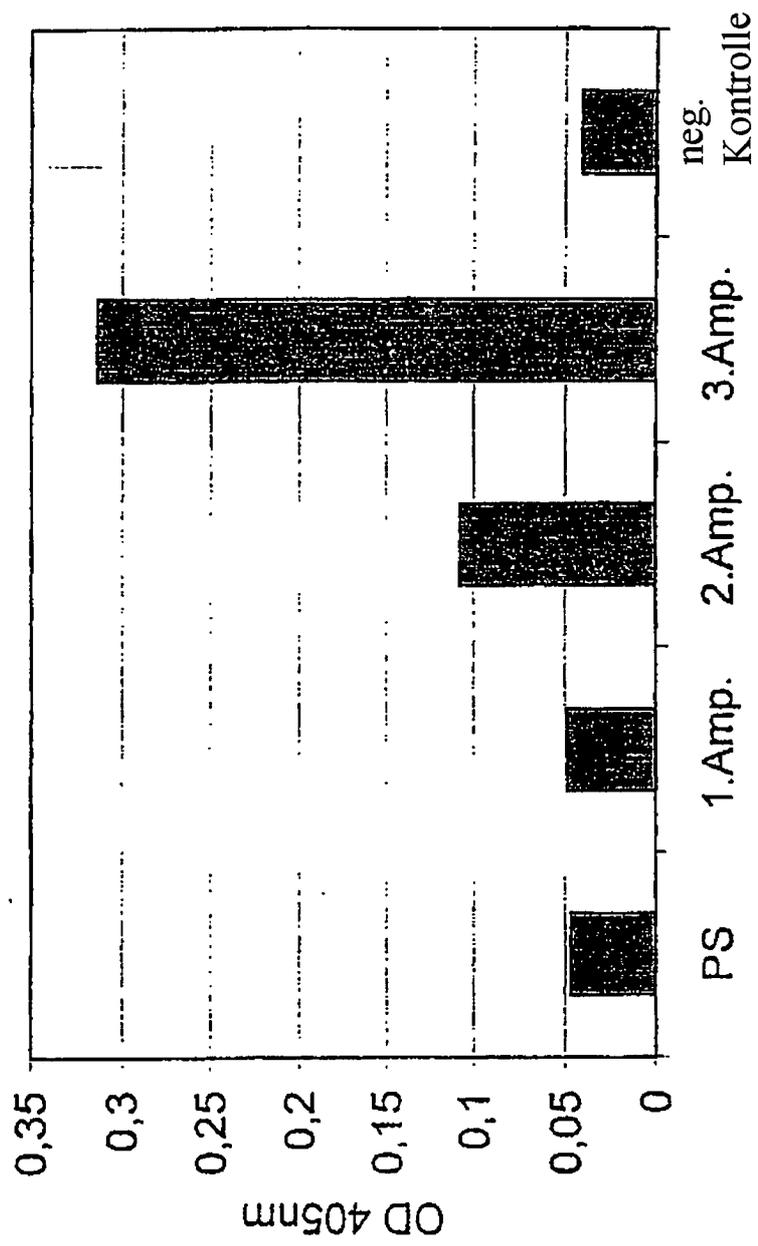
Figur 39



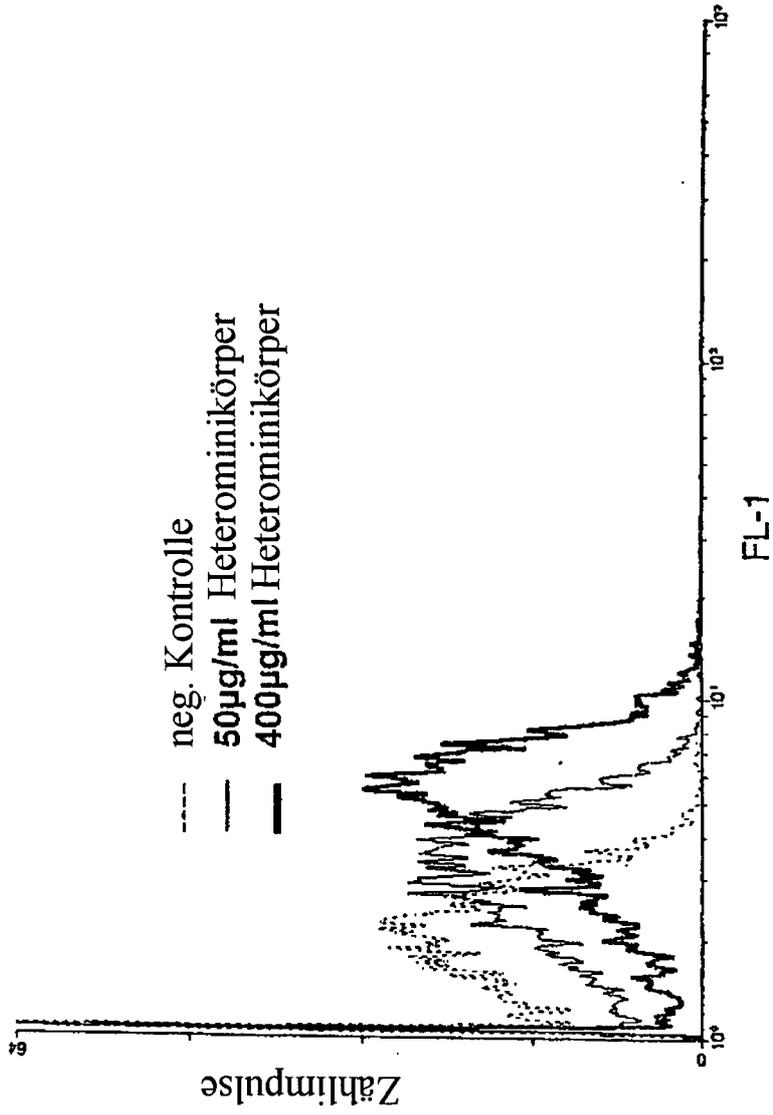
Figur 40



Figur 41



Figur 24



Figur 43

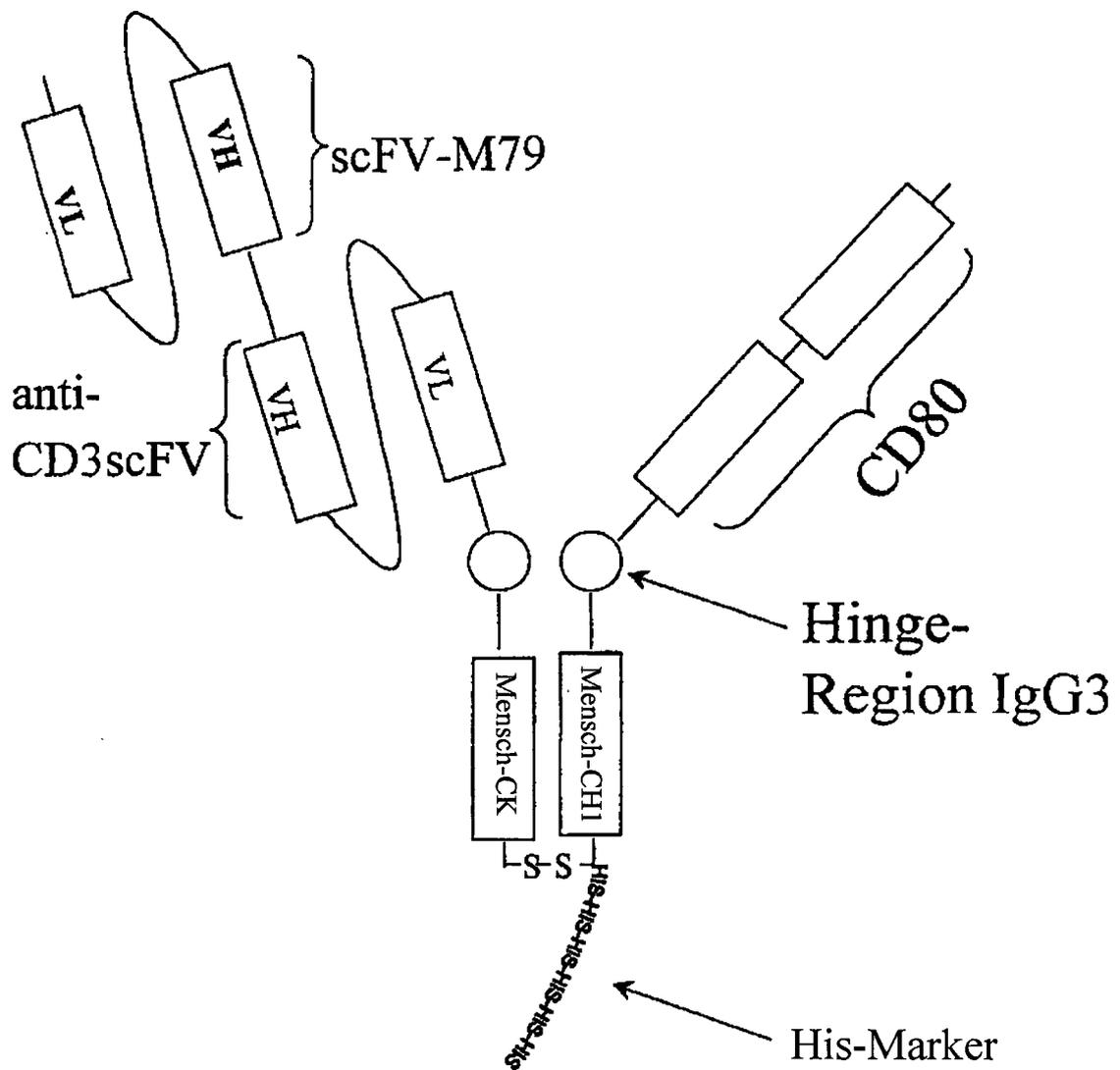
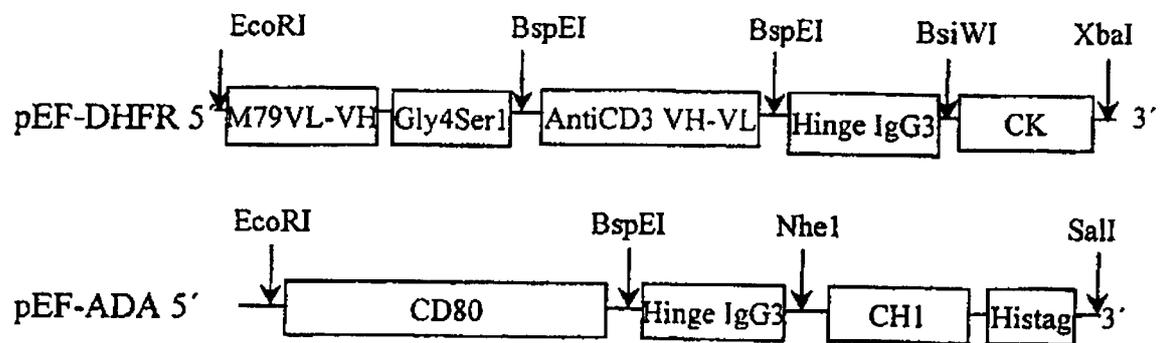
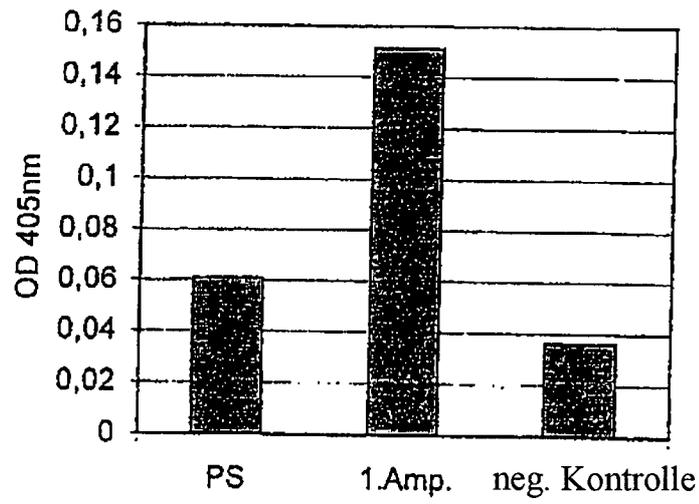


Fig 44

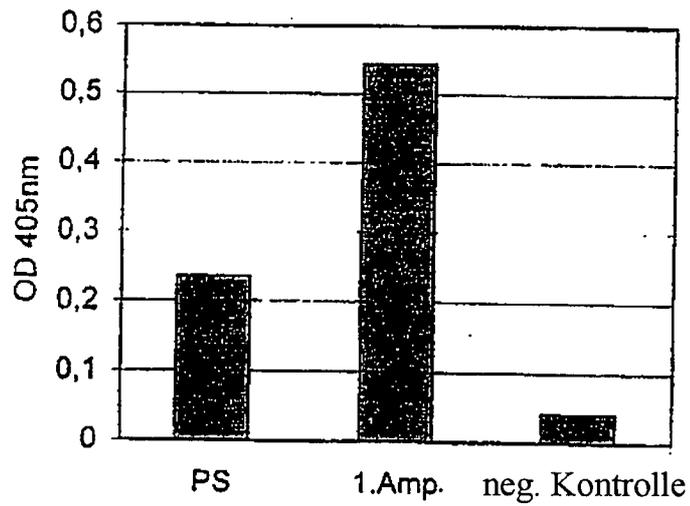


Hinge IgG3 = Hinge-Region IgG3; Histag = His-Marker

Figur 45



Figur 46



Figur 47 (Fortsetzung)

		557		666		675		684		693		702					
AAT	TCC	AAG	AGC	CAA	GTT	TTC	TTT	AAA	ATG	AAC	AGT	CTG	CAA	GCT	AAT	GAC	ACA
N	S	K	S	Q	V	F	F	K	M	N	S	L	Q	A	N	D	T
		711		720		729		738		747		756					
GCC	ATA	TAT	TAC	TGT	GCC	AGA	ATG	GAG	AAC	TGG	TCG	TTT	GCT	TAC	TGG	GGC	CAA
A	I	Y	Y	C	A	R	M	E	N	W	S	F	A	Y	W	G	Q
		765		774		783		792		801		810					
GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	GAA	TTC	CCC	AAA	CCT	AGC	ACC	CCC	CCT	GGC	AGC
G	T	T	V	T	V	S	E	F	P	K	P	S	T	P	P	G	S
		819		828		837		846		855		864					
AGT	GGT	GAA	CTG	GAA	GAG	CTG	CTT	AAG	CAT	CTT	AAA	GAA	CTT	CTG	AAG	GGC	CCC
S	G	E	L	E	E	L	L	K	H	L	K	E	L	L	K	G	P
		873		882		891		900		909		918					
CGC	AAA	GGC	GAA	CTC	GAG	GAA	CTG	CTG	AAA	CAT	CTG	AAG	GAG	CTG	CTT	AAA	GGT
R	K	G	E	L	E	E	L	L	K	H	L	K	E	L	L	K	G
		927		936		945		954		963		972					
GGG	AGC	GGA	GGC	GCG	CCG	GCA	CCT	ACT	TCA	AGT	TCT	ACA	AAG	AAA	ACA	CAG	CTA
G	S	G	G	A	P	A	P	T	S	S	S	T	K	K	T	Q	L
		981		990		999		1008		1017		1026					
CAA	CTG	GAG	CAT	TTA	CTG	CTG	GAT	TTA	CAG	ATG	ATT	TTG	AAT	GGA	ATT	AAT	AAT
Q	L	E	H	L	L	L	D	L	Q	M	I	L	N	G	I	N	N
		1035		1044		1053		1062		1071		1080					
TAC	AAG	AAT	CCC	AAA	CTC	ACC	AGG	ATG	CTC	ACA	TTT	AAG	TTT	TAC	ATG	CCC	AAG
Y	K	N	P	K	L	T	R	M	L	T	F	K	F	Y	M	P	K
		1089		1098		1107		1116		1125		1134					
AAG	GCC	ACA	GAA	CTG	AAA	CAT	CTT	CAG	TGT	CTA	GAA	GAA	GAA	CTC	AAA	CCT	CTG
K	A	T	E	L	K	H	L	Q	C	L	E	E	E	L	K	P	L
		1143		1152		1161		1170		1179		1188					
GAG	GAA	GTG	CTA	AAT	TTA	GCT	CAA	AGC	AAA	AAC	TTT	CAC	TTA	AGA	CCC	AGG	GAC
E	E	V	L	N	L	A	Q	S	K	N	F	H	L	R	P	R	D
		1197		1206		1215		1224		1233		1242					
TTA	ATC	AGC	AAT	ATC	AAC	GTA	ATA	GTT	CTG	GAA	CTA	AAG	GGA	TCT	GAA	ACA	ACA
L	E	S	N	I	N	V	I	V	L	E	L	K	G	S	E	T	T
		1251		1260		1269		1278		1287		1296					
TTC	ATG	TGT	GAA	TAT	GCT	GAT	GAG	ACA	GCA	ACC	ATT	GTA	GAA	TTT	CTG	AAC	ACA
F	M	C	E	Y	A	D	E	T	A	T	I	V	E	F	L	N	R

Figur 47 (Fortsetzung)

	1305		1314		1323		1332		1341		1350						
TGG	ATT	ACC	TTT	TGT	CAA	AGC	ATC	ATC	TCA	ACA	CTG	ACT	GAC	GTC	CAT	CAC	CAT
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
W	I	T	F	C	Q	S	I	I	S	T	L	T	D	V	H	H	H
					SalI												
	1359				-----												
CAC	CAT	CAC	TGA	TAA	GTC	GAC											
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----											
H	H	H	*	*													

Figur 48:

	EcoRI																		
5'	GAA	TTC	ACC	ATG	GGA	TGG	AGC	TGT	ATC	ATC	CTC	TTC	TTG	GTA	GCA	ACA	GCT	ACA	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
				M	G	W	S	C	I	I	L	F	L	V	A	T	A	T	
	GGT	GTA	CAC	TCC	GAT	ATC	CAG	CTG	ACC	CAG	TCT	CAA	AAA	TTC	ATG	TCC	ACA	TCA	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	G	V	H	S	D	I	Q	L	T	Q	S	Q	K	F	M	S	T	S	
	GTA	GGA	GAC	AGG	GTC	AGC	GTC	ACC	TGC	AAG	GCC	AGT	CAG	AAT	GTC	GGT	ACT	AAT	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	V	G	D	R	V	S	V	T	C	K	A	S	Q	N	V	G	T	N	
	GTA	GCC	TGG	TAT	CAA	CAG	AAA	CCA	GGG	CAA	TCT	CCT	AAA	GCA	CTG	ATT	TAC	TCG	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	V	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	S	P	K	A	L	I	Y	S	
	GCA	TCC	TAC	CGG	TAC	AGT	GGA	GTC	OCT	GAT	CGC	TTC	ACA	GCC	AGT	GGA	TCT	GGG	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	A	S	Y	R	Y	S	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	S	G	
	ACA	GAT	TTC	ACT	CTC	ACC	ATC	AGC	AAT	GTC	CAG	TCT	GAA	GAC	TTG	GCA	GAG	TAT	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	T	D	F	T	L	T	I	S	N	V	Q	S	E	D	L	A	E	Y	
	TTC	TGT	CAG	CAA	TAT	AAC	AGC	TAT	CCG	CTC	ACG	TTC	GGT	GCT	GGG	ACC	AAG	CTC	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	F	C	Q	Q	Y	N	S	Y	P	L	T	F	G	A	G	T	K	L	
	GAG	ATC	AAA	GGT	GGT	GGT	GGT	TCT	GGC	GGC	GGC	GGC	TCC	GGT	GGT	GGT	GGT	TCT	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	E	I	K	G	G	G	G	S	G	G	G	G	S	G	G	G	G	S	
	CAG	GTG	AAA	CTG	CAG	GAG	TCA	GGA	CCT	GGC	CTA	GTG	CAG	CCC	TCA	CAG	AGC	CTG	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Q	V	K	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	Q	P	S	Q	S	L	
	TCC	ATC	ACC	TGC	ACA	GTC	TCT	GGT	TTC	TCA	TTA	ACT	AGC	TAT	GGT	GTA	CAC	TGG	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	S	I	T	C	T	V	S	G	F	S	L	T	S	Y	G	V	H	W	
	GTT	CGC	CAG	TCT	CCA	GGA	AAG	GGT	CTG	GAG	TGG	CTG	GGA	GTG	ATA	TGG	AGT	GGT	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	V	R	Q	S	P	G	K	G	L	E	W	L	G	V	I	W	S	G	
	GGA	AGC	ACA	GAC	TAT	AAT	GCA	GCT	TTC	ATA	TCC	AGA	CTG	AGC	ATC	AGC	AAG	GAC	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	G	S	T	D	Y	N	A	A	F	I	S	R	L	S	I	S	K	D	

Figur 48 (Fortsetzung)

		657			666			675		684			693			702	
AAT	TCC	AAG	AGC	CAA	GTT	TTC	TTT	AAA	ATG	AAC	AGT	CTG	CAA	GCT	AAT	GAC	ACA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
N	S	K	S	Q	V	F	F	K	M	N	S	L	Q	A	N	D	T
		711			720			729		738			747			756	
GCC	ATA	TAT	TAC	TGT	GCC	AGA	ATG	GAG	AAC	TGG	TCG	TTT	GCT	TAC	TGG	GCC	CAA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A	I	Y	Y	C	A	R	M	E	N	W	S	F	A	Y	W	G	Q
		765			774			783		792			801			810	
GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	GAA	TTC	ACC	CCG	CTG	GGT	GAC	ACC	ACC	CAC	ACC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G	T	T	V	T	V	S	E	F	T	P	L	G	D	T	T	H	T
		819			828			837		846			855			864	
TCC	GGA	AAA	CCA	CTG	GAT	GGA	GAA	TAT	TTC	ACC	CTT	CAG	ATC	CGT	GGG	CGT	GAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
S	G	K	P	L	D	G	E	Y	F	T	L	Q	I	R	G	R	E
		873			882			891		900			909			918	
CGC	TTC	GAG	ATG	TTC	CGA	GAG	CTG	AAT	GAG	GCC	TTG	GAA	CTC	AAG	GAT	GCC	CAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
R	F	E	M	F	R	E	L	N	E	A	L	E	L	K	D	A	Q
		927			936			945		954			963			972	
GCT	GGG	AAG	GAG	CCA	GGG	GGG	AGC	GGA	GCC	GCG	CCG	GCA	CCT	ACT	TCA	AGT	TCT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A	G	K	E	P	G	G	S	G	G	A	P	A	P	T	S	S	S
		981			990			999		1008			1017			1026	
ACA	AAG	AAA	ACA	CAG	CTA	CAA	CTG	GAG	CAT	TTA	CTG	CTG	GAT	TTA	CAG	ATG	ATT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
T	K	K	T	Q	L	Q	L	E	H	L	L	L	D	L	Q	M	I
		1035			1044			1053		1062			1071			1080	
TTG	AAT	GGA	ATT	AAT	AAT	TAC	AAG	AAT	CCC	AAA	CTC	ACC	AGG	ATG	CTC	ACA	TTT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L	N	G	I	N	N	Y	K	N	P	K	L	T	R	M	L	T	F
		1089			1098			1107		1116			1125			1134	
AAG	TTT	TAC	ATG	CCC	AAG	AAG	GCC	ACA	GAA	CTG	AAA	CAT	CTT	CAG	TGT	CTA	GAA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
K	F	Y	M	P	K	K	A	T	E	L	K	H	L	Q	C	L	E
		1143			1152			1161		1170			1179			1188	
GAA	GAA	CTC	AAA	CCT	CTG	GAG	GAA	GTG	CTA	AAT	TTA	GCT	CAA	AGC	AAA	AAC	TTT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E	E	L	K	P	L	E	E	V	L	N	L	A	Q	S	K	N	F
		1197			1206			1215		1224			1233			1242	
CAC	TTA	AGA	CCC	AGG	GAC	TTA	ATC	AGC	AAT	ATC	AAC	GTA	ATA	GTT	CTG	GAA	CTA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
H	L	R	P	R	D	L	I	S	N	I	N	V	I	V	L	E	L
		1251			1260			1269		1278			1287			1296	
AAG	GGA	TCT	GAA	ACA	ACA	TTC	ATG	TGT	GAA	TAT	GCT	GAT	GAG	ACA	GCA	ACC	ATT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
K	G	S	E	T	T	F	M	C	E	Y	A	D	E	T	A	T	I

Figur 48 (Fortsetzung)

	1305		1314		1323		1332		1341		1350						
GTA	GAA	TTT	CTG	AAC	AGA	TGG	ATT	ACC	TTT	TGT	CAA	AGC	ATC	ATC	TCA	ACA	CTG
----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
V	E	F	L	N	R	W	I	T	F	C	Q	S	I	I	S	T	L
	1359		1368		1377		Sall										
ACT	GAC	GTC	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	TGA	TAA	GTC	GAC					
----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
T	D	V	H	H	H	H	H	H	*	*							

Figur 49:

		EcoRI																						
		9		18		27		36		45		54												
5'	GAA	TTC	ACC	ATG	GGA	TGG	AGC	TGT	ATC	ATC	CTC	TTC	TTG	GTA	GCA	ACA	GCT	ACA						
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---						
			M	G	W	S	C	I	I	L	F	L	V	A	T	A	T							
	GGT	GTA	63	CAC	TCC	GAT	72	ATC	CAG	CTG	81	ACC	CAG	TCT	90	GCA	ATC	ATG	TCT	GCA	TCT	108		
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	G	V	H	S	D	I	Q	L	T	Q	S	P	A	I	M	S	A	S						
	CCA	GGG	117	GAA	AAG	GTC	126	ACC	ATG	ACC	135	TGC	AGG	GCC	144	AGC	TCA	AGT	GTT	AGT	TCC	AGT	162	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	P	G	E	K	V	T	M	T	C	R	A	S	S	S	S	V	S	S	S					
	TAC	TTG	171	CAC	TGG	TAC	180	CAG	CAG	AAG	189	TCA	GGT	GCC	198	TCC	CCC	AAA	CTC	TGG	ATT	TAT	216	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Y	L	H	W	Y	Q	Q	K	S	G	A	S	P	K	L	W	I	Y						
	AGC	ACA	225	TCC	AAC	TTG	234	GCT	TCT	GGA	243	GTC	CCT	GCT	252	CGC	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	270	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	S	T	S	N	L	A	S	G	V	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	S				
	GGG	ACC	279	TCT	TAC	TCT	288	CTC	ACA	ATC	297	AGC	AGT	GTG	306	GAG	GCT	GAA	GAT	GCT	GCC	ACT	324	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	G	T	S	Y	S	L	T	I	S	S	V	E	A	E	D	A	A	T						
	TAT	TAC	333	TGC	CAG	CAG	342	TAC	AGT	GGT	351	TAC	CCG	TAC	360	ACG	TTC	GGA	GGG	GGG	ACC	AAG	378	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Y	Y	C	Q	Q	Y	S	G	Y	P	Y	T	F	G	G	G	G	T	K					
	CTC	GAG	387	ATC	AAA	GGT	396	GGT	GGT	GGT	405	TCT	GGC	GGC	414	GGC	GGC	TCC	GGT	GGT	GGT	GGT	432	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	L	E	I	K	G	G	G	G	S	G	G	G	G	G	S	G	G	G	G					
	TCT	CAG	441	GTG	AAA	CTG	450	CAG	GAG	TCT	459	GGG	GCT	GAG	468	CTT	GTG	AAG	CCT	GGG	GCT	TCA	486	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	S	Q	V	K	L	Q	E	S	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S						
	GTG	AAG	495	CTG	TCC	TGC	504	AAG	GCT	TCT	513	GGC	TAC	ACC	522	CTC	ACC	AGC	TAC	TGG	TTG	CAC	540	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	L	T	S	Y	W	L	H						
	TGG	GTG	549	AAG	CAG	TGG	558	CCT	GGA	CGA	567	GGC	CTT	GAG	576	TGG	ATT	GGA	AGG	ATT	GAT	CCC	594	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	W	V	K	Q	W	P	G	R	G	L	E	W	I	G	R	I	D	P						
	AAT	AGT	603	GGT	GGT	ACT	612	AAG	TAC	GAT	621	GAG	AAG	TTC	630	AAG	AGC	AAG	GCC	ACA	CTG	ACT	648	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	N	S	G	G	T	K	Y	D	E	K	F	K	S	K	A	T	L	T						

Figur 49 (Fortsetzung)

		657			666			675		684			693		702		
GTA	GAC	AAA	CCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	ATG	CAG	CTC	AGC	AGC	CTG	ACA	TCT	GAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
V	D	K	P	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	E
		711			720			729		738			747		756		
GAC	TCT	GCG	GTC	TAT	TAT	TGT	GCA	AGA	TGG	GAC	TAC	TGG	GCC	CAA	GGG	ACC	ACG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	W	D	Y	W	G	Q	G	T	T
		765			774			783		792			801		810		
GTC	ACC	GTC	TCC	TCC	GGA	ACC	CCG	CTG	GGT	GAC	ACC	ACC	CAC	ACT	AGT	GGA	AAA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
V	T	V	S	S	G	T	P	L	G	D	T	T	H	T	S	G	K
		819			828			837		846			855		864		
CCA	CTG	GAT	GGA	GAA	TAT	TTC	ACC	CTT	CAG	ATC	CGT	GGG	CCT	CAG	CGC	TTC	GAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P	L	D	G	E	Y	F	T	L	Q	I	R	G	R	E	R	F	E
		873			882			891		900			909		918		
ATG	TTC	CGA	GAG	CTG	AAT	GAG	GCC	TTG	GAA	CTC	AAG	GAT	GCC	CAG	GCT	GGG	AAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M	F	R	E	L	N	E	A	L	E	L	K	D	A	Q	A	G	K
		927			936			945		954			963		972		
GAG	CCA	GGG	GGG	TCC	GGA	GGT	GGT	GGT	AGC	ACC	CAA	GTG	TGC	ACC	GGC	ACA	GAC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E	P	G	G	S	G	G	G	G	S	T	Q	V	C	T	G	T	D
		981			990			999		1008			1017		1026		
ATG	AAG	CTG	CGG	CTC	CCT	GCC	AGT	CCC	GAG	ACC	CAC	CTG	GAC	ATG	CTC	CGC	CAC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M	K	L	R	L	P	A	S	P	E	T	H	L	D	M	L	R	H
		1035			1044			1053		1062			1071		1080		
CTC	TAC	CBG	GGC	TGC	CAG	GTG	GTG	CAG	GGA	AAC	CTG	GAA	CTC	ACC	TAC	CTG	CCC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L	Y	Q	G	C	Q	V	V	Q	G	N	L	E	L	T	Y	L	P
		1089			1098			1107		1116			1125		1134		
ACC	AAT	GCC	AGC	CTG	TCC	TTC	CTG	CAG	GAT	ATC	CAG	GAG	GTG	CAG	GGC	TAC	GTG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
T	N	A	S	L	S	F	L	Q	D	I	Q	E	V	Q	G	Y	V
		1143			1152			1161		1170			1179		1188		
CTC	ATC	GCT	CAC	AAC	CAA	GTG	AGG	CAG	GTC	CCA	CTG	CAG	AGG	GTG	CGG	ATT	GTG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L	I	A	H	N	Q	V	R	Q	V	P	L	Q	R	L	R	I	V
		1197			1206			1215		1224			1233		1242		
CGA	GGC	ACC	CAG	CTC	TTT	GAG	GAC	AAC	TAT	GCC	CTG	GCC	GTG	CTA	GAC	AAT	GGA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
R	G	T	Q	L	F	E	D	N	Y	A	L	A	V	L	D	N	G
		1251			1260			1269		1278			1287		1296		
GAC	CCG	CTG	AAC	AAT	ACC	ACC	CCT	GTC	ACA	GGG	GCC	TCC	CCA	GGA	GGC	CTG	CCG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
D	P	L	N	N	T	T	P	V	T	G	A	S	F	G	G	L	R

Figur 49 (Fortsetzung)

	1305		1314		1323		1332		1341		1350						
GAG	CTG	CAG	CTT	CGA	AGC	CTC	ACA	GAG	ATC	TTG	AAA	GGA	GGG	GTC	TTG	ATC	CAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E	L	Q	L	R	S	L	T	E	I	L	K	G	G	V	L	I	Q
	1359		1368		1377		1386		1395		1404						
CGG	AAC	CCC	CAG	CTC	TGC	TAC	CAG	GAC	ACG	ATT	TTG	TGG	AAG	GAC	ATC	TTC	CAC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
R	N	P	Q	L	C	Y	Q	D	T	I	L	W	K	D	I	F	H
	1413		1422		1431		1440		1449		1458						
AAG	AAC	AAC	CAG	CTG	GCT	CTC	ACA	CTG	ATA	GAC	ACC	AAC	CGC	TCT	CGG	GCC	TGC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
K	N	N	Q	L	A	L	T	L	I	D	T	N	R	S	R	A	C
	1467		1476		1485		1494		1503		1512						
CAC	CCC	TGT	TCT	CCG	ATG	TGT	AAG	GGC	TCC	CGC	TGC	TGG	GGA	GAG	AGT	TCT	GAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
H	P	C	S	P	M	C	K	G	S	R	C	W	G	E	S	S	E
	1521		1530		1539		1548		1557		1566						
GAT	TGT	CAG	AGC	CTG	ACG	CGC	ACT	GTC	TGT	GCC	GGT	GGC	TGT	GCC	CGC	TGC	AAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
D	C	Q	S	L	T	R	T	V	C	A	G	G	C	A	R	C	K
	1575		1584		1593		1602		1611		1620						
GGG	CCA	CTG	CCC	ACT	GAC	TGC	TGC	CAT	GAG	CAG	TGT	GCT	GCC	GGC	TGC	ACG	GGC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G	P	L	P	T	D	C	C	H	E	Q	C	A	A	G	C	T	G
	1629		1638		1647		1656		1665		1674						
CCC	AAG	CAC	TCT	GAC	TGC	CTG	GCC	TGC	CTC	CAC	TTC	AAC	CAC	AGT	GCC	ATC	TGT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P	K	H	S	D	C	L	A	C	L	H	F	N	H	S	G	I	C
	1683		1692		1701		1710		1719		1728						
GAG	CTG	CAC	TGC	CCA	GCC	CTG	GTC	ACC	TAC	AAC	ACA	GAC	ACG	TTT	GAG	TCC	ATG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E	L	H	C	P	A	L	V	T	Y	N	T	D	T	F	E	S	M
	1737		1746		1755		1764		1773		1782						
CCC	AAT	CCC	GAG	GGC	CGG	TAT	ACA	TTC	GGC	GCC	AGC	TGT	GTG	ACT	GCC	TGT	CCC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P	N	P	E	G	R	Y	T	F	G	A	S	C	V	T	A	C	P
	1791		1800		1809		1818		1827		1836						
TAC	AAC	TAC	CTT	TCT	ACG	GAC	GTG	GGA	TCC	TGC	ACC	CTC	GTC	TGC	CCC	CTG	CAC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Y	N	Y	L	S	T	D	V	G	S	C	T	L	V	C	P	L	H
	1845		1854		1863		1872		1881		1890						
AAC	CAA	GAG	GTG	ACA	GCA	GAG	GAT	GGA	ACA	CAG	CGG	TGT	GAG	AAG	TGC	AGC	AAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M	Q	E	V	T	A	E	D	G	T	Q	R	C	E	K	C	S	K
	1899		1908		1917		1926		1935		1944						
CCC	TGT	GCC	CGA	GTG	TGC	TAT	GGT	CTG	GCC	ATG	GAG	CAC	TTG	CGA	GAG	GTG	AGG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P	C	A	R	V	C	Y	G	L	G	M	E	H	L	R	E	V	R

Figur 49 (Fortsetzung)

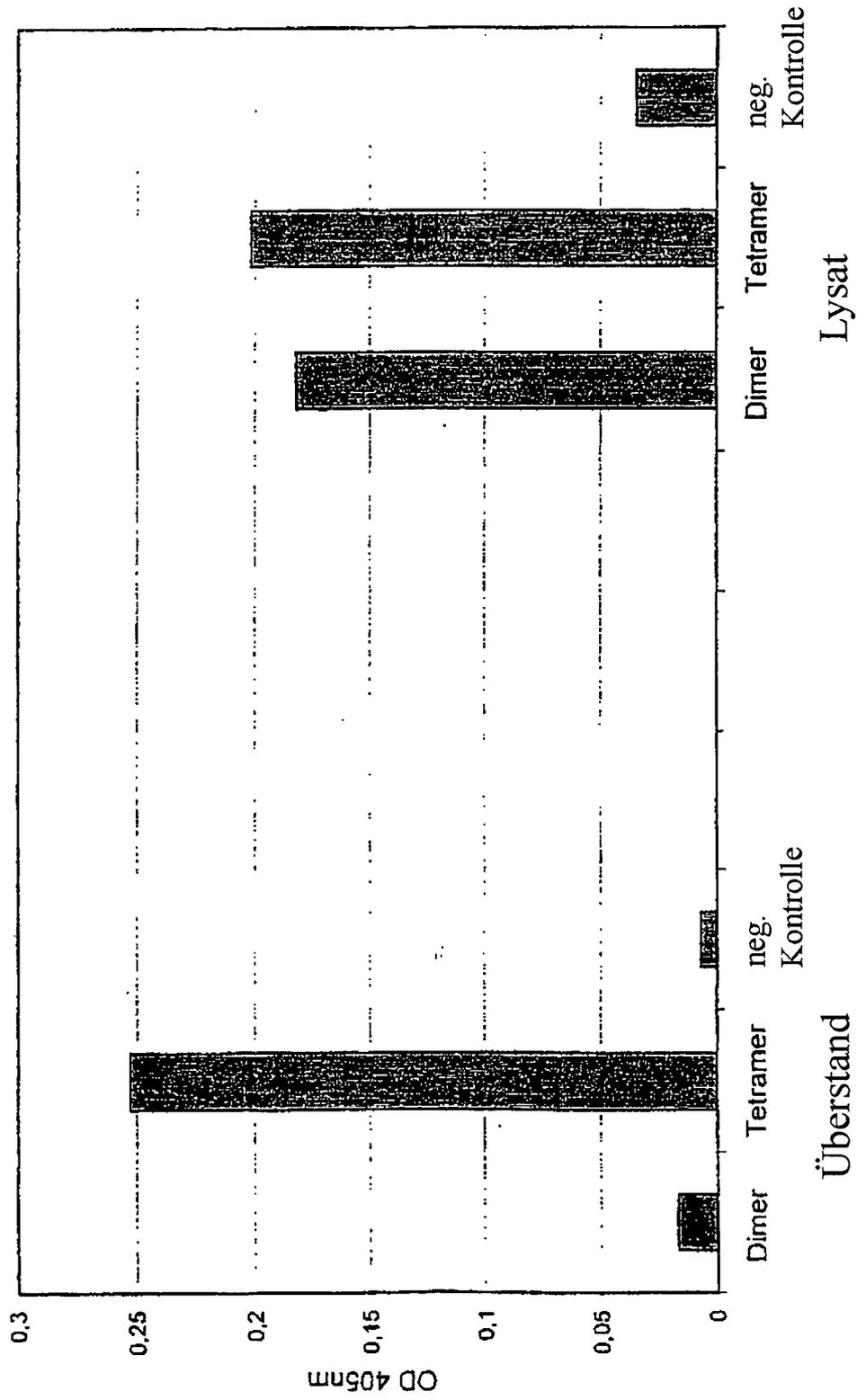
	1953			1962			1971			1980			1989			1998		
GCA	GTT	ACC	AGT	GCC	AAT	ATC	CAG	GAG	TTT	GCT	GGC	TGC	AAG	AAG	ATC	TTT	GGG	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
A	V	T	S	A	N	I	Q	E	F	A	G	C	K	K	I	F	G	
	2007			2016			2025			2034			2043			2052		
AGC	CTG	GCA	TTT	CTG	CCG	GAG	AGC	TTT	GAT	GGG	GAC	CCA	GCC	TCC	AAC	ACT	GCC	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
S	L	A	F	L	P	E	S	F	D	G	D	P	A	S	N	T	A	
	2061			2070			2079			2088			2097			2106		
CCG	CTC	CAG	CCA	GAG	CAG	CTC	CAA	GTG	TTT	GAG	ACT	CTG	GAA	GAG	ATC	ACA	GGT	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
P	L	Q	P	E	Q	L	Q	V	F	E	T	L	E	E	I	T	G	
	2115			2124			2133			2142			2151			2160		
TAC	CTA	TAC	ATC	TCA	GCA	TGG	CCG	GAC	AGC	CTG	CCT	GAC	CTC	AGC	GTC	TTC	CAG	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Y	L	Y	I	S	A	W	P	D	S	L	P	D	L	S	V	F	Q	
	2169			2178			2187			2196			2205			2214		
AAC	CTG	CAA	GTA	ATC	CGG	GGA	CGA	ATT	CTG	CAC	AAT	GGC	GCC	TAC	TCG	CTG	ACC	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
N	L	Q	V	I	R	G	R	I	L	H	N	G	A	Y	S	L	T	
	2223			2232			2241			2250			2259			2268		
CTG	CAA	GGG	CTG	GGC	ATC	AGC	TGG	CTG	GGG	CTG	CGC	TCA	CTG	AGG	GAA	CTG	GGC	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
L	Q	G	L	G	I	S	W	L	G	L	R	S	L	R	E	L	G	
	2277			2286			2295			2304			2313			2322		
AGT	GGA	CTG	GCC	CTC	ATC	CAC	CAT	AAC	ACC	CAC	CTC	TGC	TTC	GTG	CAC	ACG	GTG	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
S	G	L	A	L	I	H	H	N	T	H	L	C	F	V	H	T	V	
	2331			2340			2349			2358			2367			2376		
CCC	TGG	GAC	CAG	CTC	TTT	CCG	AAC	CCG	CAC	CAA	GCT	CTG	CTC	CAC	ACT	GCC	AAC	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
P	W	D	Q	L	F	R	N	P	H	Q	A	L	L	H	T	A	N	
	2385			2394			2403			2412			2421-			2430		
CCG	CCA	GAG	GAC	GAG	TGT	GTG	GGC	GAG	GGC	CTG	GCC	TGC	CAC	CAG	CTG	TGC	GCC	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
R	P	E	D	E	C	V	G	E	G	L	A	C	H	Q	L	C	A	
	2439			2448			2457			2466			2475			2484		
CGA	GGG	CAC	TGC	TGG	GGT	CCA	GGG	CCC	ACC	CAG	TGT	GTC	AAC	TGC	AGC	CAG	TTC	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
R	G	H	C	W	G	P	G	P	T	Q	C	V	N	C	S	Q	F	
	2493			2502			2511			2520			2529			2538		
CTT	CGG	GGC	CAG	GAG	TGC	GTG	GAG	GAA	TGC	CGA	GTA	CTG	CAG	GGG	CTC	CCC	AGG	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
L	R	G	Q	E	C	V	E	E	C	R	V	L	Q	G	L	P	R	
	2547			2556			2565			2574			2583			2592		
GAG	TAT	GTG	AAT	GCC	AGG	CAC	TGT	TTG	CCG	TGC	CAC	CCT	GAG	TGT	CAG	CCC	CAG	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
E	Y	V	N	A	R	H	C	L	P	C	H	P	E	C	Q	P	Q	

Figur 49 (Fortsetzung)

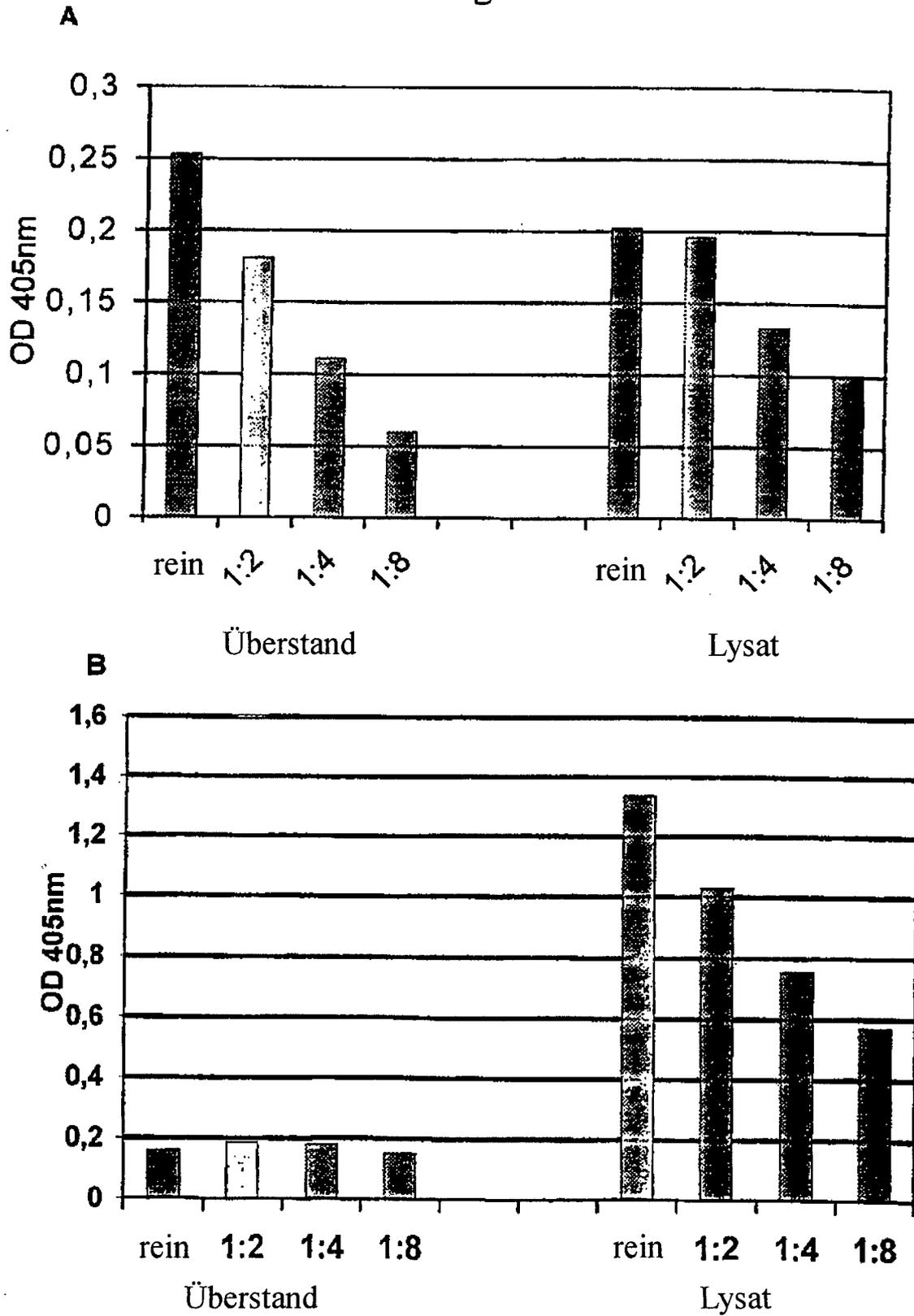
	2601		2610		2619		2628		2637		2646						
AAT	GGC	TCA	GTG	ACC	TGT	TTT	GGA	CCG	GAG	GCT	GAC	CAG	TGT	GTG	GCC	TGT	GCC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
N	G	S	V	T	C	F	G	P	E	A	D	Q	C	V	A	C	A
	2655		2664		2673		2682		2691		2700						
CAC	TAT	AAG	GAC	CCT	CCC	TTC	TGC	GTG	GCC	CGC	TGC	CCC	AGC	GGT	GTG	AAA	CCT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
H	Y	K	D	P	P	F	C	V	A	R	C	P	S	G	V	K	P
	2709		2718		2727		2736		2745		2754						
GAC	CTC	TCC	TAC	ATG	CCC	ATC	TGG	AAG	TTT	CCA	GAT	GAG	GAG	GGC	GCA	TGC	CAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
D	L	S	Y	M	P	I	W	K	F	P	D	E	E	G	A	C	Q
	2763		2772		2781		2790		2799		2808						
CCT	TGC	CCC	ATC	AAC	TGC	ACC	CAC	TCC	TGT	GTG	GAC	CTG	GAT	GAC	AAG	GGC	TGC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P	C	P	I	N	C	T	H	S	C	V	D	L	D	D	K	G	C
	2817		2826		2835		2844		2853		2862						
CCC	GCC	GAG	CAG	AGA	GCC	AGC	CCT	CTG	ACG	TCC	GGG	CAT	CAT	CAC	CAT	CAT	CAT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P	A	E	Q	R	A	S	P	L	T	S	G	H	H	H	H	H	H
	Sall																
TGA	GTC	GAC	3'														
---	---	---															

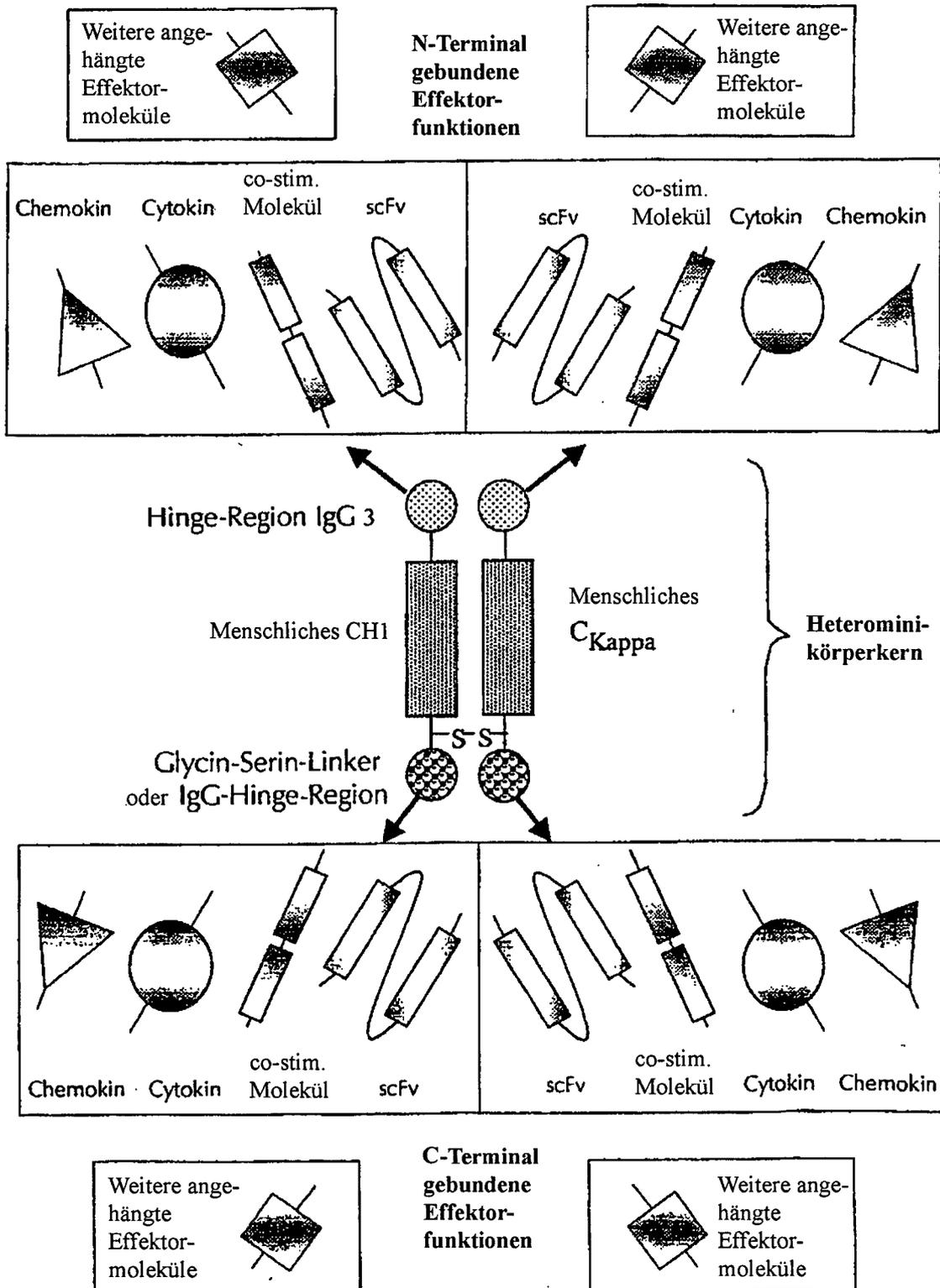
*

Figur 50



Figur 51

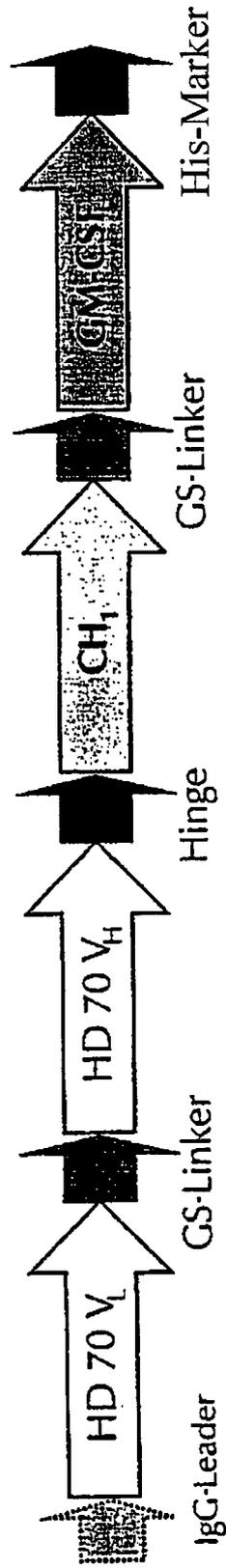




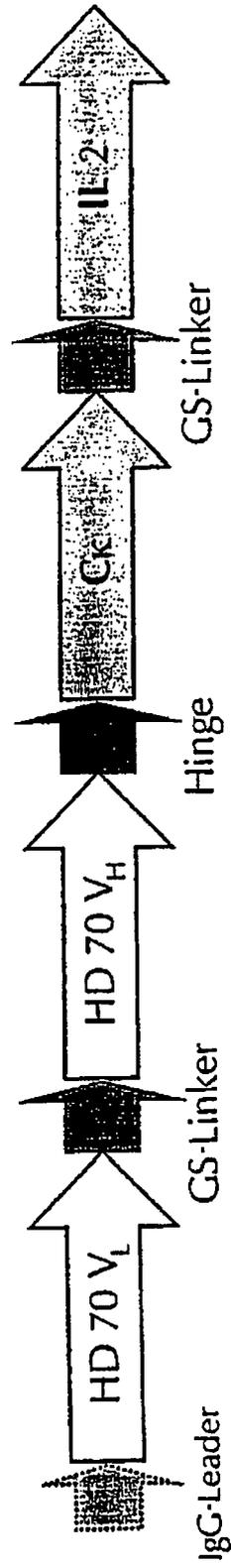
Figur 52

Figur 54

HD 70 scFv - CH1-GM-CSF:



HD 70 scFv - Ck-IL 2:



Figur 55a

M G W S C I I

EcoRI NcoI

1 TTTTTTCTT CCATTTCAGG TGTCGTGAGG AATTCACCAT GGGATGGAGC TGTATCATCC
 AAAAAAAGAA GGTAAAGTCC ACAGCACTCC TTAAGTGGTA CCCTACCTCG ACATAGTAGG

+3 L F L V A T A T G V H S E L Q M T Q S P
 BsrGI SacI

61 TCTTCTTGGT AGCAACAGCT ACAGGTGTAC ACTCCGAGCT CCAGATGACC CAGTCTCCAT
 AGAAGAACCA TCGTTGTCTG TGTCACATG TGAGGCTCGA GGCTACTGG GTCAGAGGTA

+3 S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S
 121 CCTCCCTGTC TGCATCTGTA GGAGACAGAG TCACCATCAC TTGCCGGGCA AGTCAGAGCA
 GGAGGGACAG ACGTAGACAT CCTCTGTCTC AGTGGTAGTG AACGGCCCGT TCAGTCTCGT

+3 I S S Y L N W Y Q Q K P G Q P P K L L I
 SwaI

181 TTAGCAGCTA TTTAAATTGG TATCAGCAGA AACCAGGACA GCCTCCTAAG CTGCTCATT
 AATCGTCGAT AAATTTAACC ATAGTCGTCT TTGGTCCTGT CCGAGGATTC GACGAGTAA

+3 Y W A S T R E S G V P D R F S G S E S G
 SmaI

241 ACTGGGCATC TACCCGGGAA TCCGGGGTCC CTGACCGATT CAGCGGCAGT GAATCTGGGA
 TGACCCGTAG ATGGGCCCTT AGGCCCCAGG GACTGGCTAA GTCGCCGTCA CTTAGACCCT

+3 T N Y T L T I S S L Q P E D F A T Y F C
 PstI

301 CAAATTACAC TCTCACCATC AGCAGCCTGC AGCCTGAAGA TTTTGCTACT TACTTTGTC
 GTTTAAATGTG AGAGTGGTAG TCGTCGGACG TCGGACTTCT AAAACGATGA ATGAAAACAG

+3 Q Q S D S L P I T F G Q G T R L D I Q G
 361 AACAGTCTGA CAGTTTGCCG ATCACCTTCG GCCAAGGGAC ACGACTGGAC ATTCAAGGAG
 TTGTCAGACT GTCAAACGGC TAGTGGAAAGC CGTTCCCTG TGCTGACCTG TAAGTTCCTC

+3 G G G S G G G G S G G G G S E V Q L L E
 PvuII

421 GAGGAGGATC AGGTGGTGGT GGTAGCGGGC GCGCGGCTC AGAGGTGCAG CTGCTCGACT
 CTCCTCCTAG TCCACCACCA CCATCGCCGC CGCCGCCGAG TCTCCACGTC GACGAGCTCA

+3 S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G
 481 CTGGGGGAGG CGTGGTCCAG CCTGGGAGGT CCCTGAGACT CTCCTGTGCA GCCTCTGGAT
 GACCCCTCC GCACCAGGTC GGACCCTCCA GGGACTCTGA GAGGACAGT CGGAGACCTA

+3 F T F S S Y G M R W V R Q A P G K G L E
 541 TCACCTTCAG TAGCTATGGC ATGCACTGGG TCCGCCAGGC TCCAGGCAAG GGGCTGGAGT
 AGTGGAAATC ATCGATACCG TACGTGACCC AGGCGGTCCG AGGTCCGTTC CCCGACCTCA

+3 W V A V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G
 NdeI

601 GGTGGCAGT TATATCATAT GATGGAAGTA ATAAATACTA TSCAGACTCC GTGAAGGGCC
 CCCACCGTCA ATATAGTATA CTACCTTCAT TATTTATGAT ACGTCTGAGG CACTTCCCGG

+3 R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L
 661 GATTCACCAT CTCCAGAGAC AATTCOAAGA ACACGCTGTA TGTGCAAATG AACAGCCTGA
 CTAAGTGGTA GAGGCTCTCT TTAAGTGTCT TGTGCGAGAT AGAGGTTTAC TTGTCGGACT

+3 R A E D T A V Y Y C A K D M S W G S G W
 721 GAGCTGAGGA CACGGCTGTG TATTACTGTG CGAAAGATAT GGGGTGGGGC AGTGCTGGA
 CTCGACTCCT GTGCCGACAC ATAATGACAC GCTTCTATA CCCCACCCS TCACCGACCT

Figur 55a (Fortsetzung)

```

+3 R P Y Y Y Y G M D V W G Q G T T V T V S
                                     BspEI
781 GACCCTACTA CTA CTACTACGGT ATGGACGTCT GGGGCCAAGG GACCACGGTC ACCGTCTCCT
    CTGGGATGAT GATGATGCCA TACCTGCAGA CCCCAGTTCC CTGGTGCCAG TGCCAGAGGA

+3 S G T P L G D T T H T A S T K G P S V F
    BspEI                               NheI
841 CCGGAACCCC GCTGGGTGAC ACCACCCACA CCGCTAGCAC CAAGGGCCCA TCGGTCTTCC
    GGCCTTGGGG CGACCCACTG TGGTGGGTGT GCGGATCGTG GTTCCCGGGT AGCCAGAAGG

+3 P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V
901 CCCTGGCACC CTCCTCCAAG AGCACCTCTG GGGGCACAGC GGCCCTGGGC TSCCTGGTCA
    GGGACCSTGG GAGGAGGTTT TCGTGGAGAC CCCCCTGTCTG CCGGGACCCG ACCGACCACT

+3 K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G
                                     AgeI
961 AGGACTACTT CCCC GAACCG GTGACGGTGT CGTGGAAC TC AGGCGCCCTG ACCAGCGGGC
    TCCTGATGAA GGGGCTTGGC CACTGCCACA GCACCTTGAG TCCGCGGGAC TGGTCGCCCC

+3 V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V
1021 TGCACACCTT CCGGCTGTG CTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA
    ACGTGTGGAA GGGCCGACAG GATGTCAGGA GTCCTGAGAT GAGGGAGTCTG TCGCACCCT

+3 T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P
1081 CCGTGCCTC CAGCAGCTG GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACGTGAAT CACAAGCCCA
    GGCACGGGAG GTCGTCGAAC CCGTGGGTCT GGATGTAGAC GTTGCACTTA GTGTTCCGGT

+3 S N T K V D K K V E P K S C D K T S G G
                                     SpeI
1141 GCAACACCAA GGTGGACAAG AAAGTTGAGC CCAAATCTTG TGACAAAAC AGTGGAGGGC
    CGTTGTGGTT CCACCTGTTC TTTCAACTCG GGTTAGAAC ACTGTTTTGA TCACCTCCG

+3 G G S A P A R S P S P S T Q P W E H V N
1201 GTGGGTCGGC ACCCGCCCGC TCGCCAGCC CCAGCACGCA GCCCTGGGAG CATGTGAATG
    CACCCAGGCG TGGCGGGGCG AGCGGGTCGG GGTCTGCGT CCGGACCCCTC GTACACTTAC

+3 A I Q E A R R L L N L S R D T A A E M N
1261 CCATCCAGGA GGCCCGGCGT CTCCTGAACC TGAGTAGAGA CACTGCTGCT GAGATGAATG
    GGTAGGTCCT CCGGGCCGCA GAGGACTTGG ACTCATCTCT GTGACGACGA CTCTACTTAC

+3 E T V E V I S E M F D L Q E P T C L Q T
1321 AAACAGTAGA AGTCATCTCA GAAATGTTG ACCTCCAGGA GCCGACCTGC CTACAGACCC
    TTTGTCTCT TCACTAGAGT CTTACAAAC TGGAGTCTCT CCGCTGGACG GATGTCTGGG

+3 R L E L Y K Q G L R G S L T K L K G P L
                                     BsrGI
1381 GCCTGGAGCT GTACAAGCAG GCCTGCGGG GCAGCCTCAC CAAGCTCAAG GGCCCTTGA
    CGGACCTCGA CATGTTCTGC CCGGACGCC CGTGGAGTG GTTCGAGTTC CCGGGGAAC

+3 T M M A S H Y K Q H C P P T P E T S C A
1441 CCATGATGGC CAGCCACTAC AAGCAGCACT GCCCTCCAAC CCCGGAAACT TCCTGTGCAA
    GGTACTACCG GTCGGTGATG TTCGTCSTGA CCGGAGGTTG GGGCCTTGA AGGACACGTT

+3 T Q I I T F E S F K E N L K D F L L V I
1501 CCCAGATTAT CACCTTTGAA AGTTCAAAG AGAACCTGAA GGACTTTCTG CTGTGTCATCC
    GGGTCTAATA GTGGAAACTT TCAAAGTTT TCTTGGACTT OCTGAAAGAC GAACAGTAGG

```

Figur 55a (Fortsetzung)

```
+3 P F D C W E P V Q E H H H H H H *  
                                     SalI  
                                     ~~~~~  
1561 CCTTTGACTG STGGGAGCCA GTCCAGGAGC ATCATCACCA TCATCATTGA GTCGACTTAA  
      GGAAACTGAC GACCCCTCGGT CAGGTCCTCG TAGTAGTGGT AGTAGTAACT CAGCTGAATT  
-----  
1621 AACAGCTCTG  
      TTGTCGAGAC  
-----
```

Figur 55b

```

+3      M G W S C I I
      EcoRI NcoI
1  ETTTTTCTT CCATTTCAAGG TGTCGTGAGG AATTCACCAT GGGATGGAGC TGTATCATCC
   AAAAAAGAA GGTAAGTCC ACAGCACTCC TTAAGTGTA CCTACCTCG ACATAGTAGG

+3 L F L V A T A T G V H S E L Q M T Q S P
      BsrGI SacI
61  TCTTCTGGT AGCAACAGCT ACAGGTGTAC ACTCCGAGCT CCAGATGACC CAGTCTCCAT
   AGAAGAACCA TCSTTGTCGA TGTCACATG TGAGGCTCGA GGTCTACTGG CTCAGAGSTA

+3 S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S
121 CUTCCTGTC TGCATCTGTA GGAGACAGAG TCACCATCAC TTGCCGGGCA AGTCAGAGCA
   GGAGGGACAG ACGTAGACAT CCTCTGTCTC ASTGGTAGTG AACGGCCCGT TCAGTCTCGT

+3 I S S Y L N W Y Q Q K P G Q P P K L L I
      SwaI
181 TTAGCAGCTA TTTAAATGG TATCAGCAGA ACCCAGGACA GCCTCCTAAG CTGCTCATT
   AATCGTCGAT AAATTAACC ATAGTCSTCT TTGGTCCTGT CCGAGGATTC SACCAGTAAA

+3 Y W A S T R E S G V P D R F S G S E S G
      SmaI
241 ACTGGGCATC TACCCGGGAA TCCGGGGTCC CTGACCGATT CAGCGGCAGT GAATCTGGGA
   TGACCCGTAG ATGGGCCCTT AGGCCCCAGG GACTGGCTAA GTCGCCGTCA CTTAGACCCCT

+3 T N Y T L T I S S L Q P E D F A T Y F C
      PstI
301 CAAATTACAC TCTCACCATC AGCAGCCTGC AGCCTGAAGA TTTTGCTACT TACTTTTGTG
   GTTTAATGTG AGAGTGGTAG TCGTCGGACG TCGGACTTCT AAAACGATGA ATGAAAACAG

+3 Q Q S D S L P I T F G Q G T R L D I Q G
361 AACAGTCTGA CAGTTGCCG ATCACCTTCG GCCAAGGGAC ACGACTGGAC ATTCRAAGGAG
   TTGTACAGACT GTCAAACGGC TAGTGGAAGC CCGTCCCTCG TGCTGACCTG TAAGTTCCTC

+3 G G G S G G G E S G G G G S E V Q L L E
      PvuII
421 GAGGAGGATC AGGTGGTGGT GGTAGCGGCG GCGGCGGCTC AGAGGTGCAG CTGCTCGAGT
   CTCTCCTAG TCCACCACCA CCATCGCCGC CCGCCCGGAG TCTCCACGTC GACGAGCTCA

+3 S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G
481 CTGGGGGAGG CGTGGTCCAG CCTGGGAGGT CCTGAGACT CTCTGTGCA GCCTCTGGAT
   GACCCCTCC GCACCAGTC GGACCCTCA GSGACTCTGA GAGGACAGT CCGAGACCTA

+3 F T F S S Y G M H W V R Q A P G K G L E
541 TCACCTTCAG TAGCTATGCC ATGCACTGGG TCCGCCAGGC TCCAGGCAAG GGGCTGGAGT
   AGTGAAGTC ATCGATACCG TACGTGACCC AGGCGGTCCG AGGTCCGTTC CCCGACCTCA

+3 W V A V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G
      NdeI
601 GGGTGGCAGT TATATCATAT GATGGAAGTA ATAAATACTA TGCAGACTCC GTGAAGGGCC
   CCCACCGTCA ATATAGTATA CTACCTTCAT TATTTATGAT ACGTCTGAGG CACTTCCCGG

+3 R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L
661 GATTCACCAT CTCCAGAGAC AATCCAAGA ACAGGCTGTA TCTGCAAATG AACAGCCTGA
   CTAAGTGTA GAGGTCTCTG TTAAGTTCT TSTGCGACAT AGACGTTAC TTGTCCGACT

+3 R A E D T A V Y Y C A K D M G W G S G W
721 GAGCTGAGGA CACGGCTGTG TATTACTGTG CGAAGATAT GGGGTGGGSC AGTGGCTGGA
   CTCGACTCCT GTGCCGACAC ATAATGACAC GCTTCTATA CCCACCCCGS TCACCGACCT
    
```

Figur 55b (Fortsetzung)

```

+3 R P Y Y Y Y G M D V W S Q G T T V T V S
                                     BspEI
781 GACCCTACTA CTACTACGGT ATGGACGTCT GGGGCCAAGG GACCACGGTC ACCGTCTCCT
    CTGGGATGAT GATGATGCCA TACCTGCAGA CCCCAGTTCC CTGGTGCCAG TGGCAGAGGA

+3 S G T P L G D T T H T R T V A A P S V F
    BspEI                               BslWI
    ~~~~~                               ~~~~~
841 CCGGAACCCC GCTGGGTGAC ACCACCCACA CCGTACGGT GGCTGCACCA TCTGTCTTCA
    GGCCTGGGGG CGACCCACTG TGGTGGGTGT GGCATGCCA CCGACGTGGT AGACAGAAGT

+3 I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L
901 TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAAC TGC CTCTGTGTG TGCCTGCTGA
    AGAAGGGCGG TAGACTACTC GTCAACTTTA GACCTTGACG GAGACAACAC ACGGACGACT

-3 N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S
961 ATAATTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAAGT GGATAACGCC CTCCAATCGG
    TATTGAAGAT AGGGTCTCTC CGTTTTCATG TCACCTTCCA CCTATTGCGG GAGGTTAGCC

-3 G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S
1021 GTAATCCCA GGAGAGTGTG ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC AGCCTCAGCA
    CATTGAGGGT CCTCTCACAG TGCTCGTCC TGTCTTCTCT GTCGTGGATG TCGGAGTCGT

+3 S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V
1081 GCACCTGAC GCTGAGCAA GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC TGGGAAGTCA
    CGTGGGACTG CGACTCGTTT CGTCTGATGC TCTTTGTGTT TCAGATGCGG ACGCTTCAGT

+3 T H Q G L S S P V T K S F N R G E C S G
                                     SacI
                                     ~~~~~
1141 CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG TGTTCAGGAG
    GGGTAGTCCC GGACTCGAGC GGGCAGTGT TCTCGAAGTT GTCCCCTCTC ACAAGTCCCT

+3 G G G S A P T S S S T K K T Q L Q L E H
1201 GCGGTGGGTC TGCACCTACT TCAAGTCTA CAAAGAAAAC ACAGCTACAA CTGGAGCATT
    CGCCACCCAG ACGTGGATGA AGTCAAGAT GTTCTTTTG TGTGATGTT GACCTCGTAA

-3 L L L D L Q M I L N G I N N Y K N P K L
1261 TACTGCTGGA TTTACAGATG ATTTGAAATG GAATTAATAA TTACAAGAAT CCCAAACTCA
    ATGACGACCT AAATGTCTAC TAAACTTAC CTTAATTATT AATGTTCTTA GGGTTGAGT

+3 T R M L T F K F Y M P K K A T E L K H L
1321 CCAGGATGCT CACATTTAAG TTTTACATGC CCAAGAAGGC CACAGAAGTCA AAACATCTTC
    GGTCTACGA GTGTAATTC AAAATGTACG GGTCTTCCG GTGTCTTGAC TTTGTAGAAG

+3 Q C L E E E L K P L E E V L N L A Q S K
                                     XbaI
                                     ~~~~~
1381 AGTGTCTAGA AGAAGAAGTC AAACCTCTGG AGGAAGTGTCT AAATTTAGCT CAAAGCAAAA
    TCACAGATCT TCTTCTTGAG TTTGGAGACC TCCTTACGA TTTAAATCGA GTTTCGTTTT

-3 N F H L R P R D L I S N I N V I V L E L
1441 ACTTTCACCT AAGACCCAGG GACTTAATCA GCAATATCAA CGTAATAGTT CTGGAACTRA
    TGAAGGTGAA TTTGGGTCC CTGAATTAGT CGTTATAGTT GCATTATCAA GACCTTGATT

+3 K G S E T T F M C E Y A D E T A T I V E
1501 AGGGATCTGA AACAACTTC ATGTGTGAAT ATGCTGATGA GACAGCAACC ATTGTAGAAT
    TCCCTAGACT TTGTGTGAAG TACACACTTA TACGACTACT CTGTCGTTGG TAACATCTTA

+3 F L N R W I T F C Q S I E S T L T * *
                                     SalI
                                     ~~~~~
1561 TTCTGAACAG ATGGATTACC TTTTGTCAA GCATCATCTC AACACTAAGT TGATAAGTGC
    AAGACTTGTG TACCTAATGG AAAACAGTTT CGTAGTAGAG TTGTGATTGA ACTATTCAGC

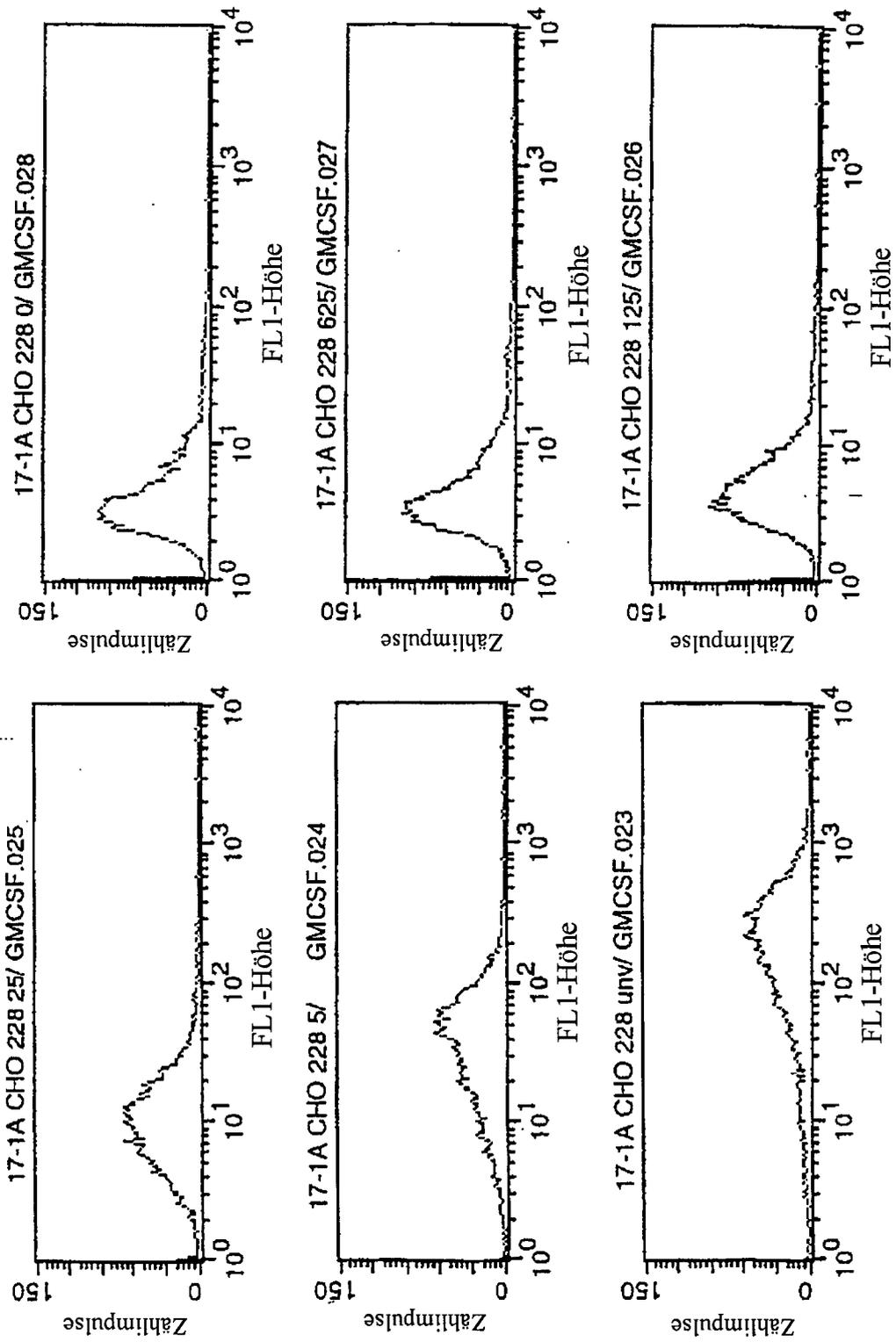
```

Figur 55b (Fortsetzung)

SaII
--
1621 ACTTAAAACA
TGAATTTTGT

Assoziation einer EpCAM-Bindung und von GM-CSF in einem Heterominkörper

Figur 56



Figur 57

Physische Verknüpfung von anti-EpCAM-Aktivität mit IL-2 und GM-CSF

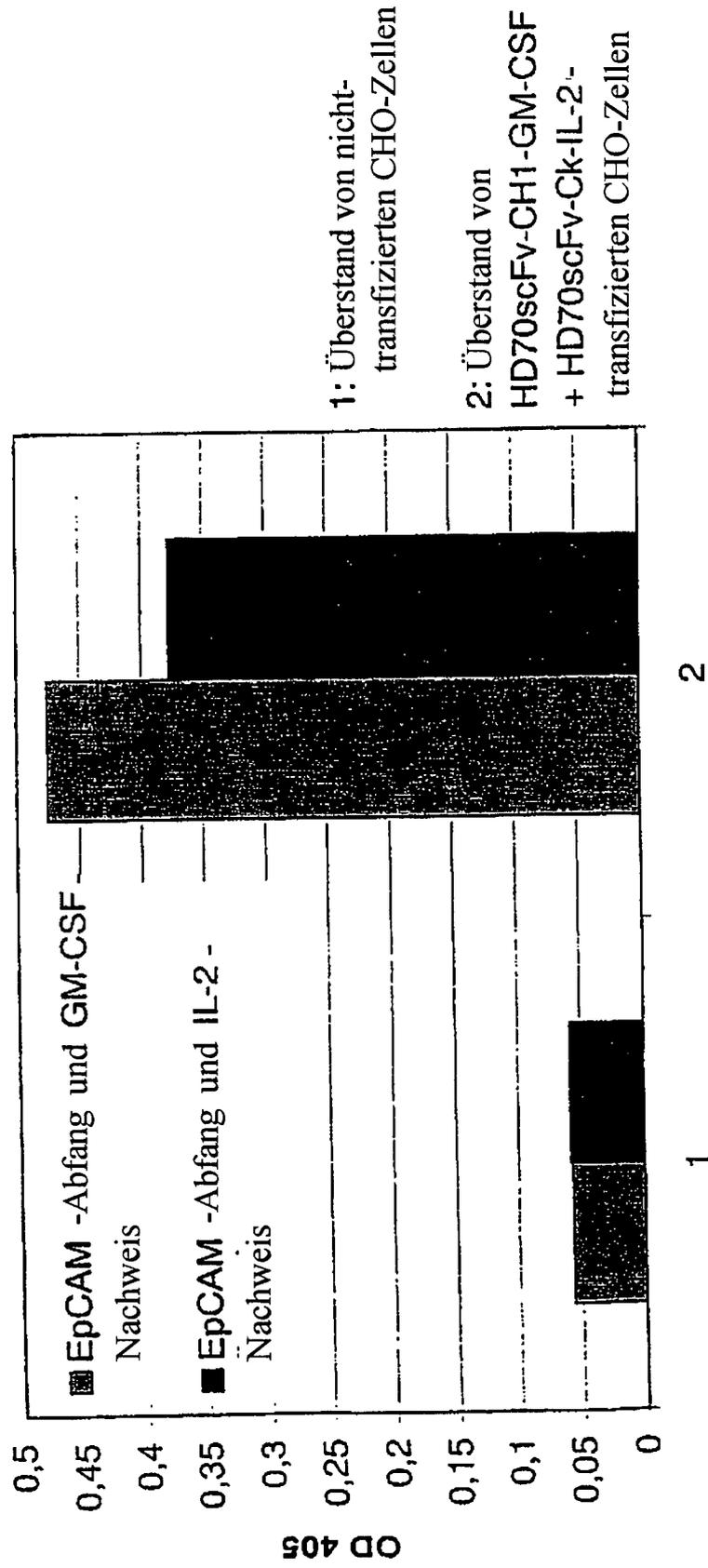
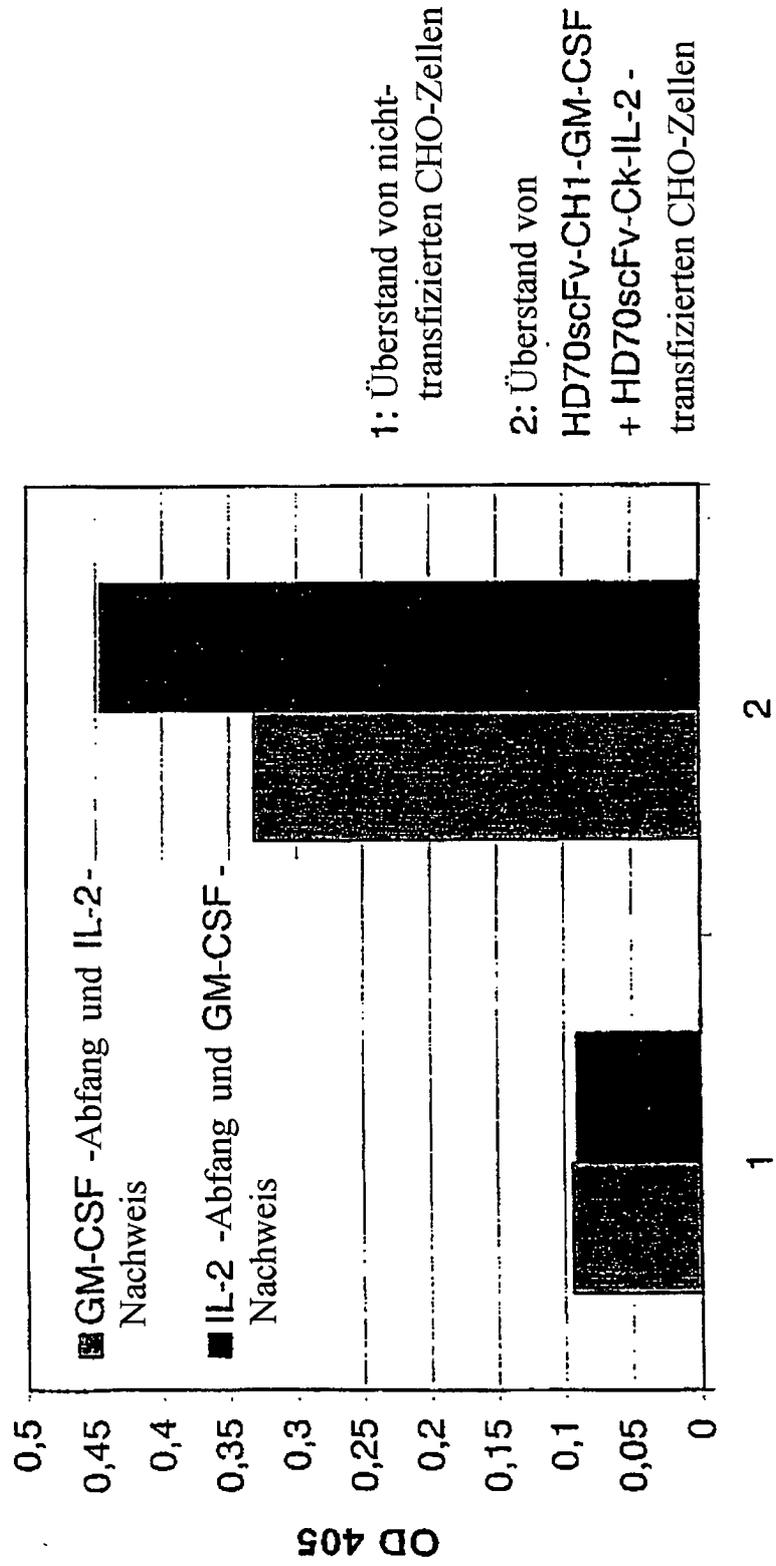
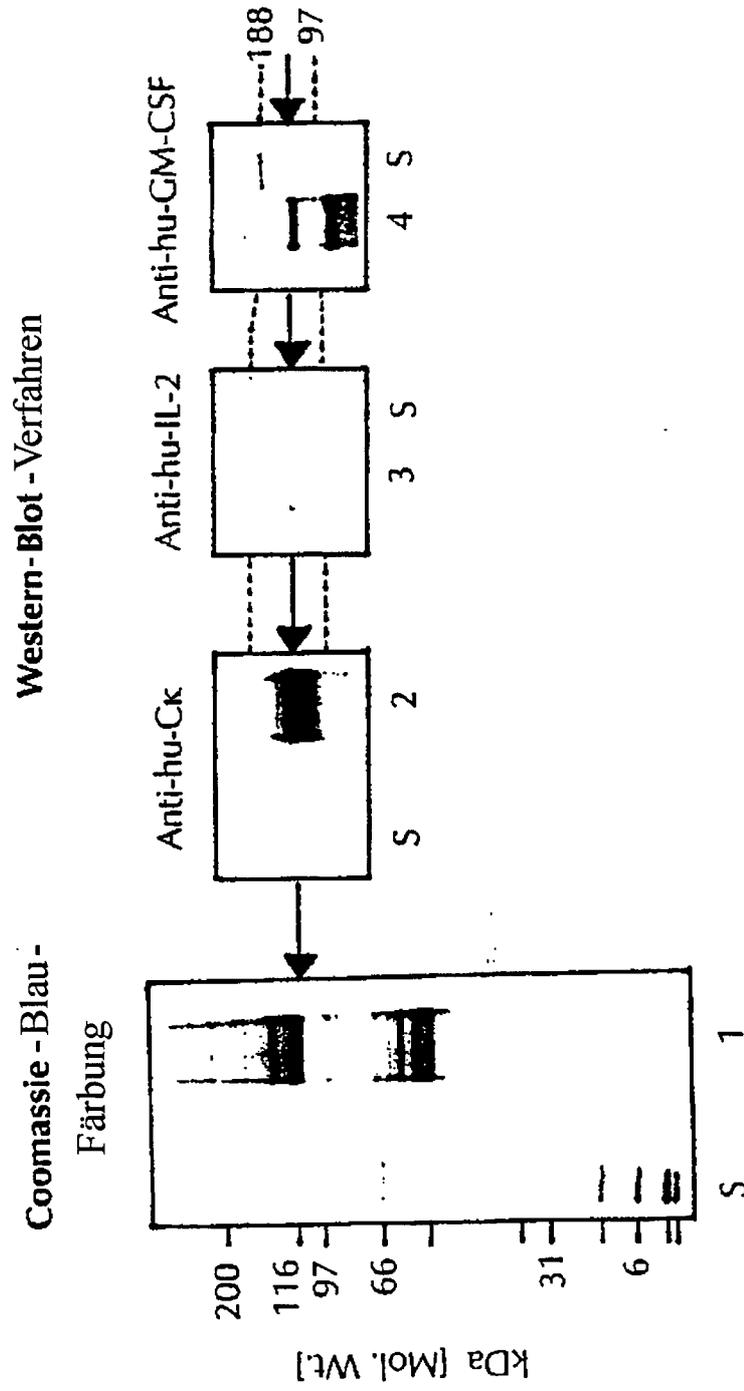


Figure 58

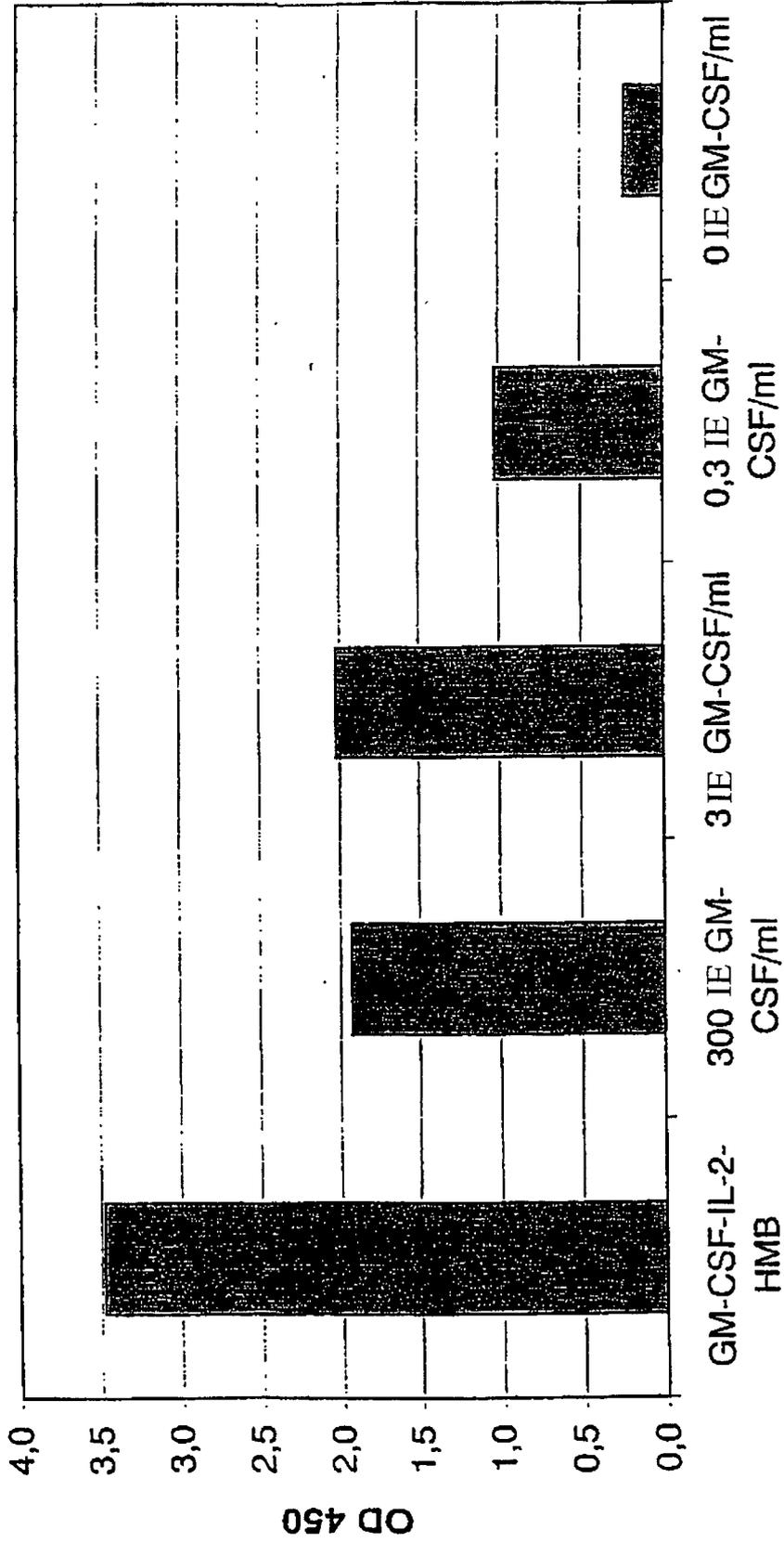
Physikalische Verknüpfung von IL-2 mit GM-CSF in einem Heterominkörper



Figur 59



Figur 60
Bioaktivität von GM-CSF in einer Heterominkörper-Anordnung



Figur 61 Bioaktivität von IL-2 in einer Heterominkörper-Anordnung

