



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 35 596 T2** 2006.12.21

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 918 797 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 35 596.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/13884**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 937 148.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/006248**

(86) PCT-Anmeldetag: **06.08.1997**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **19.02.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.06.1999**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **29.03.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **21.12.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

700737 15.08.1996 US

(73) Patentinhaber:

**Millennium Pharmaceuticals, Inc., Cambridge,
Mass., US**

(74) Vertreter:

**Patentanwälte Wallach, Koch & Partner, 80339
München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**PONATH, D., Paul, Boston, MA 02118, US;
RINGLER, J., Douglas, Revere, MA 02151, US;
JONES, Tarran, S., Hertfordshire WD7 8AG, GB;
NEWMAN, Walter, Boston, MA 02115, US;
SALDANHA, Jose, Middlesex EN1 1TE, GB;
BENDIG, M., Mary, London N20 0XL, GB**

(54) Bezeichnung: **HUMANISIERTES IMMUNGLOBULIN GEGEN DEN ALPHA4BETA7-INTEGRIN**

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

Allgemeiner Stand der Technik

[0001] Integrinrezeptoren sind wichtig für die Regulierung der Rezirkulation und der Rekrutierung von Lymphozyten zu Entzündungsstellen (Carlos, T.M. and Harlan, J.M., Blood, 84:2068-2101 (1994)). Das humane $\alpha 4\beta 7$ -Integrin hat mehrere Liganden, wobei eines davon das vaskuläre Schleimhautadressin MAdCAM-1 (Berlin, C., et al., Cell 74:185-195 (1993); Erle, D.J., et al., J. Immunol. 153:517-528 (1994)) ist, welches auf Venolen des hohen Endothels in mesenterischen Lymphknoten und den Peyer-Plaques exprimiert wird (Streeter, P.R., et al., Nature 331:41-46 (1988)). Das $\alpha 4\beta 7$ -Integrin wirkt als Homing-Rezeptor, der die Migration von Lymphozyten zum lymphoiden Gewebe in der Darmschleimhaut vermittelt (Schweighoffer, T., et al., J. Immunol. 151:717-729 (1993)). Darüber hinaus findet eine Wechselwirkung zwischen $\alpha 4\beta 7$ -Integrin und Fibronektin und dem vaskulären Zelladhäsionsmolekül 1 (VCAM-1) statt.

[0002] Bei entzündlichen Darmerkrankungen (IBD) wie ulzerativer Kolitis und Morbus Crohn kann es sich um eine schwächende und progressive Erkrankung handeln, welche mit einer Entzündung des Magendarmtraktes einhergeht. In den Vereinigten Staaten alleine sind geschätzte zwei Millionen Menschen betroffen; zu den Symptomen gehören Bauchschmerzen, Krämpfe, Durchfall und Rektalblutungen. Zur Behandlung von IBD gehörten entzündungshemmende Arzneimittel (wie beispielsweise Kortikosteroide und Sulfasalazin), Immunsuppressiva (wie beispielsweise 6-Mercaptopurin, Cyclosporin und Azathioprin) und Operationen (wie beispielsweise Kolektomie). Podolsky, New Engl. J. Med., 325:928-937 (1991) und Podolsky, New Engl. J. Med., 325:1008-1016 (1991).

[0003] Antikörper gegen humanes $\alpha 4\beta 7$ -Integrin, wie beispielsweise murine monoklonale Antikörper (mAb Act-1), stören die Bindung von $\alpha 4\beta 7$ -Integrin an MAdCAM-1 (Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1) auf Venolen des hohen Endothels in Schleimhautlymphknoten. Act-1 wurde ursprünglich von Lazarovits, A.I., et al., J. Immunol. 133:1857-1862 (1984) aus Mäusen isoliert, die mit menschlichen Tetanustoxoid-spezifischen T-Lymphozyten immunisiert worden waren, und wurde als IgG1/ κ -Antikörper beschrieben. Eine in jüngerer Zeit erfolgte Analyse des Antikörpers durch Schweighoffer, T., et al., J. Immunol. 151:717-729 (1993) zeigte, dass dieser an eine Untergruppe von humanen CD4⁺-Gedächtnis-T-Lymphozyten binden kann, die das $\alpha 4\beta 7$ -Integrin selektiv exprimieren. Ein ernstes Problem bei der Verwendung muriner Antikörper für therapeutische Anwendungen bei Menschen ist allerdings, dass sie beim Menschen hoch immunogen sind und schnell eine Human-Anti-Maus-Antikörper-Reaktion (HAMA) auslösen, welche die Wirksamkeit des Maus-Antikörpers bei Patienten verringert und eine fortgesetzte Verabreichung verhindert. Die HAMA-Reaktion führt zu einer schnellen Eliminierung des Maus-Antikörpers, wodurch jeglicher therapeutischer Nutzen eingeschränkt ist.

[0004] Es besteht daher Bedarf für verbesserte therapeutische Ansätze bei entzündlichen Darmerkrankungen.

Zusammenfassung der Erfindung

[0005] Die vorliegende Erfindung betrifft ein humanisiertes Immunglobulin, das selektiv an $\alpha 4\beta 7$ -Integrin bindet, wobei das Immunglobulin eine Antigen-bindende Region nicht humanen Ursprungs (z. B. eines Nagetieres) und mindestens einen Anteil eines Immunglobulins humanen Ursprungs umfasst (z. B. eine humane Gerüstregion, eine humane konstante Region vom Gammatyp). In einer Ausführungsform kann das hierin beschriebene humanisierte Immunglobulin mit murinem Act-1 oder LDP-02 (siehe z. B. Beispiel 4) um die Bindung an $\alpha 4\beta 7$ -Integrin konkurrieren. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Antigen-bindende Region des humanisierten Immunglobulins aus dem monoklonalen Antikörper Act-1 abgeleitet (z. B. LDP-02, ein Immunglobulin, welches die variablen Regionen der in [Fig. 11](#) gezeigten leichten Kette (SEQ ID NO: 19) und die in [Fig. 12](#) gezeigten schweren Kette (SEQ ID NO: 21) aufweist).

[0006] Beispielsweise kann das humanisierte Immunglobulin eine Antigen-bindende Region umfassen, welche eine komplementäre hypervariable Region (CDR = Complementarity Determining Region) nicht-menschlichen Ursprungs und eine Gerüstregion (GR) umfasst, die aus einer humanen Gerüstregion abgeleitet ist. In einem Aspekt umfasst das humanisierte Immunglobulin mit Bindungsspezifität für $\alpha 4\beta 7$ -Integrin eine leichte Kette, welche eine CDR umfasst, die aus einem Antikörper nicht-menschlichen Ursprungs abgeleitet ist, der $\alpha 4\beta 7$ bindet, und eine GR, die aus einer leichten Kette menschlichen Ursprungs abgeleitet ist (z. B. GM607'CL), und eine schwere Kette, die eine CDR umfasst, welche aus einem Antikörper nicht-menschlichen Ursprungs abgeleitet ist, der $\alpha 4\beta 7$ bindet, und eine GR, die aus einer schweren Kette menschlichen Ursprungs abgeleitet ist (z. B. 21/28'CLL). In einem anderen Aspekt umfasst die leichte Kette drei CDR, die aus der leich-

ten Kette des Act-1-Antikörpers abgeleitet sind, und die schwere Kette umfasst drei CDR, die aus der schweren Kette des Act-1-Antikörpers abgeleitet sind.

[0007] Die vorliegende Erfindung betrifft auch leichte Ketten eines humanisierten Immunglobulins (z. B. umfassend CDR1, CDR2 und CDR3 der leichten Kette des Act-1-Antikörper und eine GR aus einer humanen leichten Kette) und schwere Ketten eines humanisierten Immunglobulins (z. B. umfassend CDR1, CDR2 und CDR3 der schweren Kette des Act-1-Antikörpers und eine GR aus einer humanen schweren Kette). In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung hierin beschriebene humanisierte schwere und leichte Ketten (z. B. eine humanisierte leichte Kette, welche die variable Region der in [Fig. 7](#) gezeigten leichten Kette (SEQ ID NO: 12) umfasst, eine humanisierte schwere Kette, welche die variable Region der in [Fig. 9](#) gezeigten schweren Kette (SEQ ID NO: 15) umfasst), eine humanisierte leichte Kette, welche die variable Region der in [Fig. 12](#) gezeigten leichten Kette (SEQ ID NO: 21) umfasst, eine humanisierte schwere Kette, welche die variable Region der in [Fig. 11](#) gezeigten schweren Kette (SEQ ID NO: 19) umfasst). Enthalten sind auch humanisierte Immunglobuline, die eine oder mehrere humanisierte leichte und/oder schwere Ketten umfassen.

[0008] Die Erfindung betrifft des Weiteren isolierte Nukleinsäuren, umfassend eine Sequenz, welche ein humanisiertes Immunglobulin der vorliegenden Erfindung kodiert (z. B. einen einzelkettigen Antikörper), sowie isolierte Nukleinsäuren, welche eine Sequenz umfassen, die eine leichte Kette (z. B. SEQ ID NO: 20) oder eine schwere Kette (z. B. SEQ ID 18) eines erfindungsgemäßen humanisierten Immunglobulins kodiert. Beispielsweise stellt die vorliegende Erfindung ein fusioniertes Gen bereit, welches eine leichte oder schwere Kette eines humanisierten Immunglobulins kodiert, umfassend eine erste Nukleinsäuresequenz, die eine aus dem murinen monoklonalen Act-1-Antikörper abgeleitete Antigen-bindende Region kodiert, und eine zweite Nukleinsäuresequenz, die mindestens einen Anteil einer konstanten Region eines Immunglobulins menschlichen Ursprungs kodiert.

[0009] Die vorliegende Erfindung betrifft des Weiteren eine Nukleinsäure, welche ein humanisiertes Immunglobulin mit Bindungsspezifität für $\alpha\beta 7$ -Integrin oder eine Kette eines solchen Immunglobulins kodiert. Beispielsweise ist ein Expressionsvektor bereit gestellt, der ein fusioniertes Gen umfasst, welches eine leichte Kette eines humanisierten Immunglobulins umfasst, umfassend eine Nukleotidsequenz, die eine CDR kodiert, welche aus einer leichten Kette eines nicht-humanen Antikörpers mit Bindungsspezifität für $\alpha\beta 7$ -Integrin abgeleitet ist, und eine Gerüstregion, die aus einer leichten Kette menschlichen Ursprungs abgeleitet ist. Ein anderes Beispiel eines solchen Konstruktes ist ein Expressionsvektor, der ein fusioniertes Gen umfasst, welches eine schwere Kette eines humanisierten Immunglobulins kodiert, umfassend eine Nukleotidsequenz, die eine CDR kodiert, welche aus einer schweren Kette eines nicht-humanen Antikörpers mit Bindungsspezifität für $\alpha\beta 7$ -Integrin abgeleitet ist, und eine Gerüstregion, die aus einer schweren Kette menschlichen Ursprungs abgeleitet ist.

[0010] Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine Wirtszelle, umfassend eine Nukleinsäure der vorliegenden Erfindung, einschließlich eines oder mehrere Konstrukte, die eine Nukleinsäure der vorliegenden Erfindung umfassen. In einer Ausführungsform betrifft die Erfindung eine Wirtszellen, die eine erste rekombinante Nukleinsäure umfasst, welche eine leichte Kette eines humanisierten Immunglobulins kodiert, und eine zweite rekombinante Nukleinsäure, welche eine schwere Kette eines humanisierten Immunglobulins kodiert, wobei die erste Nukleinsäure eine Nukleotidsequenz umfasst, welche eine CDR, die aus der leichten Kette des murinen Act-1-Antikörpers abgeleitet ist, und eine Gerüstregion kodiert, die aus einer leichten Kette menschlichen Ursprungs abgeleitet ist; und wobei die zweite Nukleinsäure eine Nukleotidsequenz umfasst, welche eine CDR, die aus der schweren Kette des murinen Act-1-Antikörpers abgeleitet ist, und eine Gerüstregion kodiert, die aus einer schweren Kette menschlichen Ursprungs abgeleitet ist.

[0011] Die vorliegende Erfindung stellt auch ein Verfahren zum Herstellen eines humanisierten Immunglobulins bereit, umfassend das Aufrechterhalten einer Wirtszelle der vorliegenden Erfindung unter Bedingungen, die für die Expression eines humanisierten Immunglobulins geeignet sind, wodurch (eine) humanisierte Immunglobulinkette(n) exprimiert wird (werden) und ein humanisiertes Immunglobulin produziert wird. Das Verfahren kann des Weiteren den Schritt des Isolierens des humanisierten Immunglobulins umfassen.

[0012] Die humanisierten Immunglobuline der vorliegenden Erfindung können weniger immunogen sein als ihre murinen oder anderen nicht-humanen Gegenstücke. Daher können die hierin beschriebenen humanisierten Immunglobuline als therapeutische Mittel beim Menschen verwendet werden, zum Beispiel, um die Heimfindung (Homing) von Lymphozyten zum Schleimhautlymphgewebe zu steuern und damit die Entzündungsreaktionen im Darm zu verringern.

[0013] Die Erfindung betrifft des Weiteren ein humanisiertes Immunglobulin der vorliegenden Erfindung für die Verwendung bei Diagnose oder Therapie (einschließlich Vorbeugung). In einer Ausführungsform betrifft die Erfindung ein humanisiertes Immunglobulin der vorliegenden Erfindung zur Verwendung bei der Behandlung von Krankheiten in Verbindung mit der Leukozyteninfiltration von Gewebe, zum Beispiel, bei der Behandlung von entzündlichen Erkrankungen, einschließlich Krankheiten, die mit einer Leukozyteninfiltration des Magendarmtraktes (einschließlich des mit dem Darm verbundenen Endothels), anderer Schleimhautgewebe oder von Geweben verbunden sind, die das Molekül MAdCAM-1 exprimieren. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein humanisiertes Immunglobulin der vorliegenden Erfindung zur Verwendung bei der Behandlung einer entzündlichen Darmerkrankung (IBD), wie beispielsweise ulzerative Kolitis oder Morbus Crohn.

[0014] In einem anderen Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung eines humanisierten Immunglobulins der vorliegenden Erfindung für die Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung von Krankheiten in Verbindung mit einer Leukozyteninfiltration von Geweben, beispielsweise bei der Behandlung von entzündlichen Erkrankungen, einschließlich Erkrankungen, die mit einer Leukozyteninfiltration des Magendarmtraktes, anderer Schleimhautgewebe oder von Geweben verbunden sind, die das Molekül MAdCAM-1 exprimieren. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung eines humanisierten Immunglobulins der vorliegenden Erfindung für die Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung einer entzündlichen Darmerkrankung (IBD), wie beispielsweise ulzerative Kolitis oder Morbus Crohn.

Kurzbeschreibung der Figuren

[0015] [Fig. 1](#) ist eine Veranschaulichung einer DNA-Konsensussequenz (SEQ ID NO: 1) und einer abgeleiteten Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 2), umfassend die variable Region, die aus mehreren unabhängigen Klonen der variablen Region der schweren Kette der Maus bestimmt wurde.

[0016] [Fig. 2](#) ist eine Veranschaulichung einer Nukleotidsequenz (SEQ ID NO: 3) und einer abgeleiteten Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 4), umfassend einen Anteil der der Sequenz der variablen Region, bestimmt aus einem unabhängigen Klon einer variablen Region der schweren Kette der Maus, bezeichnet als H2B#34.

[0017] [Fig. 3](#) ist eine Veranschaulichung einer Nukleotidsequenz (SEQ ID NO: 5) und einer abgeleiteten Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 6), umfassend die variable Region mehrerer unabhängiger Klone der variablen Region der leichten Kette der Maus. Die Position zweier Mutanten, die hergestellt wurden, um eine Kall-Schnittstelle zum Klonieren einzuführen, sind angegeben.

[0018] [Fig. 4A](#) ist ein Fluoreszenzschaubild, das die Fähigkeit des murinen Act-1-mAb und eines irrelevanten Kontrollantikörpers der Maus gleichen Isotyps (MOPC 21; IgG1, kappa) zum Färben von HuT 78-Zellen zeigt, die $\alpha\beta 7$ -Integrin exprimieren.

[0019] [Fig. 4B](#) ist ein Fluoreszenzschaubild, das die Fähigkeit (i) des chimären Act-1-Antikörpers, (ii) eines humanen irrelevanten Kontrollantikörpers gleichen Isotyps (IgG1, kappa) und (iii) eines Überstandes von COS-7-Zellen zum Färben von HuT 78-Zellen zeigt, die $\alpha\beta 7$ -Integrin exprimieren.

[0020] [Fig. 5](#) ist eine Ausrichtung (Alignment) der Aminosäuresequenzen der variablen Region der leichten Kette von Act-1 der Maus („Act-1.vl“) (SEQ ID NO: 7) und der variablen Region der leichten Kette des humanen GM 607'CL (SEQ ID NO: 8). Identische Aminosäuren sind durch eine senkrechte Linie und ähnliche Aminosäuren je nach Grad der Ähnlichkeit durch vier oder zwei Punkte gekennzeichnet. CDR sind in Klammer gesetzt und markiert, und die Reste sind sequenziell nummeriert.

[0021] [Fig. 6](#) ist eine Ausrichtung (Alignment) der Aminosäuresequenzen der variablen Region der schweren Kette von Act-1 der Maus („Act-1.vh“) (SEQ ID NO: 9) und der variablen Region der schweren Kette des humanen 21/28'CL (SEQ ID NO: 10). Identische Aminosäuren sind durch eine senkrechte Linie und ähnliche Aminosäuren je nach Grad der Ähnlichkeit durch vier oder zwei Punkte gekennzeichnet. CDR sind in Klammer gesetzt und markiert, und die Reste sind sequenziell nummeriert.

[0022] [Fig. 7](#) ist eine Veranschaulichung der Nukleotidsequenz (SEQ ID NO: 11) und der abgeleiteten Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 12) der variablen Region der leichten Kette von Act-1 der Maus, verknüpft mit der Signalpeptidsequenz der leichten Kette von Act-1 der Maus.

[0023] [Fig. 8](#) ist eine Veranschaulichung der Nukleotidsequenz (SEQ ID NO: 13) und der Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 8) der variablen Region der leichten Kappa-Kette des reifen humanen GM607'CL-Antikörpers.

[0024] [Fig. 9](#) ist eine Veranschaulichung der Nukleotidsequenz und der Aminosäuresequenz der variablen Region der schweren Kette des Act-1-Antikörpers der Maus. Die Nukleotidsequenz der variablen Region ist mit einer Nukleotidsequenz verknüpft, die eine abgeleitete Signalpeptidsequenz der schweren Kette von Act-1 der Maus kodiert, um eine zusammengesetzte Sequenz zu erhalten (SEQ ID NOS: 14 und 15). (Die Identität des Primers, der die Region der schweren Kette amplifizierte, wurde aus der zurückgebildeten Sequenz abgeleitet, und eine Aminosäuresequenz des Signalpeptids wurde aus dem Primer, der Downstream-Sequenz und Sequenzen anderer Signalpeptide abgeleitet. Das gezeigte Signalpeptid ist nicht zwingend identisch mit dem des Act-1-Hybridom-Produktes).

[0025] [Fig. 10](#) ist eine Veranschaulichung der Nukleotidsequenz und der Aminosäuresequenz der variablen Region der schweren Kette des humanen 21/28' CL-Antikörpers. Die Nukleotidsequenz, welche die variable Region kodiert, ist mit einer Nukleotidsequenz verknüpft, die eine Signalpeptidsequenz kodiert, welche aus der V_H des humanen Antikörpers HG3'CL abgeleitet ist (Rechavi, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 80:855-859 (1983)), um eine zusammengesetzte Sequenz zu erhalten (SEQ ID NOS: 16 und 17).

[0026] [Fig. 11](#) ist eine Veranschaulichung der Nukleotidsequenz (SEQ ID NO: 18) und der Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 19) eines Anteils der schweren Kette eines humanisierten Act-1-Antikörpers (LDP-02) mit einem Signalpeptid einer schweren Kette.

[0027] [Fig. 12](#) ist eine Veranschaulichung der Nukleotidsequenz (SEQ ID NO: 20) und der Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 21) eines Anteils der leichten Kette eines humanisierten Act-1-Antikörpers (LDP-02) mit einem Signalpeptid einer leichten Kette.

[0028] [Fig. 13](#) ist eine Veranschaulichung der Nukleotidsequenz überlappender komplementärer Oligonukleotide, bezeichnet als L1-L6 (SEQ ID NOS: 22-27), die verwendet wurden, um die leichte Kette eines humanisierten Act-1-Immunglobulins (LDP-02) herzustellen, und die Nukleotidsequenz überlappender komplementärer Oligonukleotide, bezeichnet als H1-H10 (SEQ ID NOS: 28-37), die verwendet wurden, um die schwere Kette des humanisierten Act-1-Immunglobulins herzustellen.

[0029] [Fig. 14](#) ist ein Fluoreszenzschaubild, das die Färbung von HuT 78-Zellen mit einer Maus-Mensch-Chimäre des Act-1-Immunglobulins, einem humanisierten Act-1-Immunglobulin oder einem irrelevanten humanen Kontrollantikörper gleichen Isotyps (IgG1, kappa) zeigt.

[0030] [Fig. 15](#) ist ein Schaubild, das die Ergebnisse einer Titration von biotinyliertem murinem Act-1 und humanisiertem Act-1 (LDP-02/3A9/LOT#1, Beispiel 4), durchgeführt durch Durchflusszytometrie mit Hut-78-Zellen.

[0031] [Fig. 16](#) ist ein Schaubild, das die kompetitive Hemmung der Bindung von biotinyliertem murinem Act-1 durch murines Act-1 oder ein humanisiertes Act-1-Immunglobulin (LDP-02/3A9/LOT#1, Beispiel 4) im Vergleich mit muriner IgG1-Kontrolle oder humaner IgG1-Kontrolle zeigt.

[0032] [Fig. 17](#) ist ein Schaubild, das die Ergebnisse eines ⁵¹Chrom-Freisetzungssassay als komplementvermittelter Zelllyse humaner peripherer mononukleärer Blutzellen in Gegenwart von (a) CAMPATH-1H, (b) CAMPATH-1G, (c) humanem IgG1, (d) LDP-02/3A9/Charge Nr. 1 (Beispiel 4) oder (e) LDP-01 (humanisierter Anti-CD18, Fc-mutiert) in Konzentrationen von 50, 25, 5, 2,5 und 0,5 µg/ml.

[0033] [Fig. 18A–Fig. 18B](#) sind Schaubilder, welche die Ergebnisse eines Adhäsionsassays zeigen, mit dem die Hemmung der Adhäsion durch murinen Act-1 ([Fig. 18A](#)), murines IgG1 ([Fig. 18A](#)), LDP-02/3A9/Charge Nr. 1 ([Fig. 18B](#)) oder humanes IgG1 ([Fig. 18B](#)) von α4β7-tragenden Zellen (RPMI 8866) und einer humanen MAdCAM-1-Ig-Chimäre (Immunadhäsion) überwacht wird.

[0034] [Fig. 19](#) ist ein Schaubild, das die Färbung von HuT 78-Zellen mit (a) LDP-02 (Fc-mutiert), (b) einem Derivat von LDP-02 (Fc-mutiert) mit einer Mutation in der leichten Kette (MV4) plus einer Doppelmutation in der schweren Kette (R38K, A40R) oder (c) einem irrelevanten humanen Kontrollantikörper mit gleichem Isotyp (IgG1, kappa) vergleicht.

[0035] Die vorliegende Erfindung betrifft ein humanisiertes Immunglobulin mit Bindungsspezifität für $\alpha\beta 7$ -Integrin, das eine Antigen-bindende Region nicht-humanen Ursprungs und mindestens einen Anteil eines Immunglobulins humanen Ursprungs umfasst. Vorzugsweise können die humanisierten Immunglobuline $\alpha\beta 7$ -Integrin mit einer Affinität von mindestens etwa 10^7 M^{-1} , vorzugsweise von mindestens etwa 10^8 M^{-2} und mehr bevorzugt von mindestens etwa 10^9 M^{-1} binden. In einer Ausführungsform umfasst das humanisierte Immunglobulin eine Antigen-bindende Region nicht-humanen Ursprungs, die $\alpha\beta 7$ -Integrin bindet, und eine konstante Region, die aus einer humanen konstanten Region abgeleitet ist. In einer anderen Ausführungsform umfasst das humanisierte Immunglobulin, das $\alpha\beta 7$ -Integrin bindet, eine hypervariable Region (Complementarity Determining Region, CDR) nicht-humanen Ursprungs und eine variable Gerüstregion humanen Ursprungs und wahlweisen eine konstante Region humanen Ursprungs. Beispielsweise kann das humanisierte Immunglobulin eine schwere Kette und eine leichte Kette umfassen, wobei die leichte Kette eine hypervariable Region umfasst, die aus einem Antikörper nicht-humanen Ursprungs abgeleitet ist, der $\alpha\beta 7$ -Integrin bindet, und eine Gerüstregion, die aus einer leichten Kette humanen Ursprungs abgeleitet ist, und die schwere Kette eine hypervariable Region umfasst, die aus einem Antikörper nicht-humanen Ursprungs abgeleitet ist, der $\alpha\beta 7$ -Integrin bindet, und eine Gerüstregion, die aus einer schweren Kette humanen Ursprungs abgeleitet ist.

[0036] Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine leichte Kette eines humanisierten Immunglobulins oder eine schwere Kette eines humanisierten Immunglobulins. In einer Ausführungsform betrifft die Erfindung eine humanisierte leichte Kette, umfassend eine hypervariable Region (CDR) einer leichten Kette (d. h. eine oder mehrere hypervariable Regionen (CDR)) nicht-humanen Ursprungs und eine Gerüstregion einer humanen leichten Kette. In einer anderen Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung eine schwere Kette eines humanisierten Immunglobulins, umfassend eine hypervariable Region (CDR) einer schweren Kette (d. h. eine oder mehrere hypervariable Regionen (CDR)) nicht-humanen Ursprungs und eine Gerüstregion einer humanen schweren Kette. Die hypervariablen Regionen (CDR) können aus einem nicht-humanen Immunglobulin abgeleitet sein.

[0037] Natürlich vorkommende Immunglobuline haben eine gemeinsame Kernstruktur, in welcher zwei identische leichte Ketten (etwa 24 kD) und zwei identische schwere Ketten (etwa 55 oder 70 kD) ein Tetramer bilden. Der aminoterminal Anteil jeder Kette ist als variable (V) Region bekannt und lässt sich von den konstanten (C) Regionen des Restes jeder Kette mit höherem Konservierungsgrad unterscheiden. Innerhalb der variablen Region der leichten Kette befindet sich ein C-terminaler Anteil, die so genannte J-Region. Innerhalb der variablen Region der schweren Kette befindet sich außer der J-Region eine D-Region. Die Aminosäuresequenzvariation in Immunglobulinen ist auf drei separate Regionen in den V-Regionen beschränkt, die als hypervariable Regionen oder Komplementarität-determinierende Regionen (Complementarity-determining regions, CDR) bekannt sind und an der Antigenbindung direkt beteiligt sind. Ausgehend vom Aminoterminus werden diese Regionen respektive als CDR1, CDR2 und CDR3 bezeichnet. Die CDR werden durch konserviertere Gerüstregionen (GR) an Ort und Stelle gehalten. Ausgehend vom Aminoterminus werden diese Regionen respektive als GR1, GR2, GR3 und GR4 bezeichnet. Die Positionen von CDR- und GR-Regionen und ein Nummerierungssystem wurden von Kabat et al. definiert (Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fünfte Auflage, U.S. Department of Health und Human Services, U.S. Government Printing Office (1991); siehe auch Tabellen 3 und 4).

[0038] Humane Immunglobuline lassen sich, je nach dem Isotyp der schweren Kette, in Klassen und Unterklassen einteilen. Die Klassen umfassen IgG, IgM, IgA, IgD und IgE, in denen die schweren Ketten respektive vom Typ gamma (γ), my (μ), alpha (α), delta (δ) oder epsilon (ϵ) sind. Unterklassen umfassen IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 und IgA2, in denen die schweren Ketten respektive vom Typ $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$, $\alpha 1$ und $\alpha 2$ sind. Humane Immunglobulinmoleküle einer ausgewählten Klasse oder Unterklasse können eine leichte Kette vom Typ kappa (κ) oder lambda (λ) aufweisen. Siehe z. B. Cellular und Molecular Immunology, Wonsiewicz, M.J., Ed., Kapitel 45, S. 41-50, W. B. Saunders Co, Philadelphia, PA (1991); Nisonoff, A., Introduction to Molecular Immunology, 2. Aufl., Kapitel 4, S. 45-65, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1984).

[0039] Der Begriff „Immunglobulin“, wie hierin verwendet, umfasst ganze Antikörper und deren biologisch funktionelle Fragmente. Solche biologisch funktionellen Fragmente bewahren mindestens eine Antigen-bindende Funktion eines entsprechenden Vollängen-Antikörpers (z. B. Spezifität für $\alpha\beta 7$ des Act-1-Antikörpers) und behalten vorzugsweise die Möglichkeit zur Hemmung der Wechselwirkung von $\alpha\beta 7$ mit einem oder mehreren seiner Liganden (z. B. MAdCAM-1, Fibronectin). In einer besonders bevorzugten Ausführungsform können biologisch funktionelle Fragmente die Bindung von $\alpha\beta 7$ an das mukosale Addressin (MAdCAM-1) hemmen. Beispiele biologisch funktioneller Antikörperfragmente, die verwendet werden können, umfassen Frag-

mente, die an $\alpha 4\beta 7$ -Integrin binden können, wie beispielsweise Einzelketten-Antikörper, Fv-, Fab-, Fab'- und F(ab')₂-Fragmente. Solche Fragmente können durch enzymatische Spaltung oder Rekombinationstechniken hergestellt werden. Es kann beispielsweise Papain-Spaltung zur Erzeugung von Fab-Fragmenten oder Pepsin-Spaltung zur Erzeugung von F(ab')₂-Fragmenten verwendet werden. Antikörper können auch in unterschiedlichen trunkeerten Formen produziert werden, indem Antikörpergene, in denen eines oder mehrere Stoppcodons aufwärts (upstream) der natürlichen Stoppstelle eingeführt worden sind, verwendet werden. Beispielsweise kann ein chimäres Gen, das die schwere Kette eines F(ab')₂-Fragmentes kodiert, entworfen werden, um DNA-Sequenzen zu umfassen, welche die CH₁-Domäne und die Scharnierregion der schweren Kette kodieren.

[0040] Der Begriff „humanisiertes Immunglobulin“, wie hierin verwendet, betrifft ein Immunglobulin, das Anteile von Immunglobulinen unterschiedlichen Ursprungs umfasst, wobei mindestens ein Anteil humanen Ursprungs ist. Beispielsweise kann der humanisierte Antikörper Anteile umfassen, die von einem Immunglobulin nicht-humanen Ursprungs mit der erforderlichen Spezifität, wie beispielsweise einer Maus, und von Immunglobulinsequenzen humanen Ursprungs (z. B. chimäres Immunglobulin) abgeleitet sind, die durch konventionelle Techniken (z. B. synthetisch) chemisch miteinander verbunden oder mithilfe von Gentechnik als ein kontiges Polypeptid hergestellt werden (z. B. kann DNA, die Proteinanteile des chimären Antikörpers kodiert, exprimiert werden, um eine kontige Polypeptidkette zu produzieren). Ein weiteres Beispiel eines humanisierten Immunglobulins der vorliegenden Erfindung ist ein Immunglobulin, das eine oder mehrere Immunglobulinketten umfasst, welche eine CDR umfassen, die von einem Antikörper nicht-humanen Ursprungs abgeleitet ist, und eine Gerüstregion, die von einer leichten und/oder schweren Kette humanen Ursprungs abgeleitet ist (z. B. mit CDR-Regionen versehene (CDR-grafted) Antikörper mit oder ohne Veränderungen des Gerüsts). Der Begriff "humanisiertes Immunglobulin" betrifft daher auch chimäre oder mit CDR-Regionen versehene Einzelketten-Antikörper. Siehe z. B. Cabilly et al., US-Patent Nr. 4,816,567; Cabilly et al., Europäisches Patent Nr. 0,125,023 B1; Boss et al., US-Patent Nr. 4,816,397; Boss et al., Europäisches Patent Nr. 0,120,694 B1; Neuberger, M.S. et al., WO 86/01533; Neuberger, M.S. et al., European Patent No. 0,194,276 B1; Winter, US-Patent Nr. 5,225,539; Winter, Europäisches Patent Nr. 0,239,400 B1; Padlan, E.A. et al., Europäische Patentanmeldung Nr. 0,519,596 A1. Siehe auch Ladner et al., US-Patent Nr. 4,946,778; Huston, US-Patent Nr. 5,476,786; und Bird, R.E. et al., Science, 242: 423-426 (1988)), hinsichtlich Einzelketten-Antikörper.

[0041] Die Antigen-bindende Region des humanisierten Immunglobulins (der nicht-humane Anteil) kann aus einem Immunglobulin nicht-humanen Ursprungs abgeleitet sein (wird als Spender-Immunglobulin bezeichnet), das Bindungsspezifität für $\alpha 4\beta 7$ -Integrin aufweist. Beispielsweise kann eine geeignete Antigen-bindende Region von einem murinen monoklonalen Act-1-Antikörper abgeleitet sein (Lazarovits, A.I. et al., J. Immunol., 133(4): 1857-1862 (1984)); siehe z. B. Beispiel 1-3). Andere Quellen umfassen $\alpha 4\beta 7$ -Integrin-spezifische Antikörper, die nicht-humanen Ursprungs sind, wie beispielsweise von einem Nagetier (z. B. Maus, Ratte), Kaninchen, Schwein, einer Ziege oder nicht-humanen Primaten (z. B. Affe) stammen. Es können andere polyklonale oder monoklonale Antikörper hergestellt werden, beispielsweise Antikörper, die an dasselbe oder ein ähnliches Epitop binden wie der Act-1-Antikörper, (z. B. Kohler et al., Nature, 256:495-497 (1975); Harlow et al., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor, NY); und Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2 (Supplement 27, Sommer '94), Ausubel et al., Hrsg. (John Wiley & Sons: New York, NY), Kapitel 11 (1991)).

[0042] Beispielsweise können Antikörper in einem geeigneten Säuger (z. B. einer Maus, einer Ratte, einem Kaninchen oder einem Schaf) gegen ein geeignetes Immunogen erzeugt werden. Beispiele geeigneter Immunogene sind Zellen, die $\alpha 4\beta 7$ tragen, Membranfraktionen, die $\alpha 4\beta 7$ enthalten, immunogene Fragmente von $\alpha 4\beta 7$, ein mit einem geeigneten Träger konjugiertes $\beta 7$ -Peptid. Antikörper produzierende Zellen (z. B. ein Lymphozyt) können beispielsweise aus Lymphknoten oder der Milz eines immunisierten Tieres isoliert werden. Die Zellen können dann mit einer geeigneten immortalisierten Zelle (z. B. einer Myelomzelllinie) fusioniert werden, wodurch ein Hybridom gebildet wird. Fusionierte Zellen können durch Anwendung von Selektionskulturtechniken isoliert werden. Zellen, die Antikörper mit der gewünschten Spezifität produzieren, können durch einen geeigneten Assay (z. B. ELISA) selektiert werden. Immunglobuline nicht-humanen Ursprungs mit Bindungsspezifität für $\alpha 4\beta 7$ -Integrin können auch aus Antikörper-Bibliotheken (z. B. einer Phagenbibliothek, die nicht-humane Fab-Moleküle enthält) erhalten werden.

[0043] In einer Ausführungsform umfasst die Antigen-bindende Region des humanisierten Immunglobulins eine CDR nicht-humanen Ursprungs. In dieser Ausführungsform umfasst das humanisierte Immunglobulin mit Bindungsspezifität für $\alpha 4\beta 7$ -Integrin mindestens eine CDR nicht-humanen Ursprungs. Beispielsweise können CDR aus den variablen Regionen leichter und schwerer Ketten von Immunglobulinen nicht-humanen Ursprungs derart abgeleitet werden, dass ein humanisiertes Immunglobulin im Wesentlichen CDR1, CDR2 und/oder CDR3 einer schweren Kette und/oder CDR1, CDR2 und/oder CDR3 einer leichten Kette eines oder

mehrerer Immunglobuline nicht-humanen Ursprungs aufweist, und das resultierende humanisierte Immunglobulin weist Bindungsspezifität für $\alpha 4\beta 7$ -Integrin auf. Vorzugsweise sind alle drei CDR einer ausgewählten Kette im Wesentlichen gleich wie die CDR einer korrespondierenden Kette eines Spenders, und mehr bevorzugt sind alle drei CDR der leichten und schweren Kette im Wesentlichen gleich wie die CDR einer korrespondierenden Kette eines Spenders.

[0044] Der Anteil des humanisierten Immunglobulins oder der Immunglobulinkette, der humanen Ursprungs ist (der humane Anteil), kann aus jedem geeigneten humanen Immunglobulin oder jeder geeigneten Immunglobulinkette abgeleitet werden. Beispielsweise kann eine humane konstante Region oder deren Anteil, falls vorhanden, aus den leichten Ketten κ oder λ und/oder den schweren Ketten γ (z. B. $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$), μ , α (z. B. $\alpha 1$, $\alpha 2$), δ oder ϵ humaner Antikörper abgeleitet werden, einschließlich Allelvarianten. Es kann eine besondere konstante Region (z. B. IgG1), deren Varianten oder Anteile ausgewählt werden, um eine Effektorfunktion maßzuschneidern. Beispielsweise kann eine mutierte konstante Region (Variante) in ein Fusionsprotein eingebaut werden, um die Bindung an Fc-Rezeptoren und/oder die Fähigkeit zur Fixierung von Komplement zu minimieren (siehe z. B. Beispiel 3; siehe auch Winter et al., GB 2,209,757 B; Morrison et al., WO 89/07142; Morgan et al., WO 94/29351, 22. Dezember 1994).

[0045] Falls vorhanden, sind humane Gerüstregionen (z. B. der variablen Region der leichten Kette) vorzugsweise von der variablen Region eines humanen Antikörpers abgeleitet, die Sequenzähnlichkeit mit der analogen oder äquivalenten Region (z. B. der variablen Region einer leichten Kette) der Antigen-bindenden Spenderregion aufweist. Andere Quellen für Gerüstregionen für Anteile humanen Ursprungs eines humanisierten Immunglobulins umfassen humane variable Konsensussequenzen (siehe z. B. Beispiel 2; siehe auch Kettleborough, C.A. et al., Protein Engineering 4:773-783 (1991); Carter et al., WO 94/04679, veröffentlicht am 3. März 1994)). Beispielsweise kann die Sequenz des Antikörpers oder der variablen Region, die verwendet werden, um den nicht-humanen Anteil zu erhalten, mit humanen Sequenzen verglichen werden, wie beschrieben in Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fünfte Auflage, U.S. Department of Health und Human Services, U.S. Government Printing Office (1991). In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind die Gerüstregionen einer humanisierten Immunglobulinkette von einer humanen variablen Region abgeleitet, die eine Sequenzgesamtidentität von mindestens etwa 65% und vorzugsweise eine Sequenzgesamtidentität von mindestens etwa 70% mit der variablen Region des nicht-humanen Spenders (z. B. Maus-Act-1-Antikörper) aufweist. Ein humaner Anteil kann auch von einem humanen Antikörper abgeleitet werden, der innerhalb des verwendeten entsprechenden Anteils (z. B. GR) im Vergleich zu dem äquivalenten Anteil (z. B. GR) des nicht-humanen Spenders eine Sequenzgesamtidentität von mindestens etwa 65% und vorzugsweise eine Sequenzgesamtidentität von mindestens etwa 70% aufweist. Wie in Beispiel 2 beschrieben, war die Sequenzgesamtidentität zwischen den variablen Regionen der leichten Kette des Maus-Act-1 und des humanen GM607'CL 71,4%, und die Sequenzgesamtidentität zwischen den variablen Regionen der schweren Kette des Maus-Act-1 und des humanen 21/28'CL war 68,1.

[0046] In einer Ausführungsform umfasst das humanisierte Immunglobulin mindestens eine der Gerüstregionen (GR), die aus einer oder mehreren Ketten eines Antikörpers humanen Ursprungs abgeleitet sind. Die GR kann daher eine GR1 und/oder GR2 und/oder GR3 und/oder GR4 umfassen, die von einem oder mehreren Antikörpern humanen Ursprungs abgeleitet sind. Vorzugsweise umfasst der humane Anteil einer ausgewählten humanisierten Kette GR1, GR2, GR3 und GR4, die von einer variablen Region humanen Ursprungs abgeleitet sind (z. B. aus einer humanen Immunglobulinkette, von einer humanen Konsensussequenz).

[0047] Die Immunglobulinanteile nicht-humanen und humanen Ursprungs zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung weisen Sequenzen auf, die mit den Immunglobulinen und Immunglobulinanteilen, aus denen sie abgeleitet sind, oder zu deren Varianten identisch sind. Solche Varianten umfassen Mutanten, die sich durch Addition, Deletion oder Substitution eines oder mehrerer Reste unterscheiden. Wie oben angegeben, sind die CDR nicht-humanen Ursprungs im Wesentlichen gleich wie in dem nicht-humanen Spender, und sind vorzugsweise identisch zu den CDR des nicht-humanen Spenders. Wie in Beispiel 2 beschrieben, können Veränderungen in der Gerüstregion vorgenommen werden, wie beispielsweise solche, die einen Rest der Gerüstregion humanen Ursprungs durch einen Rest aus der entsprechenden Position des Spenders ersetzen. Es können eine oder mehrere Mutation in der Gerüstregion vorgenommen werden, einschließlich Deletionen, Insertionen und Substitutionen einer oder mehrerer Aminosäuren. In Beispiel 2 sind mehrere solcher Substitutionen in dem Entwurf eines humanisierten Act-1-Antikörpers beschrieben. Für einen ausgewählten humanisierten Antikörper oder eine ausgewählte humanisierte Antikörperkette können Gerüstmutationen entworfen werden, wie hierin beschrieben ist. Vorzugsweise können die humanisierten Immunglobuline $\alpha 4\beta 7$ -Integrin mit einer Affinität binden, die ähnlich oder besser ist wie die des nicht-humanen Spenders. Varianten können durch verschiedene geeignete Verfahren hergestellt werden, einschließlich durch Mutagenese eines nicht-humanen Spen-

ders oder von humanen Empfängerketten.

[0048] Die humanisierten Immunglobuline der vorliegenden Erfindung weisen Bindungsspezifität für humanes $\alpha\beta 7$ -Integrin auf und umfassen humanisierte Immunglobuline (einschließlich Fragmente), die Determinanten der $\alpha 4$ - und/oder $\beta 7$ -Ketten des Heterodimers binden können. In einer bevorzugten Ausführungsform weist das humanisierte Immunglobulin der vorliegenden Erfindung mindestens eine Funktion auf, die für murine Act-1-Antikörper charakteristisch ist, wie beispielsweise einer Bindungsfunktion (z. B. Aufweisen von Spezifität für $\alpha\beta 7$ -Integrin, Aufweisen derselben oder einer ähnlichen Epitopspezifität) und/oder einer Hemmfunktion (z. B. die Fähigkeit, $\alpha\beta 7$ -abhängige Adhäsion in vitro und/oder in vivo zu hemmen, wie beispielsweise die Fähigkeit, die Bindung von $\alpha\beta 7$ -Integrin an MAdCAM-1 in vitro und/oder in vivo zu hemmen, oder die Fähigkeit, die Bindung einer Zelle, welche $\alpha\beta 7$ -Integrin trägt, an einen Liganden davon (z. B. eine Zelle, die MAdCAM-1 trägt) zu hemmen. Bevorzugte humanisierte Immunglobuline können daher die Bindungsspezifität des murinen Act-1-Antikörpers, die Epitopspezifität muriner Act-1-Antikörper (z. B. Fähigkeit zum Konkurrieren mit murinem Act-1, einem chimären Act-1-Antikörper (siehe z. B. Beispiel 1) oder humanisiertem Act-1 (z. B. LDP-02) um die Bindung an $\alpha\beta 7$ (z. B. auf einer Zelle, die $\alpha\beta 7$ -Integrin trägt)), und/oder eine Hemmfunktion aufweisen.

[0049] Die Bindungsfunktion eines humanisierten Immunglobulins mit Bindungsspezifität für $\alpha\beta 7$ -Integrin kann durch immunologische Standardverfahren festgestellt werden, zum Beispiel durch Anwendung von Assays, welche die Bildung eines Komplexes zwischen humanisiertem Immunglobulin und $\alpha\beta 7$ -Integrin überwachen (z. B. eine Membranfraktion umfassend $\alpha\beta 7$ -Integrin auf einer Zelle, die $\alpha\beta 7$ -Integrin trägt, wie beispielsweise ein humaner Lymphozyt (z. B. ein Lymphozyt der Untergruppe $CD4+\alpha 4^{hi}, \beta 1^{10}$), eine humane Lymphozytenzelllinie oder eine rekombinante Wirtszelle, die eine $\alpha 4$ und/oder $\beta 7$ kodierende Nukleinsäure umfasst und $\alpha\beta 7$ -Integrin exprimiert).

[0050] Bindungs- und/oder Adhäsionsassays oder andere geeignete Verfahren können auch in Verfahren zur Identifikation und/oder Isolierung humanisierter Immunglobuline (z. B. aus einer Bibliothek) mit der erforderlichen Spezifität verwendet werden (z. B. ein Assay, der die Adhäsion zwischen einer Zelle, die ein $\alpha\beta 7$ -Integrin trägt, und einem dessen Liganden (z. B. eine zweite Zelle, die MAdCAM exprimiert, eine MAdCAM-Ig-Chimäre (siehe z. B. Beispiel 4)) überwacht, oder andere geeignete Verfahren).

[0051] Die Immunglobulinanteile nicht-humanen und humanen Ursprungs zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung umfassen leichte Ketten, schwere Ketten und Anteile leichter und schwerer Ketten. Diese Immunglobulinanteile können von Immunglobulinen erhalten oder abgeleitet werden (z. B. durch De-novo-Synthese eines Anteils), oder es können Nukleinsäuren produziert und exprimiert werden, die ein Immunglobulin oder dessen Kette mit der gewünschten Eigenschaft kodieren (z. B. Bindung von $\alpha\beta 7$ -Integrin, Sequenzähnlichkeit). Humanisierte Immunglobuline, welche die gewünschten Anteile (z. B. Antigen-bindende Region, CDR, GR, C-Regionen) humanen und nicht-humanen Ursprungs umfassen, können produziert werden, indem synthetische und/oder rekombinante Nukleinsäuren zur Herstellung von Genen verwendet werden (z. B. cDNA), welche die gewünschte humanisierte Kette kodieren. Zur Herstellung eines Anteils einer Kette, können eines oder mehrere Stoppcodons an der gewünschten Position eingefügt werden. Beispielsweise lassen sich unter Verwendung von PCR-Mutageneseverfahren Nukleinsäure-(z. B. DNA)-Sequenzen konstruieren, die neu entworfene humanisierte variable Regionen kodieren, um vorhandene DNA-Sequenzen zu verändern (siehe z. B. Kamman, M., et al., Nucl. Acids Res. 17:5404 (1989)). PCR-Primer, die für die neuen CDR kodieren, können mit einer DNA-Vorlage einer zuvor humanisierten variablen Region hybridisiert werden, die auf derselben oder einer sehr ähnlichen humanen variablen Region basiert (Sato, K., et al., Cancer Research 53:851-856 (1993)). Steht keine ähnliche DNA-Sequenz zur Verwendung als Vorlage zur Verfügung, kann aus synthetischen Oligonukleotiden eine Nukleinsäure konstruiert werden, die eine Sequenz umfasst, welche die Sequenz einer variablen Region kodiert (siehe z. B. Kolbinger, F., Protein Engineering 8:971-980 (1993)). In die Nukleinsäure kann auch eine Sequenz eingebaut werden, die ein Signalpeptid kodiert (z. B. bei der Synthese, beim Einfügen in einen Vektor). Wenn die natürliche Signalpeptidsequenz nicht verfügbar ist, kann eine Signalpeptidsequenz eines anderen Antikörpers verwendet werden (siehe z. B. Kettleborough, C.A., Protein Engineering 4:773-783 (1991)). Unter Verwendung dieser Verfahren, hierin beschriebener Verfahren oder anderer geeigneter Verfahren können leicht Varianten hergestellt werden (siehe z. B. Beispiel 5). In einer Ausführungsform können klonierte variable Regionen (z. B. von LDP-02) mutagenisiert werden, und es können Sequenzen ausgewählt werden, die Varianten mit der gewünschten Spezifität kodieren (z. B. aus einer Phagenbibliothek; siehe z. B. Krebber et al., U.S. 5,514,548; Hoogenboom et al., WO 93/06213, veröffentlicht am 1. April 1993)).

Nukleinsäuren und Konstrukte, die diese umfassen

[0052] Die vorliegende Erfindung betrifft auch isolierte und/oder rekombinante (einschließlich z. B. im Wesentlichen reine) Nukleinsäuren, die Sequenzen umfassen, welche eine leichte oder eine schwere Kette eines humanisierten Immunglobulins oder humanisierter Immunglobuline der vorliegenden Erfindung kodieren.

[0053] Nukleinsäuren, auf die hierin als „isoliert“ Bezug genommen wird, sind Nukleinsäuren, die von den Nukleinsäuren der genomischen DNA oder der zellulären RNA ihrer Herkunftsquelle abgetrennt worden sind (z. B. wie sie in Zellen oder in einem Gemisch von Nukleinsäuren wie beispielsweise in einer Bibliothek vorliegt), und umfassen Nukleinsäuren, die durch hierin beschriebene Verfahren oder andere geeignete Verfahren erhalten worden sind, einschließlich im Wesentlichen reine Nukleinsäuren, Nukleinsäuren, die durch chemische Synthese, durch Kombinationen biologischer und chemischer Verfahren produziert worden sind, und isolierte rekombinante Nukleinsäuren (siehe z. B. Daugherty, B.L. et al., *Nucleic Acids Res.*, 19(9): 2471-2476 (1991); Lewis, A.P. und J.S. Crowe, *Gene*, 101: 297-302 (1991)).

[0054] Nukleinsäuren, auf die hierin als „rekombinant“ Bezug genommen wird, sind Nukleinsäuren, die durch DNA-Rekombinationsverfahren produziert worden sind, einschließlich solche Nukleinsäuren, die durch Verfahren erzeugt werden, welche auf einem Verfahren der artifiziellen Rekombination beruhen, wie beispielsweise die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) und/oder Klonieren in einen Vektor unter Verwendung von Restriktionsenzymen. "Rekombinante" Nukleinsäuren sind auch solche, die aus Rekombinationsereignissen resultieren, die durch die natürlichen Mechanismen von Zellen stattfinden, die aber selektiert werden, nachdem Nukleinsäuren in die Zellen eingeführt werden, die ein gewünschtes Rekombinationsereignis erlauben und wahrscheinlich machen.

[0055] Die vorliegende Erfindung betrifft spezifischer auch isolierte und/oder rekombinante Nukleinsäuren, die eine Nukleotidsequenz umfassen, welche ein humanisiertes Act-1-Immunglobulin (d. h. ein humanisiertes Immunglobulin der vorliegenden Erfindung, in dem der nicht-humane Anteil aus dem murinen monoklonalen Act-1-Antikörper abgeleitet ist) oder dessen Kette kodiert. In einer Ausführungsform umfasst die leichte Kette drei hypervariable Regionen (CDR), die von der leichten Kette des Act-1-Antikörpers abgeleitet sind, und die schwere Kette umfasst drei hypervariable Regionen (CDR), die aus der schweren Kette des Act-1-Antikörpers abgeleitet sind. Solche Nukleinsäuren umfassen zum Beispiel (a) eine Nukleinsäure, die eine Sequenz umfasst, welche ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz der variablen Region der schweren Kette eines humanisierten Act-1 Immunglobulins umfasst (z. B. die variable Region der schweren Kette von [Fig. 11](#) (SEQ ID NO: 19), die variable Region der schweren Kette von [Fig. 9](#) (SEQ ID NO: 15)), (b) eine Nukleinsäure, welche eine Sequenz umfasst, die ein Polypeptid kodiert, welches die Aminosäuresequenz der variablen Region der leichten Kette eines humanisierten Act-1-Immunglobulins umfasst (z. B. die variable Region der leichten Kette von [Fig. 12](#) (SEQ ID NO: 21), die variable Region der leichten Kette von [Fig. 7](#) (SEQ ID NO: 12)), (c) eine Nukleinsäure, die eine Sequenz umfasst, welche mindestens einen funktionellen Anteil der variablen Region der leichten oder schweren Kette eines humanisierten Act-1-Immunglobulins umfasst (z. B. einen Anteil, der für die Antigenbindung eines humanisierten Immunglobulins, das die Kette umfasst, ausreichend ist). Aufgrund der Degeneration des genetischen Codes können verschiedene Nukleinsäuren hergestellt werden, die ein ausgewähltes Polypeptid kodieren. In einer Ausführungsform umfasst die Nukleinsäure die Nukleotidsequenz der variablen Region, wie ausgeführt bzw. im Wesentlichen ausgeführt in [Fig. 11](#) (SEQ ID NO: 18), oder wie ausgeführt bzw. im Wesentlichen ausgeführt in [Fig. 12](#) (SEQ ID NO: 20), einschließlich doppel- oder einzelsträngige Polynukleotide. (Obgleich verschiedene Figuren Polypeptide veranschaulichen können, die größer als die variable Region sind (d. h. eine Signalpeptidkodierungssequenz oder einen Anteil einer Kodierungssequenz einer konstanten Region umfassen), soll die Bezugnahme auf die variable Region einer bestimmten Figur bedeuten, dass der Anteil der variablen Region der gezeigten Sequenz enthalten ist). Isolierte und/oder rekombinante Nukleinsäuren, die diese Kriterien erfüllen, können Nukleinsäuren umfassen, die Sequenzen kodieren, welche identisch sind zu den Sequenzen humanisierter Act-1-Antikörper oder deren Varianten, wie oben beschrieben.

[0056] Nukleinsäuren der vorliegenden Erfindung können bei der Herstellung humanisierter Immunglobuline verwendet werden, die Bindungsspezifität für $\alpha 4\beta 7$ -Integrin aufweisen. Beispielsweise kann eine Nukleinsäure (z. B. DNA), die ein humanisiertes Immunglobulin der vorliegenden Erfindung kodiert, in ein geeignetes Konstrukt (z. B. einen Vektor) zur weiteren Manipulation von Sequenzen oder zur Produktion des kodierten Polypeptids in geeigneten Wirtszellen eingebaut werden.

Verfahren der Herstellung humanisierter Immunglobuline mit Spezifität für $\alpha 4\beta 7$ -Integrin

[0057] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren des Herstellens eines humanisierten Immunglobulins, das Bindungsspezifität für $\alpha 4\beta 7$ -Integrin aufweist. Das humanisierte Immunglobulin kann beispielsweise durch die Expression einer oder mehrerer rekombinanter Nukleinsäuren erhalten werden, die beispielsweise ein humanisiertes Immunglobulin mit Bindungsspezifität für $\alpha 4\beta 7$ -Integrin in einer geeigneten Wirtszelle kodieren.

[0058] Konstrukte oder Expressionsvektoren, die für die Expression eines humanisierten Immunglobulins mit Bindungsspezifität für $\alpha 4\beta 7$ -Integrin geeignet sind, sind ebenfalls bereitgestellt. Die Konstrukte können in eine geeignete Wirtszelle eingeführt werden, und Zellen, die ein humanisiertes Immunglobulin der vorliegenden Erfindung exprimieren, können produziert und in Kultur gehalten werden. Geeignete Wirtszellen können prokaryotisch sein, einschließlich Bakterienzellen wie beispielsweise *E. coli*, *B. subtilis* und/oder andere geeignete Bakterien, oder eukaryotisch sein, wie beispielsweise Pilz- oder Hefezellen (z. B. *Pichia pastoris*, *Aspergillus species*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa*), oder andere niedere eukaryotischen Zellen und Zellen höherer Eukaryoten wie beispielsweise die von Insekten (z. B. Sf9-Insektenzellen (WO 94/26087, O'Connor, veröffentlicht am 24. November 1994)) oder Säugern (z. B. COS-Zellen, NSO-Zellen, SP2/0, Eierstockzellen des Chinesischen Hamsters (CHO), HuT 78-Zellen, 293-Zellen). (Siehe z. B. Ausubel, F.M. et al., Hrsg. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates und John Wiley & Sons Inc., (1993)).

[0059] Wirtszellen, die ein humanisiertes Immunglobulin mit Bindungsspezifität für $\alpha 4\beta 7$ -Integrin produzieren, können folgenderweise hergestellt werden. Beispielsweise kann eine Nukleinsäure, die die gesamte oder einen Teil der Kodierungssequenz für das gewünschte humanisierte Immunglobulin kodiert, in einen Nukleinsäurevektor eingefügt werden, z. B. einen DNA-Vektor, wie beispielsweise ein Plasmid, Virus oder ein anderes geeignetes Replikon zur Expression. Es sind verschiedene Vektoren verfügbar, einschließlich Vektoren, die in Einzelkopie oder Mehrfachkopie gehalten oder die in das Wirtszellchromosom integriert werden.

[0060] Geeignete Expressionsvektoren können eine Reihe von Komponenten enthalten, einschließlich, aber nicht ausschließlich, eine oder mehrere der Folgenden: einen Replikationsursprung, ein selektierbares Marker, eines oder mehrere Expressionskontrollelemente wie beispielsweise ein Transkriptionskontrollelement (z. B. einen Promotor, einen Enhancer, einen Terminator) und/oder eines oder mehrere Translationssignale, eine Signalsequenz oder eine Leadersequenz für den transport zu Membranen oder Sekretion. In einem Konstrukt kann eine Signalsequenz durch den Vektor oder eine andere Quelle bereitgestellt sein. Beispielsweise können die Transkriptions- und/oder Translationssignale eines Immunglobulins verwendet werden, um die Expression zu steuern.

[0061] Es kann ein Promotor für die Expression in einer geeigneten Wirtszelle bereitgestellt werden. Promotoren können konstitutiv oder induzierbar sein. Beispielsweise kann ein Promotor derart funktionell mit einer Nukleinsäure verknüpft sein, die ein humanisiertes Immunglobulin oder eine humanisierte Immunglobulinkette exprimiert, dass er die Expression des kodierten Polypeptids steuert. Es sind verschiedene geeignete Promotoren für prokaryotische (z. B. die Promotoren *lac*, *tac*, T3, T7 für *E. coli*) und eukaryotische (z. B. Alkoholdehydrogenase der Hefe (ADH1), SV40, CMV) Wirte verfügbar.

[0062] Darüber hinaus umfassen die Expressionsvektoren typischerweise einen selektierbaren Marker für die Selektion von Wirtszellen, die den Vektor tragen, und, im Fall eines replizierbaren Expressionsvektors, einen Replikationsursprung. Gene, die Produkte kodieren, die Antibiotika- oder Arzneimittelresistenz vermitteln, sind gängige selektierbare Marker und können in prokaryotischen (z. B. das β -Lactamasegen (Ampicillinresistenz), das Tet-Gen für Tetracyclinresistenz) und eukaryotischen Zellen (z. B. Gene für Neomycin (G418 oder Geneticin), gpt (Mycophenolsäure), Ampicillin oder Hygromycinresistenz) verwendet werden. Dihydrofolatreduktase-Markergene erlauben die Selektion mit Methotrexat in verschiedenen Wirten. Gene, welche das Genprodukt auxotropher Marker des Wirtes kodieren (z. B. LEU2, URA3, HIS3), werden häufig als selektierbare Marker in Hefen eingesetzt. Die Verwendung viraler Vektoren (z. B. Baculovirus) oder von Phagenvektoren und von Vektoren, die in das Genom der Wirtszelle integrieren können, wie beispielsweise retrovirale Vektoren, werden ebenfalls in Betracht gezogen. Die vorliegende Erfindung betrifft auch Zellen, welche diese Expressionsvektoren tragen.

[0063] Beispielsweise können eine Nukleinsäure (d. h. eine oder mehrere Nukleinsäuren), welche die schwere und die leichte Kette eines humanisierten Immunglobulins mit Bindungsspezifität für $\alpha 4\beta 7$ -Integrin kodiert, oder ein Konstrukt (d. h. eines oder mehrere Konstrukte), die (eine) solche Nukleinsäure(n) umfassen, derart

in eine geeignete Wirtszelle eingeführt werden, dass die Nukleinsäure(n) funktionell mit einem oder mehreren Expressionskontrollelementen verknüpft wird (werden) (z. B. in einem Vektor, in einem Konstrukt, das durch Prozesse in der Zelle hergestellt wird und in das Wirtszellgenom integriert wird), wobei ein Verfahren verwendet wird, das für die ausgewählte Wirtszelle geeignet ist (z. B. Transformation, Transfektion, Elektroporation, Infektion). Wirtszellen können unter Bedingungen gehalten werden, die für Expression geeignet sind (z. B. in Gegenwart eines Inducers, geeigneter Medien, die mit geeigneten Salzen ergänzt sind, Wachstumsfaktoren, Antibiotika, Nährstoffergänzungen, etc.), wobei das bzw. die kodierten Polypeptid(e) produziert werden. Falls gewünscht, kann das kodierte Protein (z. B. humanisierter Act-1-Antikörper) isoliert werden (z. B. aus Wirtszellen, Medium, Milch). Dieser Prozess umfasst die Expression in einer Wirtszelle eines transgenen Tieres (siehe z. B. WO 92/03918, GenPharm International, veröffentlicht am 19. März 1992).

[0064] Es können Fusionsproteine produziert werden, in denen ein humanisiertes Immunglobulin oder eine humanisierte Immunglobulinkette mit einer Nicht-Immunglobulineinheit (d. h. einer Einheit, die in einem in der Natur vorkommenden Immunglobulin nicht vorhanden ist) an einer N-terminalen Stelle, einer C-terminalen Stelle oder intern im Fusionsprotein verknüpft werden. Beispielsweise können einige Ausführungsformen durch Insertion einer Nukleinsäure, welche Immunglobulinsequenzen kodiert, in einen geeigneten Expressionsvektor, beispielsweise einen pET-Vektor (z. B. pET-15b, Novagen), einen Phagenvektor (z. B. pCANTAB 5 E, Pharmacia) oder einen anderen Vektor (z. B. pRIT2T Protein-A-Fusionsvektor, Pharmacia) produziert werden. Das resultierende Konstrukt kann zur Expression in eine geeignete Wirtszelle eingeführt werden. Einige der exprimierten Fusionsproteine können aus einem Zellysat mittels einer geeigneten Affinitätsmatrix isoliert oder gereinigt werden (siehe z. B. Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F.M. et al., Hrsg., Band 2, Suppl. 26, S. 16.4.1-16.7.8 (1991))).

Therapeutische Verfahren und Zusammensetzungen

[0065] Die vorliegende Erfindung stellt humanisierte Immunglobuline bereit, die (1) $\alpha\beta 7$ -Integrin in vitro und/oder in vivo binden können und/oder (2) eine Aktivität oder Funktion eines $\alpha\beta 7$ -Integrin modulieren können, wie beispielsweise (a) Bindungsfunktion (z. B. die Fähigkeit von $\alpha\beta 7$ -Integrin zur Bindung an MAdCAM-1, Fibronectin und/oder VCAM-1) und/oder (b) Leukozyteninfiltrationsfunktion, einschließlich Rekrutierung und/oder Akkumulation von Leukozyten in Geweben (z. B. die Fähigkeit zur Hemmung der Lymphozytenwanderung in Darmschleimhautgewebe). Vorzugsweise können die humanisierten Immunglobuline $\alpha\beta 7$ in vitro und/oder in vivo selektiv binden und $\alpha\beta 7$ -vermittelte Wechselwirkungen hemmen. In einer Ausführungsform kann ein humanisiertes Immunglobulin an $\alpha\beta 7$ -Integrin binden und die Bindung des $\alpha\beta 7$ -Integrins an einen oder mehrere seiner Liganden (z. B. MAdCAM-1, VCAM-1, Fibronectin) hemmen, wobei dadurch die Leukozyteninfiltration von Geweben (einschließlich der Rekrutierung und/oder Akkumulation von Leukozyten in Geweben) vorzugsweise selektiv gehemmt wird. Solche humanisierten Immunglobuline können die zelluläre Adhäsion von Zellen, die ein $\alpha\beta 7$ -Integrin tragen, an vaskuläre Endothelzellen in Schleimhautgewebe, einschließlich darmassoziierte Gewebe, Lymphorgane oder Leukozyten (vor allem Lymphozyten wie beispielsweise T- oder B-Zellen) in vitro und/oder in vivo hemmen. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform kann ein humanisiertes Immunglobulin (z. B. Act-1) die Wechselwirkung von $\alpha\beta 7$ mit MAdCAM-1 und/oder Fibronectin hemmen.

[0066] Die humanisierten Immunglobuline der vorliegenden Erfindung sind für unterschiedliche Verfahren geeignet, die in der Forschung, Diagnose und Therapie Anwendung finden. Beispielsweise können sie verwendet werden, um $\alpha\beta 7$ -Integrin oder dessen Varianten zu erfassen, zu isolieren und/oder zu reinigen (z. B. durch Affinitätsreinigung oder andere geeignete Verfahren) oder um die Struktur (z. B. Konformation) und Funktion von $\alpha\beta 7$ -Integrin zu untersuchen.

[0067] Die humanisierten Immunglobuline der vorliegenden Erfindung können auch bei diagnostischen Verfahren (z. B. in vitro, ex vivo) oder zur Modulierung der Funktion von $\alpha\beta 7$ -Integrin bei therapeutischen (einschließlich vorbeugenden) Anwendungen verwendet werden.

[0068] Beispielsweise können die humanisierten Immunglobuline der vorliegenden Erfindung verwendet werden, um die Menge eines $\alpha\beta 7$ -Integrin in einer Probe zu messen (z. B. in Geweben oder Körperflüssigkeiten wie beispielsweise einem inflammatorischen Exsudat, Blut, Serum, Darmflüssigkeit, auf Zellen, die ein $\alpha\beta 7$ -Integrin tragen). Beispielsweise kann eine Probe (z. B. Gewebe und/oder Körperflüssigkeit) aus einem Individuum erhalten werden, und es kann ein geeignetes immunologisches Verfahren angewandt werden, um die Expression von $\alpha\beta 7$ -Integrin festzustellen und/oder zu messen, einschließlich Verfahren wie beispielsweise ELISA (Enzymelinked Immunosorbent Assays), einschließlich Chemilumineszenzassays, Radioimmunoassay und Immunhistologie. In einer Ausführungsform ist ein Verfahren des Feststellens eines ausgewählten

$\alpha 4\beta 7$ -Integrins in einer Probe bereitgestellt, welches das In-Berührung-bringen einer Probe mit einem humanisierten Immunglobulin der vorliegenden Erfindung unter Bedingungen umfasst, die sich für die spezifische Bindung des humanisierten Immunglobulins an das $\alpha 4\beta 7$ -Integrin und das Feststellen gebildeter Antikörper- $\alpha 4\beta 7$ -Integrin-Komplexe eignen. In einer Anwendung des Verfahrens können humanisierte Immunglobuline verwendet werden, um normales gegenüber entzündetem Gewebe (z. B. von einem Menschen) auf $\alpha 4\beta 7$ -Integrin-Reaktivität und/oder -Expression (z. B. immunhistologisch) zu analysieren, um Assoziationen zwischen IBD und anderen Bedingungen und erhöhte Expression von $\alpha 4\beta 7$ (z. B. in betroffenen Geweben) festzustellen. Die humanisierten Immunglobuline der vorliegenden Erfindung gestatten immunologische Verfahren der Beurteilung des Vorhandenseins von $\alpha 4\beta 7$ -Integrin in normalem gegenüber entzündetem Gewebe, durch welche sich das Vorhandensein einer Krankheit, eines Krankheitsprozesses und/oder die Wirksamkeit einer Anti- $\alpha 4\beta 7$ -Integrin-Therapie bei einer Entzündungserkrankung beurteilen lässt.

[0069] Die humanisierten Immunglobuline der vorliegenden Erfindung können auch verwendet werden, um die Bindungsfunktion und/oder Leukozyten-(z. B. Lymphozyten-, Monozyten-)Infiltrationsfunktion von $\alpha 4\beta 7$ -Integrin zu modulieren (z. B. zu hemmen (reduzieren oder verhindern)). Beispielsweise können humanisierte Immunglobuline, welche die Bindung von $\alpha 4\beta 7$ -Integrin an einen Liganden (d. h. an einen oder mehrere Liganden) hemmen, verfahrensgemäß bei der Behandlung von Krankheiten in Verbindung mit einer Leukozyten-(z. B. Lymphozyten-, Monozyten-)Infiltration von Geweben (einschließlich Rekrutierung und/oder Akkumulation von Leukozyten in Geweben), insbesondere von Geweben, die das Molekül MAdCAM exprimieren, verabreicht werden. Eine wirksame Menge eines humanisierten Immunglobulins der vorliegenden Erfindung (d. h. eines oder mehrere) wird einem Individuum (z. B. einem Säuger, wie beispielsweise einem Menschen oder einem anderen Primaten) verabreicht, um solch eine Krankheit zu behandeln. Beispielsweise können Entzündungserkrankungen, einschließlich Erkrankungen, die mit einer Leukozyteninfiltration des Magendarmtraktes (einschließlich dem darmassoziierten Endothel), anderen Schleimhautgeweben oder Geweben einhergehen, welche das Molekül MAdCAM exprimieren (z. B. darmassoziierte Gewebe, wie beispielsweise Venolen der Lamina propria des Dün- und Dickdarms und die Brustdrüse (z. B. die laktierende Brustdrüse) nach dem vorliegenden Verfahren behandelt werden. Gleichermaßen kann ein Individuum, das eine Erkrankung in Verbindung mit einer Leukozyteninfiltration von Gewebe als Resultat der Bindung von Leukozyten an Zellen (z. B. Endothelzellen) aufweist, die MAdCAM-1 exprimieren, nach der vorliegenden Erfindung behandelt werden.

[0070] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfassen Erkrankungen, die entsprechend behandelt werden können, entzündliche Darmerkrankung (IBD), wie beispielsweise eine ulzerative Kolitis, Morbus Crohn, Ileitis, Zöliakie, einheimische Sprue, Enteropathie in Verbindung mit seronegativen Arthropathien, mikroskopische oder kollagenöse Kolitis, eosinophile Gastroenteritis oder eine Pouchitis nach einer Proktokolektomie und eine ileoanale Anastomose,

[0071] Pankreatitis und insulinabhängiger Diabetes mellitus sind andere Krankheiten, die mit dem vorliegenden Verfahren behandelt werden können. Es wurde berichtet, dass MAdCAM-1 von einigen Gefäßen im exokrinen Pankreas von NOD-(Non Obese Diabetic)-Mäusen sowie von BALB/C- und SJL-Mäusen exprimiert wird. Wiederholt wurde eine Expression von MAdCAM-1 auf dem Endothel entzündeter Inseln des Pankreas der NOD-Maus induziert, und MAdCAM-1 war das Addressin, das von NOD-Inselepitel in frühen Phasen der Insulinitis hauptsächlich exprimiert wurde (Hanninen, A., et al., J. Clin. Invest., 92: 2509-2515 (1993)). Des Weiteren wurde eine Akkumulation von $\alpha 4\beta 7$ -exprimierenden Lymphozyten in den Inseln beobachtet, und MAdCAM-1 wurde mit der Bindung von Lymphomzellen über $\alpha 4\beta 7$ an Gefäße entzündeter Inseln in Verbindung gebracht (Hanninen, A., et al., J. Clin. Invest., 92: 2509-2515 (1993)).

[0072] Beispiele für entzündliche Erkrankungen in Verbindung mit Schleimhautgeweben, die nach dem vorliegenden Verfahren behandelt werden können, umfassen Mastitis (Brustdrüse), Cholezystitis, Cholangitis oder Pericholangitis (Gallengang und umliegendes Lebergewebe), chronische Bronchitis, chronische Sinusitis, Asthma und Graft-versus-Host-Krankheit (z. B. im Magendarmtrakt). Wie bei Morbus Crohn beobachtet wird, erstreckt sich die Entzündung häufig über die Schleimhautoberfläche hinaus, entsprechend können chronische entzündliche Erkrankungen der Lunge, die zu interstitieller Fibrose führen, wie beispielsweise Hypersensitivitätspneumonitis, Kollagenerkrankungen, Sarkoidose und andere idiopathische Konditionen für Behandlung zugänglich sein.

[0073] Das humanisierte Immunglobulin wird in einer wirksamen Menge verabreicht, welche die Bindung von $\alpha 4\beta 7$ -Integrin an einen seiner Liganden hemmt. Für die Therapie ist eine wirksame Menge ausreichend, um den gewünschten therapeutischen (einschließlich vorbeugenden) Effekt zu erreichen (wie beispielsweise eine Menge, die ausreichend ist, um die $\alpha 4\beta 7$ -Integrin-vermittelte Bindung und/oder Signalübertragung zu verringern oder zu verhindern, wodurch die Leukozytenadhäsion und Infiltration und/oder die damit verbundenen

zellulären Reaktionen gehemmt werden). Das humanisierte Immunglobulin kann in einer Einzeldosis oder in Mehrfachdosen verabreicht werden. Die Dosierung kann durch aus dem Stand der Technik bekannte Verfahren bestimmt werden und kann beispielsweise von dem Alter, der Empfindlichkeit, der Toleranz und dem allgemeinen Wohlbefinden des Individuums abhängen. Geeignete Dosierungen für Antikörper können etwa 0,1 mg/kg Körpergewicht bis etwa 10,0 mg/kg Körpergewicht je Behandlung sein.

[0074] Verfahrensgemäß kann das humanisierte Immunglobulin einem Individuum (z. B. einem Menschen) alleine oder in Verbindung mit einem anderen Mittel verabreicht werden. Ein humanisiertes Immunglobulin kann vor, zusammen mit und nach der Verabreichung des zusätzlichen Mittels verabreicht werden. In einer Ausführungsform wird mehr als ein humanisiertes Immunglobulin verabreicht, das die Bindung von $\alpha\beta 7$ -Integrin an seine Liganden hemmt. In einer anderen Ausführungsform wird zusätzlich zu einem humanisierten Immunglobulin der vorliegenden Erfindung ein monoklonaler Antikörper, wie beispielsweise ein Anti-MAdCAM-1-, Anti-VCAM-1- oder Anti-ICAM-1-Antikörper, verabreicht, der die Bindung von Leukozyten an einen endothelialen Liganden hemmt. In einer anderen Ausführungsform kann ein zusätzlicher pharmakologisch aktiver Inhaltsstoff (z. B. eine entzündungshemmende Verbindung wie beispielsweise Sulfasalazin, eine andere nicht-steroidale entzündungshemmende Verbindung oder eine steroidale entzündungshemmende Verbindung) in Verbindung mit einem humanisierten Immunglobulin der vorliegenden Erfindung verabreicht werden.

[0075] Es sind verschiedene Verabreichungswege möglich, einschließlich, aber nicht notwendigerweise beschränkt auf parenteral (z. B. intravenöse, intraarterielle, intramuskuläre, subkutane Injektion), oral (z. B. über die Ernährung), topisch, Inhalation (z. B. intrabronchiale, intranasale oder orale Inhalation, intranasale Tropfen) oder rektal, je nach der zu behandelnden Erkrankung oder Kondition. Parenterale Verabreichung ist eine bevorzugte Art der Verabreichung.

[0076] Die Formulierung variiert je nach dem ausgewählten Verabreichungsweg (z. B. Lösung, Emulsion). Eine geeignete Zusammensetzung, welche den zu verabreichenden humanisierten Antikörper umfasst, kann in einem physiologisch annehmbaren Vehikel oder Träger hergestellt werden. Für Lösungen oder Emulsionen umfassen geeignete Träger beispielsweise wässrige oder alkoholisch/wässrige Lösungen, Emulsionen oder Suspensionen, einschließlich Salzlösung und gepufferte Medien. Parenterale Vehikel können Natriumchloridlösung, Ringer-Dextrose, Dextrose und Natriumchlorid, Ringer-Laktat oder fixierte Öle umfassen. Intravenöse Vehikel können verschiedene Zusatzstoffe, Konservierungsmittel oder Flüssigkeits-, Nährstoff- oder Elektrolytergänzungsmittel umfassen (siehe allgemein Remington's Pharmaceutical Sciences, 17. Auflage, Mack Publishing Co., PA, 1985). Zur Inhalation kann die Verbindung solubilisiert und zur Verabreichung in eine geeignete Abgabevorrichtung geladen werden (z. B. einen Zerstäuber, einen Vernebler oder eine unter Druck gesetzte Aerosolabgabevorrichtung).

Erläuternde Beispiele

[0077] Die vorliegende Erfindung wird nun durch folgende Beispiele veranschaulicht, die in keiner Weise einschränkend sein sollen.

[0078] Wie in Beispiel 1 beschrieben, wurde ein muriner Act-1-Antikörper gereinigt, und es wurde eine Sequenzanalyse des Antikörpers durchgeführt. cDNAs, welche die variablen Regionen der leichten und schweren Kette des Maus-Act-1-Antikörpers kodieren, wurden PCR-kloniert und sequenziert. Die Aminosäuresequenz der variablen Region der leichten Kette kappa (V_L) von Act-1 wurde auch durch Proteinsequenzierung bestimmt und stimmte mit der von der DNA-Sequenz des V_L -Gens abgeleiteten Aminosäuresequenz genau überein. Die Aminosäuresequenz der variablen Region der schweren Kette (V_H) wurde überwiegend durch Proteinsequenz bestimmt, und diese Sequenz entsprach ebenfalls der aus der DNA-Sequenz des V_H -Gens abgeleiteten Aminosäuresequenz. Diese Ergebnisse zeigen, dass aus der Hybridomzelllinie die korrekten variablen Regionen des Maus-Act-1 kloniert wurden. Es wurden funktionelle chimäre Act-1-Antikörper hergestellt, die bestätigten, dass die korrekten Sequenzen kloniert wurden. Insbesondere wurden die DNAs, welche die variablen Regionen der leichten und schweren Kette von Maus-Act-1- kodierten, mit DNAs verbunden, die die konstanten Regionen der humanen leichten Kette kappa und der humanen schweren Kette gamma-1 oder gamma-4 kodierten. Der chimäre Antikörper wurde auch in einer Vergleichsanalyse mit einem humanisierten Act-1-mAb verwendet (umgeformter Act-1-mAb LDP-02).

[0079] Um einen humanisierten Act-1-Antikörper zu erzeugen, der gut an $\alpha\beta 7$ -Integrin bindet, wurden umgeformte humane variable Regionen entworfen (Beispiel 2). Zur Unterstützung des Entwurfsvorgangs wurde ein molekulares Modell der variablen Regionen von Maus-Act-1 erstellt. Die Regionen des murinen Act-1-Antikörpers, die direkt an der Antigenbindung beteiligt sind, die hypervariablen Regionen bzw. CDR, wurden in

ausgewählte humane variable Regionen eingebracht. Es wurden einige Aminosäureveränderungen an Positionen innerhalb der Gerüstregionen (GR) der humanen variablen Regionen vorgenommen. Die umgeformten variablen Regionen des humanen Act-1 enthielten eine einzige Aminosäureveränderung in der GR der ausgewählten variablen Region der humanen leichten Kette und fünf Aminosäureveränderungen in der GR der ausgewählten variablen Region der humanen schweren Kette, wobei jede den ursprünglichen humanen Rest durch den entsprechenden murinen Rest austauschte.

[0080] Wie in Beispiel 3 beschrieben, wurden DNA-Sequenzen konstruiert, welche diese umgeformten variablen Regionen von humanem Act-1 kodieren, und mit DNA-Sequenzen verbunden, welche humane konstante Regionen kodieren, und die resultierenden Nukleinsäuren wurden verwendet, um humanisiertes Act-1-Immunglobulin herzustellen. Humanisierter Act-1-Antikörper wurde in Säugerzellen exprimiert (Beispiel 3) und hinsichtlich der Bindung an humanes $\alpha 4\beta 7$ -Integrin im Vergleich mit Maus-Act-1-Antikörper getestet (Beispiel 4). Wie in Tabelle 5 gezeigt, behielt der humanisierte Act-1-Antikörper die Spezifität für das von dem murinen Act-1 erkannte Epitop bei und zeigte unerwartet verbesserte Bindungsaffinität im Vergleich zum nativen murinen Antikörper.

[0081] Während des Entwurfsprozesses wurden mehrere Varianten des humanisierten Act-1-Antikörpers identifiziert (Beispiel 2 und 5). Beispielsweise können zusätzliche Veränderungen an einer oder mehreren der folgenden Positionen vorgenommen werden: Mutation M4V der leichten Kette (Met $\rightarrow$ Val-Mutation an Position 4), Mutation R38K der schweren Kette (Arg $\rightarrow$ Lys-Mutation an Position 38), Mutation A40R der schweren Kette (Ala $\rightarrow$ Arg-Mutation an Position 40). Darüber hinaus eine Mutation I73T der schweren Kette (Ile $\rightarrow$ Thr-Rückmutation an Position 73), welche an Position 73 den humanen Threoninrest, der an dieser Position in der humanen Gerüstregion vorhanden ist, wiederherstellt. Es können eine oder mehrere dieser Veränderungen in einer einzelnen Kette eingeführt oder verschiedene Kombinationen dieser Veränderungen in mehr als einer Kette vorgenommen werden.

Beispiel 1 Klonieren der V_H - und V_L -Regionen von Act-1 und Konstruktion und Expression eines chimären Maus-Mensch-Act-1-Immunglobulins

Klonieren der V_H - und V_L -Regionen von Act-1

[0082] Aus Hybridomzellen, die monoklonalen Act-1-Antikörper produzieren, wurde mit TRIzol Reagent (Gibco/BRL) nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll RNA erhalten (Lazarovits, A.I. et al., J. Immunol., 133(4): 1857-1862 (1984); bereitgestellt von A.I. Lazarovits und R.B. Colvin)).

[0083] Transkribierte variable Regionen der schweren und leichten Ketten wurde durch Polymerasekettenreaktion (PCR) mit einem Ig-Prime-Kit (Novagen) nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll amplifiziert. In Kürze wurden 1,5 μ g Gesamt-RNA in einer Reaktion enthaltend 2,0 μ l 5X MMLV-Puffer (5X = 250 mM Tris-HCl, pH 8,3 bei 25°C, 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$), 1,0 μ l 100 mM DTT (Dithiothreitol), 0,5 μ l 10 mM dNTP-Gemisch (je 10 mM dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 0,5 μ l Oligo-dT (1 μ g/ μ l), 0,25 μ l acetyliertes BSA (4 mg/ml), 1,0 μ l des geeigneten Ig-3'-Primers (10 pmol/ μ l), 0,5 μ l MMLV Reverse Transkriptase (200 Einheiten/ μ l) und RNase-freies Wasser, zugegeben zu einem Gesamtvolumen von 10 μ l, revers zu cDNA transkribiert. Das Gemisch wurde 5 Minuten bei 37°C, 30 Minuten bei 42°C und 5 Minuten bei 99°C inkubiert. Jeder Ig-3'-Primer wurde in einer separaten Reaktion verwendet.

[0084] Variable Regionen wurden aus dem revers transkribierten Material nach dem Protokoll des Herstellers amplifiziert. In Kürze wurden 8 μ l revers transkribiertes Material mit 4 μ l 2,5 mM dNTPs, 5 μ l 10X-Reaktionspuffer (10X = 100 mM Tris-HCl, pH 8,8 bei 25°C, 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 1% Triton X-100), 2,5 μ l Ig-5'-Leaderprimer (10 pmol/ μ l) (jeder Ig-5'-Leaderprimer wurde in einer separaten PCR-Reaktion verwendet), 0,25 μ l (1,25 Einheiten) AmpliTaq® DNA-Polymerase (Perkin-Elmer) und Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 50 μ l gemischt.

[0085] Für die Amplifikation mit 5'-Primern MulgV_H5'-A, MulgV_H5'-B, MulgKV_L5'-A, und MulgKV_L5'-B waren die Zyklusparameter 35 Zyklen mit je 1 Minute, 94°C; 1 Minute, 50°C; 2 Minuten, 72°C, gefolgt von einer abschließenden Verlängerung (Extension) für 6 Minuten bei 72°C. Für alle anderen 5'-Primer wurden dieselben Reaktionsbedingungen verwendet, außer, dass die Anheftungstemperatur (Annealing-Temperatur) auf 60°C erhöht wurde.

[0086] Die variable Region der schweren Kette wurde erfolgreich amplifiziert, indem entweder MulgGV_H3'-2 oder MulgMV_H3'-1 als 3'-Primer und entweder MulgV_H5'-B oder MulgV_H5'-E als 5'-Primer verwendet wurden.

Die variable Region der leichten Kette wurde erfolgreich amplifiziert, indem MuIgxV_L3'-1 als 3'-Primer und MuIgxV_L5'-G als 5'-Primer verwendet wurden.

[0087] Die Sequenzen der Primer waren wie folgt:

MuIgGV_H3'-2 (SEQ ID NO:56) :

5'-CCC AAG CTT CCA GGG RCC ARK GGA TAR ACI GRT GG

MuIgMV_H3'-1 (SEQ ID NO:57) :

5'-CCC AAG CTT ACG AGG GGG AAG ACA TTT GGG AA

MuIgV_H5'-B (SEQ ID NO:58) :

5'-GGG AAT TCA TGR AAT GSA SCT GGG TYW TYC TCT T

MuIgV_H5'-E (SEQ ID NO:59) :

5'-ACT AGT CGA CAT GAA GWT GTG GBT RAA CTG GRT

MuIgκV_L3'-1 (SEQ ID NO:60) :

5'-CCC AAG CTT ACT GGA TGG TGG GAA GAT GGA

MuIgκV_L5'-G (SEQ ID NO:61) :

5'-ACT AGT CGA CAT GGA TTT WCA RGT GCA GAT TWT CAG CTT

[0088] Amplifizierte Fragmente wurden im Agarosegel gereinigt und in den Vektor pT7Blue T (Novagen) ligiert, der dem Ig-Prime-Kit beiliegt, und die Ligationsmischung wurde verwendet, um in dem Kit enthaltene kompetente NovaBlue-Zellen nach dem Protokoll des Herstellers zu transformieren.

[0089] Weiße Kolonien, die Insert der geeigneten Größe enthielten, wurden unter Verwendung des T7-Promotor-Primers und U-19mer-Primer sequenziert, die sich an gegenüber liegende Seiten des Inserts unmittelbar außerhalb der Polyklonierungsstelle des Vektors pT7Blue anheften. Die Sequenzierung wurde mit Mini-prep-DNR mit einem Sequenase-T7-DNA-Polymerase-Kit (USB/Amersham Life Science) nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll durchgeführt.

[0090] Die DNA-Konsensussequenz (SEQ ID NO: 1) aus mehreren unabhängigen Klonen der variablen Region der schweren Kette und die abgeleitete Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 2) sind in [Fig. 1](#) gezeigt. Degenerative Primers führten zu einer gewissen Sequenzdegenerierung. Das Initiationscodon ist das von Nukleotid 13-15 kodierte Met, die vorhergesagte Leader-Peptidase-Spaltungsstelle befindet sich zwischen dem von Nukleotid 67-69 kodierten Ser und dem von Nukleotid 70-72 kodierten Gln (wobei Nukleotid 13-69 das Leader-Peptid kodiert). Es ist ein Anteil der murine konstanten Region gezeigt, die mit einem von Rest 433-435 kodierten Alanin beginnt.

[0091] Die DNA-Sequenz (SEQ ID NO: 5) und die Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 6) mehrerer unabhängiger Klone der variablen Region der leichten Kette sind in [Fig. 3](#) gezeigt. Im Gegensatz zu der variablen Region der schweren Kette waren die amplifizierten Sequenzen nicht degeneriert, wahrscheinlich da die verwendeten Primer nicht sehr degeneriert waren, und die variable Region wurde von lediglich einem Primerpaar aus amplifiziert.

Konstruktion eines chimären Gens der schweren Kette

[0092] Es wurde ein Gen hergestellt, das eine Maus-Mensch-Chimäre einer schweren Kette kodiert. Der Ursprung der konstanten Region der humanen schweren Kette war ein Klon, der einen Wildtyp der humanen konstanten Region gamma eins (γ1) enthält (erhalten von Dr. Herman Waldmann (Universität Oxford); ein Konstrukt mit der Bezeichnung 3818, das eine Gen der schweren Kette des humanisierten Anti-CD18 umfasst, in einem pEE6-Expressionsvektor (Celltech)). Die konstante Region entspricht der des Gens der schweren Kette von humanisierten CD18, kloniert in pEE6.hCMV wie beschrieben in Sims, M.J. et al., J. Immunol., 151 (4):

2296-2308 (1993) und WO 93/02191, veröffentlicht am 4. Februar 1993, deren Lehren jeweils hierin in Gänze durch Bezugnahme enthalten sind. Die Sequenzen, welche die variable und konstante Region der schweren Kette (Wildtyp-Gamma-Eins) des humanisierten Anti-CD18-Antikörpers kodieren, wurden durch Verdau mit HindIII und EcoRI aus dem Expressionsvektor frei gesetzt. Das Fragment mit 1.421 bp, das das Gen für die schwere Kette enthält, wurde rückgewonnen und in die HindIII- und EcoRI-Schnittstellen von pCR-Script™ (Stratagene) subkloniert, um ein Plasmid mit der Bezeichnung pCR-CD18H zu erhalten. An der Verbindungsstelle zwischen der variablen Region und der konstanten Region in dem Gen der schweren Kette von Anti-CD18 befindet sich eine SpeI-Restriktionsschnittstelle. pCR-CD18H wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII und SpeI verdaut, um die variable Region der schweren Kette frei zu setzen. Diese variable Region wurde durch die variable Region von Maus-Act-1 ersetzt, die folgenderweise erzeugt wurde.

[0093] Es wurden zwei Primer synthetisiert, um neue Restriktionsstellen einzubauen. Diese Primer waren:

5'- primer (SEQ ID NO:41):

Hind III
5'- T[AA GCT T]CC GCC ATG GGA TGG AGC

3' -primer (SEQ ID NO:42):

Spe I
5'- GGT GAC [ACT AGT] GCC TTG ACC CCA G

[0094] Nukleotide in den Primern, die sich von der Vorlagensequenz unterscheiden, sind fett gedruckt. Als Vorlage wurde ein unabhängiger Klon der schweren Kette von Maus-Act-1 mit der Bezeichnung H2B#34 verwendet, wobei die Nukleotidsequenz (SEQ ID NO: 3) und die Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 4) in [Fig. 2](#) präsentiert sind, mit den 5'- und 3'-Primern oben verwendet, um eine variable Region der Maus zu amplifizieren und gleichzeitig 5' vom Initiationscodon eine HindIII-Schnittstelle und unmittelbar 3' der J-Region eine SpeI-Schnittstelle einzuführen. Das PCR-Fragment wurde direkt in pCR-Script™ subkloniert, woraus Plasmid pCR-mACT1HV entstand, und die korrekte Sequenz wurde bestätigt. Das Fragment wurde dann durch Verdau mit HindIII und SpeI aus pCR-mACT1HV freigesetzt und die die HindIII- und SpeI-Schnittstellen von pCR-CD18H anstelle der variablen Region von Anti-CD18 eingesetzt, um pCR-mhACT1Hchi zu erhalten. Das Gen für die chimäre schwere Kette (variable Region von Maus-Act-1 plus humane konstante Region gamma eins) wurde dann durch HindIII und EcoRI aus pCR-mhACT1Hchi geschnitten und zurück in den Vektor pEE6hCMV-B kloniert, der den hCMV-Promotor enthielt, um ein Konstrukt mit der Bezeichnung pEE6mhACT1Hchi zu erhalten.

Konstruktion eines Gens einer chimären leichten Kette

[0095] Ein Gen einer Maus-Mensch-Chimäre einer leichten Kette wurde auf ähnliche Weise wie die schwere Kette konstruiert. Im Fall der chimären leichten Kette wurde allerdings eine neue Restriktionsschnittstelle, KasI, durch PCR-Amplifikation eines Fragments der variablen Region gentechnisch in das Konstrukt kloniert, indem einer der Klone der variablen Region der leichten Kette von Act-1 der Maus mit der Bezeichnung KG#87 als Vorlage verwendet wurde, und durch PCR-Amplifikation der konstanten Region der leichten Kette kappa mithilfe eines Konstruktes als Vorlage, das ein Gen der leichten Kette des humanisierten Anti-CD18 enthält (erhalten von Dr. Herman Waldmann (Universität Oxford); das als 3819 bezeichnete Konstrukt enthält die leichte Kette eines humanisierten Anti-CD18 im Expressionsvektor pEE12). Die konstante Region entsprach der des Gens der leichten Kette des humanisierten CD18, kloniert in pEE12, wie beschrieben in Sims, M.J. et al., J. Immunol., 151 (4): 2296-2308 (1993) und WO 93/02191, veröffentlicht am 4. Februar 1993.

[0096] Die Primer für die variable Region waren:

5'-primer (SEQ ID NO:43):

HindIII
5'-T[AA GCT T]CC GCC ATG AAG TTG CCT

3'-primer (SEQ ID NO:44):

Kas I
5'- [GGC GCC] GCA TCA GCC CGT TTT

[0097] Nukleotide in dem Primer, die sich von denen in der Vorlage unterscheiden, sind fett gedruckt. Die beiden Nukleotidveränderungen in der Kodierungsregion, T → G an Position 423 und A → G an Position 426 in [Fig. 3](#), zur Erzeugung der KasI-Schnittstelle sind stumm und verändern die Aminosäuresequenz nicht.

[0098] Die Primer für die konstante Region kappa waren:

5'- primer (SEQ ID NO:45):

Kas I
5'-C[GG CGC C]AT CTG TCT TCA TC

3'-primer (SEQ ID NO:46):

HindIII
5'- [AAG CTT] CTA ACA CTC TCC

[0099] Die variable und konstante Region der leichten Kette wurden separat mit entsprechenden Vorlagen und Primern amplifiziert, und die PCR-Produkte wurden individuell in pCR-Script™ subkloniert, um die Sequenz zu bestätigen. Jedes Fragment wurde dann durch Verdau mit HindIII und KasI aus dem Vektor freigesetzt, im Gel gereinigt und dreifach in die HindIII-Schnittstelle des Expressionsvektors 3819 pEE12 ligiert, aus dem das Gen der leichten Kette des humanisierten Anti-CD18 durch HindIII-Verdau entfernt worden war. Das resultierende Konstrukt wird als pEE12mhACT1Lchi bezeichnet.

Expression eines chimären Immunoglobulins

[0100] Zur Konstruktion eines Expressionsvektors, der das Gen sowohl einer chimären schweren als auch einer chimären leichten Kette enthält, wurde das gesamte Gen der schweren Kette plus CMV-Promotor aus dem Expressionsvektor pEE6 (pEE6mhACT1Hchi) durch Verdau mit BglII und BamHI freigesetzt. Dieses Fragment wurde dann in die BamHI-Schnittstelle des Expressionsvektors pEE12 mit dem Gen der leichten Kette (pEE12mhACT1Lchi) ligiert, woraus ein einzelnes Plasmid mit der Bezeichnung pEE12mhLHchi entstand, welches sowohl das Gen der chimären leichten Kette als auch das Gen der chimären schweren Kette unter der Transkriptionskontrolle eines separaten CMV-Promotors enthält.

[0101] Die Expressionsvektoren pEE6hCMV-B und pEE12 und das Glutaminsynthetase-Genamplifikationssystem von Celltech wurden zuvor beschrieben (siehe z. B. WO 86/05807 (Celltech), WO 87/04462 (Celltech), WO 89/01036 (Celltech), EP 0 323 997 B1 (Celltech) und WO 89/10404 (Celltech)).

[0102] Für transiente Expression des chimären Antikörpers wurden 20 µg von pEE12mhLHchi durch Elektroporation wie folgt in COS-7-Zellen (American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852, USA) transfiziert. COS-7-Zellen in der Log-Wachstumsphase wurden durch Behandlung mit Trypsin-EDTA aus Gewebekulturflaschen geerntet. Die Zellen wurden einmal in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), einmal in Hank's Balanced Salts Solution (HBSS) gewaschen und in einer Konzentration von $1,5 \times 10^7$ Zellen je ml HBSS resuspendiert. $1,2 \times 10^7$ Zellen in 0,8 ml HBSS wurde mit 20 µg Plasmid-DNA gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA/Zell-Mischung wurde dann in eine 0,4-cm-Elektroporationsküvette überführt, und mit einem GenePulser von Bio-Rad wurde ein Strom von 250 V, 960 µF angelegt. Nach einer 10-minütigen Inkubation nach der Elektroporation bei Raumtemperatur wurden die Zellen in 20 ml Kulturmedium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) plus 10% FKS) überführt und in einer Gewebekulturflasche mit 162 cm² (Costar) kultiviert. Nach 5 Tagen wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und hinsichtlich der Fähigkeit getestet, das α4β7-Integrin exprimierende HuT 78-Zellen anzufärben. HuT 78-Zellen (eine humane T-Zelllymphomlinie) sind erhältlich von der American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, USA, Zugangs-Nr. ATCC TIB 161.

[0103] 100 µl Überstand der Kultur der transient transfizierten COS-7-Zellen, Überstand von scheintransfizierten COS-7-Zellen, gereinigter muriner Act-1-Antikörper (10 µg/ml) oder der entsprechende gereinigte irrelevante Kontrollantikörper gleichen Isotyps von Maus (Maus-IgG1, kappa (MOPC21), 10 µg/ml von Sigma) und Mensch (Human-IgG1, kappa, 10 µg/ml von Sigma) wurden mit 1×10^5 HuT 78-Zellen auf Eis für 30 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem Puffer gewaschen, der aus PBS mit 2% fetalem Kälberserum (FKS) und 0,01 Natriumazid bestand (FACS-Puffer). Anschließend wurden die Zellen auf Eis 30 Minuten mit dem entsprechenden fluoreszierenden sekundären Antikörper (entweder Fluorescein(FITC)-konjugiertes AffiniPure-F(ab')₂-Fragment von Ziege-Anti-Maus-IgG(H+L) (Jackson ImmunoResearch) oder Fluorescein(FITC)-konjugiertes AffiniPure-F(ab')₂-Fragment von Ziege-Anti-Human-IgG(H+L) (Jackson ImmunoResearch)) inkubiert. Nach 30 Minuten auf Eis wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, in 300 ml desselben Puffers resuspendiert und durchflusszytometrisch in einem FACScan von Becton Dickinson analysiert. [Fig. 4A](#) zeigt die Färbung des murinen Act-1-mAb im Vergleich zu einem irrelevanten Maus-Kontrollantikörper gleichen Isotyps, MOPC 21 (IgG1, kappa). [Fig. 4B](#) zeigt die Färbung des chimären Act-1-Antikörpers von HuT 78-Zellen im Vergleich zu einem irrelevanten Human-Kontrollantikörper gleichen Isotyps (IgG1, kappa) und dem Überstand scheintransfizierter COS-7-Zellen. Im Vergleich zu der Färbung, die von dem murinen

Act-1-Antikörper produziert wird, wurden die HuT 78-Zellen demnach von dem chimären Antikörper gleich angefärbt. Insgesamt zeigen diese Daten, dass die entsprechenden Sequenzen der variablen Regionen des Maus-Act-1 erfolgreich kloniert und exprimiert wurden.

Aminosäuresequenzanalyse

[0104] Die Aminosäuresequenzanalyse wurde mit gereinigten schweren und leichten Ketten des murinen Act-1 durchgeführt, um die Identitäten der cDNAs der aus dem Hybridom isolierten variablen Regionen der leichten und schweren Kette zu bestätigen. Für die leichte Kette wurde dies auf folgende Weise erreicht:

[0105] Muriner Act-1 (5 mg/ml) wurde mit 2 mM DTT für 2 Stunden bei 37°C in 0,3 M Natriumborat, 0,15 M Natriumchlorid unter Stickstoff reduziert. Die Lösung wurde anschließend in Iodacetamid auf eine Konzentration von 10 mM gebracht und 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. SDS-PAGE-Analyse unter nicht-denaturierenden Bedingungen bestätigte, dass die Proteine quantitativ reduziert wurden. Die Proteinlösung wurde dann ausführlich in PBS dialysiert, und ein Aliquot auf eine Superdex-75-Säule (16/60, Pharmacia) aufgetragen (Lauf 1). Die schwere und leichte Kette eluierten aus dieser Säule zusammen in einem Elutionsvolumen, das dem des Ausschlussvolumens entsprach, was darauf hindeutet, dass die beiden Ketten noch immer zusammenhielten. In 8 M Harnstoff wurde ein weiteres Aliquot hergestellt und unter denaturierenden Bedingungen auf einer Superdex-75-Säule filtriert (6M Harnstoff) (Lauf 2). Wiederum eluierten beide Ketten zusammen im Ausschlussvolumen, wahrscheinlich weil sie sich entfaltet hatten. SDS-PAGE-Analyse bestätigte das Vorhandensein beider Ketten in den beiden aus den 2 Gelfiltrationsläufen eluierten Proben. Diese Proben wurden mit folgendem Ergebnis einer Analyse der N-terminalen Sequenz unterzogen (Commonwealth Biotechnologies, Inc.):

Sample 2: DVVVTQTPLSLPVSF DGQV (SEQ ID NO: 47)

Sample 1: DVVVTQTPLSL (SEQ ID NO: 48)

[0106] Die erhaltene Sequenz entsprach dem N-Terminus der reifen leichten Kette, wie abgeleitet von der DNA-Sequenz. Dieser Versuch und andere Versuche, die Sequenz der schweren Kette zu erhalten, zeigten, dass deren N-Terminus wahrscheinlich blockiert war. Daher wurde mit der schweren Kette eine Aminosäuresequenzanalyse der internen Peptidfragmente durchgeführt.

[0107] Um die interne Aminosäuresequenzierung zu vereinfachen, wurden durch Spaltung mit Pepsin F(ab)'12-Fragmente des Antikörpers hergestellt. Muriner Act-1 wurde in einem Verhältnis von Antikörper:Pepsin von 1:200 2 Stunden lang bei 37°C in 0,1 M Natriumcitrat, pH 3,0 mit Pepsin gespalten. Wie mittels SDS-PAGE-Analyse überprüft wurde, lief die Reaktion bis zum Ende ab. Das Protein wurde anschließend über Protein-G- und Protein-A-Säulen gereinigt. Die Probe wurde anschließend reduziert und alkylert wie oben beschrieben, dann das Fragment der schweren Kette von der leichten Kette durch präparative SDS-PAGE (15%) getrennt. Das Fragment der schweren Kette wurde ausgeschnitten und in 1 ml 0,1% SDS mit Laufpuffer für 2 Stunden elektroeluiert. Diese Probe wurde 30 Minuten mit 2 ng Asp-N-Endoprotease gespalten und die Fragmente durch SDS-PAGE (17,5%) aufgetrennt. Die Produkte des Verdauens wurden über Nacht passiv in 0,1 M Hepes pH 8,0, 0,1% SDS eluiert und einer Analyse der N-terminalen Sequenz (Commonwealth Biotechnologies, Inc.) unterzogen.

[0108] Die von einem 17-kDa-Fragment erhaltene Sequenz war DY AIDYWG (SEQ ID NO: 49), die in dem Klon für die schwere Kette vorhanden war ([Fig. 1](#): die Sequenz AIDY entspricht dem Anfang der JH4-Region).

Beispiel 2 Molekulare Modellierung der variablen Regionen von Maus-Act-1

[0109] Zur Unterstützung des Entwurfs der mit neuen CDR versehenen (CDR-grafted) variablen Regionen wurde ein molekulares Modell der variablen Regionen des Maus-Act-1 hergestellt. Die Modellierung der Strukturen gut charakterisierter Proteinfamilien von Immunglobulinen erfolgte anhand etablierter Verfahren zur Modellierung nach Homologie. Das molekulare Modellieren wurde mit einer Silicon Graphics IRIS 4D Workstation auf einem UNIX-Betriebssystem, dem Paket QUANTA (Polygen Corp., Waltham, MA) zum molekularen Modellieren und der kristallographischen Brookhaven-Datenbank aufgeklärter Proteinstrukturen durchgeführt. Als erster Schritt wurden die Gerüstregionen (GF) der neuen variablen Regionen auf GF von ähnlichen, strukturell aufgeklärten variablen Regionen von Immunglobulinen modelliert. Während identische Aminosäureseitenketten in ihrer ursprünglichen Ausrichtung erhalten blieben, wurden mutierte Seitenketten anhand des Maximum-Overlap-Prozesses (Maximale Überlappung) substituiert, um Chi-Winkel wie im ursprünglichen Maus-Act-1-Antikörper beizubehalten. Die meisten CDR der neuen variablen Regionen wurden auf Basis der kanonischen Strukturen für CDR modelliert (Chothia, C., and A.M. Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Cho-

thia, C., et al., *Nature* 342:877-883 (1989); Tramontano, A., et al., *J. Mol. Biol.* 225:175-182 (1990); Chothia, C., et al., *J. Mol. Biol.* 227:799-817 (1992)). In Fällen, wie beispielsweise CDR3 der variablen Region der schweren Kette, in denen es keine bekannten kanonischen Strukturen gibt, wurde die CDR-Schleife auf Basis einer ähnlichen Schleifenstruktur modelliert, die in jedem strukturell aufgeklärten Protein vorhanden ist. Um schließlich ungünstige Atomerührungen aufzuheben und die Van-der-Waals-Wechselwirkungen und elektrostatischen Wechselwirkungen zu optimieren, wurde das Modell unter Anwendung des CHARMM-Potenzials (Brooks, B.R., *J. Comp. Chem.* 4:187-217 (1983)), wie implementiert in QUANTA, einer Energieminimierung unterzogen.

[0110] Für die variablen Regionen von Maus-Act-1 wurden die GR der variablen Regionen der leichten Kette auf den GR des Fab-Fragmentes des monoklonalen Mausantikörpers 4-4-20 (Herron, J.N., et al., *Proteins. Structure, Function und Genetics* 5:271-280 (1989)) modelliert. Die GR der variablen Region der schweren Kette wurde auf den GR des Fab-Fragmentes des monoklonalen Mausantikörpers D11.15 (Chitarra, V., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 90:7711-7715 (1993)) modelliert. Aminosäureseitenketten, die sich zwischen dem Maus-Act-1-Antikörper und den variablen Regionen, auf denen das Modell beruhte, unterschieden, wurden substituiert. Die leichte Kette des Fab-4-4-20-Antikörpers wurde über die leichte Kette von D11.15 gelegt, indem Rest 35-39, 43-47, 84-88 und 98-102 im Raum ausgerichtet wurden (wie definiert von Kabat, E.A., et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fünfte Auflage, U.S. Department of Health und Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)), um die beiden heterologen variablen Regionen (d. h. die 4-4-20-basierte variable Region der leichten Kette kappa und die D11.15-basierte variable Region der schweren Kette) in Bezug zueinander in die richtige Ausrichtung zu bringen.

[0111] CDR1 (L1) der variablen Region der leichten Kette von mAb Act-1 passte in die kanonische Untergruppe 4 von L1, wie vorgeschlagen von Chothia, C., et al., *Nature* 342:877-883 (1989). Die L1-Schleife von Maus-Fab-4-4-20 (siehe oben) hatte eine identische Aminosäurelänge, eine ähnliche Aminosäuresequenz und entsprach außerdem der kanonischen Untergruppe 4. Deshalb wurde die L1-Schleife auf der L1-Schleife von Fab-4-4-20 modelliert. Gleichermaßen entsprachen CDR2 (L2) und CDR3 (L3) der variablen Region der leichten Kette des mAb Act-1 den Schleifenstrukturen ihrer jeweiligen kanonischen Untergruppe 1 und den entsprechenden CDR von Fab-4-4-20. Entsprechend wurden die L2- und L3-Schleifen der variablen Region der leichten Kette kappa von Act-1 auf den CDR-L2 und -L3 von Fab-4-4-20 modelliert.

[0112] CDR1 (H1) der variablen Region der schweren Kette von mAb Act-1 passte in die kanonische Untergruppe 1 von H1, definiert von Chothia, C., et al., *Nature* 342:877-883 (1989), wie auch die entsprechende H1-Schleife des Maus-mAb D11.15 (siehe oben). Darüber hatte die CDR1-Schleife des mAb D11.15 eine identische Länge und eine ähnliche Aminosäuresequenz wie H1 des mAb Act-1. Wie bei der leichten Kette wurde daher diese Schleife auf die CDR1-Schleife der variablen Region der schweren Kette modelliert, auf der das Modell basierte. CDR2 der variablen Region der schweren Kette (H2) war schwieriger zu definieren, schien aber der kanonischen Untergruppe 2 H2 zu entsprechen. Wiederum passte die H2-Schleife des Antikörpers D11.15 in dieselbe kanonische Untergruppe und hatte eine sehr ähnliche Aminosäuresequenz, und deshalb wurde die H2-Schleife des mAb Act-1 auf der H2-Schleife von D11.15 modelliert.

[0113] Wie oben erörtert, sind die CDR3 variabler Regionen schwerer Ketten hoch variabel und lassen sich nicht in identifizierbare strukturelle Gruppen unterteilen. Zum Modellieren von H3-Schleifen werden Schleifen identischer Länge und ähnlicher Aminosäuresequenz – vorzugsweise von einem anderen Antikörper – identifiziert und als Basis für die modellierte Schleife verwendet. Es gab drei Schleifen, jeweils H3-Schleifen von drei Antikörpern, die hinsichtlich der Schleifengröße der Act-1-CDR3 entsprachen. Nach Testung aller drei Schleifenstrukturen am Modell hinsichtlich sterischer Behinderungen wurde die H3-Schleife des humanen Antikörpers Pot (Fan, Z.C., et al., *J. Mol. Biol.* 228:188-207 (1992)) ausgewählt, um die H3-Schleife des mAb Act-1 zu modellieren. Nach Anpassung des gesamten Modells in Bezug auf offensichtliche sterische Behinderungen wurde es einer Energieminimierung unterzogen, wie in QUANTA implementiert.

Entwurf der mit neuen CDR versehenen (CDR-grafted) variablen Regionen

[0114] Der erste Schritt beim Entwerfen von variablen Regionen mit neuen CDR (CDR-grafted variable Regionen) ist die Auswahl der variablen Regionen der humanen leichten und schweren Kette, die als Basis für die humanisierten variablen Regionen dienen werden. Es wurden zwei Ansätze zur Auswahl der humanen variablen Regionen getestet und verglichen. In einem Ansatz wurden die humanen variablen Regionen aus den Konsensussequenzen der verschiedenen Untergruppen humaner variabler Regionen ausgewählt (Kabat, E.A., et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fünfte Auflage, U.S. Department of Health und Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)). Die variablen Regionen der leichten und schweren

Ketten von Nagern wurden mit den humanen Konsensussequenzen verglichen, und aus den sechs Untergruppen der variablen Regionen der humanen leichten Kette lambda, den vier Untergruppen der variablen Regionen der humanen leichten Kette kappa und den drei Untergruppen der variablen Regionen der humanen schweren Kette wurden die Konsensussequenzen der humanen leichten und schweren Kette mit der größten Ähnlichkeit ausgewählt (siehe Kettleborough, C.A., Protein Engineering 4:773-783 (1991)). In einem anderen Ansatz wurden die humanen variablen Regionen aus allen veröffentlichten Sequenzen für humane variable Regionen ausgewählt (Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fünfte Auflage, U.S. Department of Health und Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)). Die Aminosäuresequenzen der variablen Regionen der leichten und schweren Ketten von Nagern wurden mit humanen Sequenzen verglichen, und es wurden humane variable Regionen mit einem hohen Maß an Ähnlichkeit zu den variablen Nager-Regionen ausgewählt. Es können variable Regionen der humanen leichten und schweren Kette vom selben humanen Antikörper verwendet werden um sicherzustellen, dass sich die beiden variablen Regionen richtig zusammensetzen (Queen, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 86:10029-10033 (1989)). Wie hierin beschrieben waren die als Vorlage ausgewählten variablen Regionen der humanen leichten und schweren Kette von zwei verschiedenen humanen Antikörpern abgeleitet. Auf diese Weise war es möglich, humane variable Regionen auszuwählen, die ein höheres Maß an Ähnlichkeit mit den variablen Nager-Regionen aufwiesen. Es gibt viele erfolgreiche Beispiele von mit neuen CDR versehenen (CDR-grafted) Antikörpern auf der Basis variabler Regionen, die aus zwei verschiedenen humanen Antikörpern abgeleitet wurden. Eines der am besten untersuchten Beispiele ist der umgeformte humane Antikörper CAMPATH-1 (Riechmann, L., et al., Nature 332:323-327 (1988)).

[0115] Zum Entwerfen umgeformter variabler Regionen des humanen ACT-1 wurde die variablen Regionen von Maus-ACT-1 mit den Konsensussequenzen aller Untergruppen variabler Regionen von Maus und Mensch verglichen (Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fünfte Auflage, U.S. Department of Health und Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)). Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und 2 zusammengefasst.

[0116] Die variable Region der leichten Kette von Maus-Act-1 war mit einer Gesamtidentität von 83,9% und einer Identität nur innerhalb der GR von 87,5 der Konsensussequenz der Untergruppe II der leichten Kette kappa der Maus am ähnlichsten (Tabelle 1). Was die humanen Antikörpersequenzen anbelangte, war die variable Region der leichten Kette von Maus-Act-1 mit einer Gesamtidentität von 72,3% und einer Identität nur innerhalb der GR von 78,8% der Konsensussequenz der Untergruppe II der humanen leichten Kette kappa am ähnlichsten (Tabelle 1).

[0117] Tabelle 1. Vergleich der variablen Region der leichten Kette kappa von Maus-Act-1 mit den Konsensussequenzen der Untergruppen der variablen Regionen der leichten Kette kappa von Maus und Mensch. Die Aminosäuresequenz der variablen Regionen der leichten Kette von Maus-Act-1 mit den und ohne die Sequenzen der CDR wurde mit den Konsensussequenzen der verschiedenen Untergruppen der variablen Regionen der leichten Kette kappa von Maus und Mensch mit den und ohne die Sequenzen der CDR verglichen. Es sind die prozentuale Ähnlichkeit und Identität mit den ähnlichsten Maus- und Mensch-Untergruppen aufgeführt.

Variable Region von Maus oder Mensch	Untergruppe nach Kabat	Komplette Variable Region oder nur GR	Prozentuale Ähnlichkeit	Prozentuale Identität
Maus	II	Komplett	91,07	83,93
		Nur GR	95,00	87,50
Mensch	II	Komplett	83,93	72,32
		Nur GR	90,00	78,75

[0118] Die variable Region der schweren Kette von Maus-Act-1 war mit einer Gesamtidentität von 83,5% und einer Identität nur innerhalb der GR von 94,3% der Konsensussequenz der Untergruppe IIB der schweren Kette der Maus am ähnlichsten (Tabelle 2). Was die humanen Antikörpersequenzen anbelangte, war die variable

Region der schweren Kette von Maus-Act-1 mit einer Gesamtidentität von 68,6 und einer Identität nur innerhalb der GR von 75,9% der Konsensussequenz der Untergruppe I der humanen schweren Kette am ähnlichsten (Tabelle 2). Die Ergebnisse bestätigen, dass die variablen Regionen von Maus-Act-1 für variable Maus-Regionen typisch zu sein scheinen. Die Ergebnisse deuten auch auf Untergruppen humaner variabler Regionen, die als gute Quellen für Vorlagen humaner variabler Regionen oder als Empfänger für CDR-Grafting dienen könnten.

[0119] Tabelle 2. Vergleich der variablen Region der schweren Kette von Maus-Act-1 mit den Konsensussequenzen der Untergruppen der variablen Regionen der schweren Kette von Maus und Mensch. Die Aminosäuresequenz der variablen Regionen der schweren Kette von Maus-Act-1 mit den und ohne die Sequenzen der CDR wurde mit den Konsensussequenzen der verschiedenen Untergruppen der variablen Regionen der schweren Kette von Maus und Mensch mit den und ohne die Sequenzen der CDR verglichen. Es sind die prozentuale Ähnlichkeit und Identität mit den ähnlichsten Maus- und Mensch-Untergruppen aufgeführt.

Variable Region von Maus oder Mensch	Untergruppe nach Kabat	Komplette Variable Region oder nur GR	Prozentuale Ähnlichkeit	Prozentuale Identität
Maus	IIB	Komplett	89,26	83,47
		Nur GR	95,40	94,25
Mensch	I	Komplett	81,82	68,60
		Nur GR	85,06	75,86

[0120] Die variablen Regionen von Maus-Act-1 wurden auch mit den individuellen Sequenzen aller aufgezählten Beispiele der variablen Regionen von Maus und Mensch verglichen (Kabat, B.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fünfte Auflage, U.S. Department of Health und Human Services, U.S. Government Printing Office (1991); UW GCG Package (Universität Wisconsin)). Was die humanen Antikörpersequenzen anging, war die variable Region der leichten Kette von Maus-Act-1 sehr ähnlich wie die Sequenz für die variable Region der humanen leichten Kette kappa des humanen Antikörpers GM607'CL (Klobeck, H.-G., et al., Nature 309:73-76 (1984)). [Fig. 5](#) zeigt eine Ausrichtung (Alignment) der Aminosäuresequenzen der variablen Region der leichten Kette von Maus-Act-1 (SEQ ID NO: 7) und der variablen Region der leichten Kette des humanen GM607'CL (SEQ ID NO: 8). Erwartungsgemäß gehört die variable Region der leichten Kette des humanen GM607'CL zu Untergruppe II der variablen Regionen der humanen leichten Kette kappa. Die Gesamtsequenzidentität zwischen den variablen Regionen der leichten Kette von Maus-Act-1 und dem humanen GM607'CL wurde auf 71,4 berechnet. Die variable Region der schweren Kette von Maus-Act-1 war sehr ähnlich wie die Sequenz der variablen Region der humanen schweren Kette des humanen Antikörpers 21/28'CL (Dersimonian, H., et al., J. Immunol. 139:2496-2501 (1987)). [Fig. 6](#) zeigt eine Ausrichtung (Alignment) der Aminosäuresequenzen der variablen Region der schweren Kette von Maus-Act-1 (SEQ ID NO: 9) und der variablen Region der schweren Kette des humanen 21/28'CL (SEQ ID NO: 10). Erwartungsgemäß gehört die variable Region der schweren Kette des humanen 21/28'CL zu Untergruppe I der variablen Regionen humaner schwerer Ketten. Die Gesamtsequenzidentität zwischen den variablen Regionen der schweren Kette von Maus-Act-1 und dem humanen 21/28'CL wurde auf 68,1% berechnet. Auf der Basis dieser Vergleiche wurde die variable Region der leichten Kette des humanen GM607'CL als humane Vorlage für den Entwurf einer umgeformten variablen Region der leichten Kette des humanen Act-1, und die variable Region der schweren Kette des humanen 21/28'CL wurde als humane Vorlage für den Entwurf der umgeformten variablen Region der schweren Kette des humanen Act-1 ausgewählt.

[0121] Der zweite Schritt im Entwurfsprozess war es, die Nager-CDR in die ausgewählten variablen Regionen der humanen leichten und schweren Kette einzufügen. Die gesamten Nager-CDR, wie definiert von Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fünfte Auflage, U.S. Department of Health und Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)), wurden mit den humanen GR verknüpft, um ein einfaches CDR-Graft zu erzeugen. In manchen Fällen zeigt ein Nager-Antikörper, der in einem einfachen CDR-Graft humanisiert ist, geringe oder keine Bindung an Antigen. Es ist wichtig, die Aminosäuresequenzen

der humanen GR zu untersuchen um festzustellen, ob einer dieser Aminosäurereste die Bindung an Antigen negativ beeinflussen könnte, entweder direkt durch Wechselwirkungen mit Antigen oder indirekt durch Änderungen der Positionierung der CDR-Schleifen.

[0122] Im dritten Schritt wurden Entscheidungen darüber getroffen, welche Aminosäurereste in den humanen GR verändert werden sollten, um eine gute Bindung an Antigen zu erreichen. In diesem Stadium dient das Modell der variablen Nager-Regionen dem Entwurfsprozess am meisten. Nützlich sind auch die kanonischen Strukturen für die CDR, wie definiert von Chothia, C., et al., *Nature* 342:877-883 (1989). Es ist wichtig, alle Nager-Aminosäurereste in den humanisierten variablen Regionen zu konservieren, die Teil der kanonischen Strukturen sind. Es ist hilfreich, die Sequenz des zu humanisierenden Nager-Antikörpers mit ähnlichen Sequenzen von anderen Nager-Antikörpern zu vergleichen um zu bestimmen, ob die Aminosäuren an bestimmten Positionen ungewöhnlich oder selten sind. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Nager-Aminosäure an dieser Position eine wichtige Rolle bei der Antigenbindung besitzt. Indem das Modell der variablen Nager-Regionen studiert wird, kann man vorhersagen, ob Aminosäuren an bestimmten Positionen die Antigenbindung beeinflussen könnten oder nicht. Wenn humane variable Regionen von einzelnen humanen Antikörpern als Basis für den Entwurf verwendet werden, empfiehlt es sich, die einzelne humane Sequenz mit der Konsensussequenz für diese Untergruppe humaner variabler Regionen zu vergleichen. Alle Aminosäuren, die besonders ungewöhnlich sind, sollten vermerkt werden. In den meisten Fällen werden einige Aminosäuren in der humanen GR identifiziert, die von der Aminosäure, die an dieser Position in der humanen variablen Position vorhanden ist, zu der Aminosäure geändert werden sollte, die an dieser Position in der variablen Position bei Nagern vorhanden ist.

[0123] Tabelle 3 und 4 fassen zusammen, wie die umgeformten variablen Regionen des humanen Act-1 entworfen wurden. Tabelle 3 ist eine Ausrichtung (Alignment) von Aminosäuresequenzen, die beim Entwurf umgeformter V_L -Regionen des humanen mAb Act-1 verwendet wurden, und listet die Aminosäuresequenz der zu humanisierenden variablen Region der leichten Kette von Maus-Act-1 (SEQ ID NO: 7) in Spalte 4, die Konsensussequenz für die Untergruppe der variablen Maus-Regionen, zu der die variable Region des Maus-Act-1 gehört (SEQ ID NO: 50), in Spalte 5 (Maus-k-II), die Konsensussequenz für die Untergruppe humaner variabler Regionen, mit denen die variable Region des Maus-Act-1 am meisten Ähnlichkeit aufweist (SEQ ID NO: 51), in Spalte 6 (Human-k-II), die Aminosäuresequenz der humanen variablen Region, die als Vorlage dient (d. h. GM607'CL) (SEQ ID NO: 8), in Spalte 7 und die Aminosäuresequenz der umgeformten variablen Region des humanen Act-1 (SEQ ID NO: 52), wie entworfen, in Spalte 8 (Act-1 RHV_H) auf. Tabelle 4 ist eine Ausrichtung (Alignment) von Aminosäuresequenzen, die beim Entwurf umgeformter V_H -Regionen des humanen mAb Act-1 verwendet wurden, und listet die Aminosäuresequenz der zu humanisierenden variablen Region der schweren Kette von Maus-Act-1 (SEQ ID NO: 9) in Spalte 4, die Konsensussequenz für die Untergruppe der variablen Maus-Regionen, zu der die variable Region des Maus-Act-1 gehört (SEQ ID NO: 53), in Spalte 5 (Maus-IIB), die Konsensussequenz für die Untergruppe humaner variabler Regionen, mit denen Maus-Act-1 am meisten Ähnlichkeit aufweist (SEQ ID NO: 54), in Spalte 6 (Human-I), die Aminosäuresequenz der humanen variablen Region, die als Vorlage dient (d. h. 21/28'CL) (SEQ ID NO: 10) in Spalte 7 und die Aminosäuresequenz der umgeformten variablen Region von Act-1 (SEQ ID NO: 55), wie entworfen, in Spalte 8 (Act-1 RHV_H) auf. Die vorletzte Spalte in Tabelle 3 und 4 zeigt die Position (Oberfläche oder vergraben) von Resten in den GR an, die sich zwischen dem Maus-Act-1 und den ausgewählten humanen GR unterscheiden. Die letzte Spalte in Tabelle 3 und 4 listet Anmerkungen auf, die für diese Position in der variablen Region relevant sind.

[0124] In Tabelle 3 werden folgende Symbole verwendet:

(*) invariable Reste, wie definiert entweder durch die Konsensussequenzen nach Kabat, d. h. mit einem Auftreten von 95% oder mehr innerhalb der Kabat-Untergruppe (Kabat, E.A., et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fünfte Auflage, U.S. Department of Health und Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)) (im Fall von Spalte 5 und 6), oder als Teil der kanonischen Struktur für die CDR-Schleifen (im Fall von Spalte 5 und 6) oder als Teil der kanonischen Struktur für die CDR-Schleifen (im Fall von Spalte 8), wie definiert von Chothia, C., et al., *Nature* 342:877-883 (1989) (FETT GEDRUCKTE) Positionen in GR und CDR, an denen der humane Aminosäurerest durch den entsprechenden Mausrest ersetzt wurde; (UNTERSTRICHENE) Positionen in GR; an denen sich der humane Rest von der Nummer des analogen Mausrestes unterscheidet; (Δ) Nummerierung von Änderungen in den humanen GR; (Maus-Ab Act-1) Aminosäuresequenz der V_L -Region des Maus-Act-1-Antikörpers; (Maus-k-II) Konsensussequenz von V_L -kappa-Regionen der Maus aus Untergruppe II (Kabat, E.A., et al., supra); (Human-k-II) Konsensussequenz von humanen V_L -Regionen aus Untergruppe II (Kabat, E.A., et al., supra) (GM607'CL) Aminosäuresequenz des humanen GM607'CL-Antikörpers (Klobeck, H.-G., et al., *Nature* 309:73-76 (1984)); (Oberfläche oder vergraben) Position einer Aminosäure im Verhältnis zum Rest der Reste in beiden Ketten der variablen Antikörperregionen; (Act-1 RH V_K) Aminosäuresequenz der umgeformten V_L -Region des humanen mAb Act-1.

Tabelle 3. Ausrichtung (Alignment) von Aminosäuresequenzen, die beim Entwurf von umgeformten V_L -Regionen des humanen mAb Act-1 verwendet wurden

<i>Kabat</i>	#	<i>GR</i> <i>CDR</i>	<i>GR</i> od. <i>Maus</i> <i>Act-1</i>	Maus-K-II	Human-K-II	<i>GM 607</i> CL	Act-1 od. UH V_k	Oberfläche oder vergraben	Anmerkung
1	1	GR1	D	D*	D*	D	D		
2	2		V	V	I*	I	V	Vergraben	Kanonische AA für L1- Schleife ($\Delta 1$).
3	3		V	V	V*	V	V		

4	4	I	V	M	M	M	M	M	M	Vergraben	Vergraben zwischen L1 und L2. V=9/245, M=202/245 in Maus-K-II, M=42/45, V nicht zu sehen in Human-K-II. Bei schlechter Bindung, kann in Betracht gezogen werden, die in der zweiten Version zu Valin zu ändern.
5	5	I	T	T*	T*	T*	T	T	T		
6	6	I	Q	Q*	Q*	Q*	Q	Q	Q		

7	7	I	T	T	S	S	S	<u>S</u>	Oberfläche	Distal zur Bindungsstelle (BS). T=164/454 in Maus-K-II. T=10/37, S=27/37 in Human-K-II
8	8	I	P	P	P*	P	P	P		
9	9	I	L	L	L*	L	L	L		
10	10	I	S	S	S*	S	S	S		
11	11	I	L	L	L*	L	L	L		
12	12	I	P	P	P	P	P	P		
13	13	I	V	V*	V*	V	V	V		
14	14	I	S	S	T*	T	T	<u>T</u>	Oberfläche	Distal zur BS. S=151/248 in Maus-K-II. Nur T (30/30) in Human-K-II zu sehen.

15	15	I	F	L	P	P	P	Oberfläche	Distal zur BS. F=9/253 in Maus-K-II. F in Human-K-II nicht zu sehen. P=29/31 in Human-K-II.
16	16	I	G	G*	G	G	G		
17	17	I	D	D	E	E	E	Oberfläche	Distal zur BS. E=18/30, D in Human-K-II nicht zu sehen.
18	18	I	Q	Q	P*	P	P	Oberfläche	Distal zur BS un in einer Kehre (Turn). Nur P (31/31) zu sehen in Human-K-II.

19	19	I	V	A	A*	A	A	Vergraben	Zeigt auf Kern, aber Standard-Maus-zu-Human-Veränderung. V=66/253, A=187/253 in Maus-K-II. Nur A (30/30) zu sehen in Human-K-II.
20	20	I	S	S*	S*	S	S		
21	21	I	I	I*	I*	I	I		
22	22	I	S	S*	S*	S	S		
23	23	GR1	C	C*	C*	C	C		
24	24	CDR1	R	R	R	R	R		
25	25	I	S	S*	S*	S	S		Kanonische AA für L1-Schleife

26	26	I	S	S*	S*	S	S	S	Kanonische für Schleife	AA L1-
27	27	I	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Kanonische für Schleife	AA L1-
27A	28	I	S	S	S	S	S	S	Kanonische für Schleife	AA L1-
27B	29	I	L	L	L	L	L	L	Kanonische für Schleife	AA L1-
27C	30	I	A	V	L	L	L	A	Kanonische für Schleife	AA L1-
27D	31	I	K	H	H	H	H	K	Kanonische für Schleife	AA L1-
27E	32	I	S	S	S	S	S	S	Kanonische für Schleife	AA L1-

27F		I	-	-	X	-	-		
28	33	I	Y	N	D	N	Y		Kanonische AA für L1- Schleife
29	34	I	G	G*	G	G	G		Kanonische AA für L1- Schleife
30	35	I	N	N	N	Y	N		Kanonische AA für L1- Schleife
31	36	I	T	T*	N	N	T		Kanonische AA für L1- Schleife
32	37	I	Y	Y*	Y*	Y	Y		Kanonische AA für L1- Schleife
33	38	I	L	L*	L*	L	L		Kanonische SS für L1- Schleife

34	39	CDR1	S	E	N	D	S	AA für Packing. Ungewöhnlich (117/1365). Hier sind am häufigsten A, H und N zu sehen.
35	40	GR2	W	W*	W*	W	W	
36	41	I	Y	Y	Y	Y	Y	AA für Packing. Häufigste AA.
37	42	I	L	L*	L	L	L	

38	43	I	H	Q*	Q	Q	Q	Vergraben	Aa für Packung. H ist ungewöhnlich (31/1312). ! ist häufigste AA (1158/1312). H=6/225, Q=219/225 in Maus-K-II, Q=15/17, H in Human-K-II nicht zu sehen.
39	44	I	K	K	K	K	K		
40	45	I	P	P*	P	P	P		
41	46	I	G	G*	G*	G	G		
42	47	I	Q	Q*	Q	Q	Q		
43	48	I	S	S*	S	S	S		

44	49	I	P	P*	P*	P*	P	P	AA für Packing. Häufigste AA.
45	50	I	Q	K	Q	Q	Q		
46	51	I	L	L	L	L	L	L	AA für Packing. Häufigste AA.
47	52	I	L	L*	L	L	L	L	
48	53	I	I	I*	I*	I	I	I	Kanonische AA für L2- Schleife
49	54	GR2	Y	Y	Y*	Y*	Y	Y	
50	55	CDR2	G	K	L	L	G	G	Kanonische AA für L2- Schleife
51	56	I	I	V	V	V	G	I	Kanonische AA für L2- Schleife
52	57	I	S	S*	S*	S	S	S	Kanonische AA für L2- Schleife

53			I	N	N	N	N	N				
54			I	R	R	R*	R	R				
55			I	F	F	A	A	F				
56			CDR2	S	S*	S*	S	S				
57			GR3	G	G*	G*	G	G				
58			I	V	V*	V*	V	V				
59			I	P	P	P*	P	P				
60			I	D	D*	D	D	D				
61			I	R	R*	R	R	R				
62			I	F	F*	F*	F	F				
63			I	S	S	S*	S	S				
64			I	G	G*	G	G	G				Kanonische AA für L2- Schleife
65	70		I	S	S*	S*	S	S				
66	71		I	G	G*	G*	G	G				
67	72		I	S	S*	S	S	S				
68	73		I	G	G*	G	G	G				
69	74		I	T	T*	T*	T	T				
70	75		I	D	D	D	D	D				

71	76	I	F	F*	F*	F*	F	F	F	Kanonische AA für L1- Schleife
72	77	I	T	T*	T*	T*	T	T	T	
73	78	I	L	L*	L*	L*	L	L	L	
74	79	I	K	K	K	K	K	K	K	
75	80	I	I	I*	I*	I*	I	I	I	
76	81	I	S	S	S	S	S	S	S	
77	82	I	T	R*	R	R	R	R	R	Distal zur BS. T=6/221, R=211/221 in Maus-K-II. R=11/12, T in Human-K-II nicht zu sehen.

78	83	I	I	V	V*	V	V	<u>V</u>	Vergraben	Zeigt auf Kern, aber Standard-Maus-zu-Human-Veränderung. I=6/213, V=195/213 in Maus-K-II. Nur V (12/12) zu sehen in Human-K-II.
79	84	I	I	K	E	E	E	<u>E</u>	Oberfläche	Distal zur BS. K=20/215, E=191/2151 in Maus-K-II. E=9/12, K in Human-K-II nicht zu sehen.

80	85	I	P	A*	A	A	A	Oberfläche	Distal zur BS. P=6/183. A=175/183 in Maus-K-II. P=1/12, A=11/12 in Human-K-II.
81	86	I	E	E*	E	E	E		
82	87	I	D	D*	D	D	D		
83	88	I	L	L	V*	V	V	Halb vergraben	Distal zur BS. Nur V (12/12) zu sehen in Human-K-II.
84	89	I	G	G*	G*	G	G		
85	90	I	M	V	V*	V	V	Halb vergraben	Distal zur BS. M=6/212, V=196/212 in Maus-K-II. Nur V (12/12) zu sehen in Human-K-II.

86	91	I	Y	Y*	Y*	Y	Y	
87	92	I	Y	Y	Y*	Y	Y	AA für Packung. Häufigste AA.
88	93	GR3	C	C*	C*	C	C	
89	94	CDR3	L	F	M*	M	L	AA für Packung. L ist ungewöhnlich (93/1238). Q ist häufigste AA (654/1238).
90	95	I	Q	Q*	Q	Q	Q	Kanonische AA für L3- Schleife
91	96	I	G	G	A	A	G	Kanonische AA für L3- Schleife/AA für Packung. Dritthäufigste AA.

92	97	I	T	T	L	L	L	T	L	T	Kanonische für L3- Schleife	AA L3-
93	98	I	H	H		Q	Q		Q	H	Kanonische für L3- Schleife	AA L3-
94	99	I	Q	V		X	T		T	Q	Kanonische für L3- Schleife	AA L3-
95	100	I	P	P*		P	P		P	P	Kanonische für L3- Schleife	AA L3-
95A		I	-	P		R*				-		
95B		I	-	-		-				-		
95C		I	-	-		-				-		
95D		I	-	-		-				-		
95E		I	-	-		-				-		
95F		I	-	-		-				-		

96	101	I	Y	Y	Y	X	Q	Y		AA für Packung. Zweithäufigste AA.
97	102	CDR3	T	T*	T*	T*	T	T		Kanonische AA für L3- Schleife
98	103	GR4	F	F*	F*	F*	F	F		AA für Packung. Häufigste AA.
99	104	I	G	G*	G*	G*	G	G		
100	105	I	G	G	Q	Q	Q	Q	Halb vergraben	Distal zu BS. Q=12/13, G=1/12 in Human-K-II.
101	106	I	G	G*	G*	G*	G	G		
102	107	I	T	T*	T*	T*	T	T		
103	108	I	K	K*	K	K	K	K		
104	109	I	L	L*	V	V	V	V	Halb vergraben	Distal zu BS. L=5/14, V=9/14 in Human-K-II.

105	110	I	E	E*	E	E	E	E				
106	111	I	I	I	I*	I	I	I				
106A		I	-	-	-	-	-	-				
107	112	GR4	K	K*	K	K	K	K				

[0125] In Tabelle 4 werden folgende Symbole verwendet:

(*) invariable Reste, wie definiert entweder durch die Konsensussequenzen nach Kabat, d. h. mit einem Auftreten von 95% oder mehr innerhalb der Kabat-Untergruppe (Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fünfte Auflage, U.S. Department of Health und Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)) (im Fall von Spalte 5 und 6) oder als Teil der kanonischen Struktur für die CDR-Schleifen (im Fall von Spalte 8), wie definiert von Chothia, C., et al., Nature 342:877-883 (1989); (FETT GEDRÜCKTE) Positionen in GR und CDR, an denen der humane Aminosäurerest durch den entsprechenden Mausrest ersetzt wurde; (UNTERSTRICHENE) Positionen in GR; an denen sich der humane Rest von der Nummer des analogen Mausrestes unterscheidet; (Δ) Nummerierung von Änderungen in den humanen GR; (Maus-Ab Act-1) Aminosäuresequenz der V_H-Region des Maus-Act-1-Antikörpers; (Maus-IIB) Konsensussequenz von V_H-Regionen der Maus aus Untergruppe IIB (Kabat, E.A., et al., supra); (Humaner 21/28'CL) Aminosäuresequenz des humanen 21/28'CL-Antikörpers (Dersimonian, H., et al., J. Immunol. 139:2496-2501 (1987)); (Oberfläche oder vergraben) Position einer Aminosäure im Verhältnis zum Rest der Reste in beiden Ketten der variablen Antikörperregionen; (Act-1 RH V_H) Aminosäuresequenz der umgeformten V_H-Region des humanen mAb Act-1.

Tabelle 4. Ausrichtung (Alignment) von Aminosäuresequenzen, die beim Entwurf von umgeformten V_H -Regionen des humanen mAb Act-1 verwendet wurden

Kabat	#	GR oder CDR	Maus-Act-1	Maus-IIB	Human I	Menschlicher Spender 21/28CL	Act-1 UH V_H	Oberfläche oder vergraben	Anmerkung
1	1	GR1	Q	Q	Q	Q	Q		
2	2	I	V	V*	V	V	V		
3	3	I	Q	Q*	Q*	Q	Q		
4	4	I	L	L*	L*	L	L		
5	5	I	Q	Q	V	V	V	Oberfläche	Distal zur Bindungsstelle (BS). Q=135/143 in Maus-IIB. V=49/53, Q=1/53 in Human-I.
6	6	I	Q	Q	Q	Q	Q		

7	7	I	P	P	P	S*	S	<u>S</u>	Halb vergraben	Distal zu BS. P=102/150 in MAus-IIB. P in Human-I nicht zu sehen.
8	8	I	G	G*	G*	G	G	G		
9	9	I	A	A	A	A	A	A		
10	10	I	E	E	E	E	E	E		
11	11	I	L	L*	V	V	V	<u>V</u>	Oberfläche	Distal zu BS. V=50/54, L=4/54 in Human-I.
12	12	I	V	V*	K	K	K	<u>K</u>	Vergraben	Zeigt auf Kern, aber Standard- Maus-zu-Human- Veränderung. K=41/55, V=3/55 in Human-I.
13	13	I	K	K	K*	K	K	K		
14	14	I	P	P*	P*	P	P	P		
15	15	I	G	G*	G*	G	G	G		

16	16	I	T	A	A	A	A	A	Oberfläche	Distal zu BS. T=12/139, A=117/139 in Maus-IIB. T=1/52, A=23/52 in Human-I.
17	17	I	S	S*	S	S	S	S		
18	18	I	V	V*	V	V	V	V		
19	19	I	K	K	K	K	K	K		
20	20	I	L	L	V	V	V	V	Vergraben	Zeigt auf Kern, aber Standard- Maus-zu-Human- Veränderung. L=138/179 in Maus-IIB, V=36/52, L=1/52 in Human-I.
21	21	I	S	S*	S	S	S	S		
22	22	I	C	C*	C	C	C	C		
23	23	I	K	K*	K	K	K	K		

24	24	I	G	A*	A	A	G	Vergraben	Kanonische AA für H1-Schleife (Δ1). G in Maus-IIB nicht zu sehen. G=12/51, A=34/51 in Human-I.
25	25	I	Y	S*	S*	S	S	Oberfläche	Zeigt von der BS weg, und scheint Antigen (Ag) nicht zu binden. Y=1/185 in Maus-IIB. S=48/50, Y in Human-I nicht zu sehen.
26	26	I	G	G*	G*	G	G		Kanonische AA für H1- Schleife.

27	27	I	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Q		Kanonische für Schleife.	AA H1-
28	28	I	T	T	T	T	T	T	T	T		Kanonische für Schleife.	AA H1-
29	29	I	F	F*	F*	F*	F*	F*	F*	F		Kanonische für Schleife.	AA H1-
30	30	GR1	T	T	T	T	T	T	T	T		Kanonische für Schleife.	AA H1-
31	31	CDR1	S	S	S	S	S	S	S	S		Kanonische für Schleife.	AA H1-
32	32	I	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Kanonische für Schleife.	AA H1-
33	33	I	W	W	W	W	W	W	W	W			

34	34	I	M	M	I	M	M	M	M	M	Kanonische für H1- Schleife.	AA
35	35	I	H	H	S	H	H	H	H	H	AA für Packung. Häufigste AA.	
35A		I	-	-	-	-	-	-	-	-		
35B		CDR1	-	-	-	-	-	-	-	-		
36	36	GR2	W	W*	W*	W	W	W	W	W		
37	37	I	V	V	V	V	V	V	V	V	AA für Packung. Häufigste AA.	

38	38	I	K	K	R*	R	<u>R</u>	Vergraben	Zeigt auf Kern, aber Standard- Maus-zu-Human- Veränderung. K=177/188 in Maus-IIB, R=48/49, K in Human-I nicht zu sehen. Allerdings könnte Lys die H2-Schleife packen, daher könnte diese in der zweiten Version in Verbindung mit A40R verändert werden, falls Bindung schlecht ist.
----	----	---	---	---	----	---	----------	-----------	--

39	39	I	Q	Q	Q*	Q	Q	Q	AA für Packung. Häufigste AA.
----	----	---	---	---	----	---	---	---	----------------------------------

40	40	I	R	R	A	A	A	<u>A</u>	Vergraben	Zeigt auf Kern, aber Standard- Maus-zu-Human- Veränderung. R=160/177 in Maus-IIB, A=37/49, R=0/49 in Human-I. Allerdings könnte Arg die H2-Schleife packen, daher könnte diese in der zweiten Version in Verbindung mit A38K verändert werden, falls Bindung schlecht ist.
41	41	I	P	P	P	P	P	P		

42	42	I	G	G	G	G	G	G	G	
43	43	I	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
44	44	I	G	G	G	G	R	R	Vergraben	Zeigt auf Kern, aber Standard-Maus-zu-Human-Veränderung. G=43/48, R=5/48 in Human-I.
45	45	I	L	L	L*	L	L	L		Aa zur Packung. Häufigste AA.
46	46	I	E	E*	E*	E	E	E		
47	47	I	W	W*	W*	W	W	W		Aa zur Packung. Häufigste AA.
48	48	I	I	I*	M	M	I	I	Vergraben	Ile unter der H2-Schleife und stützt die H2-Schleife ($\Delta 2$). Met=41/48, Ile=1/48 in Human-I.
49	49	GR2	G	G*	G	G	G	G		

50	50	CDR2	E	R	W	W	E	
51	51	I	I	I	I	I	I	
52	52	I	D	D	N	N	D	
52A	53	I	P	P*	P	A	P	Kanonische AA für H2-Schleife.
52B		I	-	-	Y	-		
52C		I	-	-	-	-		
53	54	I	S	N	G	G	S	Kanonische AA für H2-Schleife.
54	55	I	E	S	N	N	E	Kanonische AA für H2-Schleife.
55	56	I	S	G	G	G	S	Kanonische AA für H2-Schleife.
56	57	I	N	G	D	N	N	
57	58	I	T	T	T	T	T	
58	59	I	N	N	N	K	N	
59	60	I	Y	Y	Y	Y	Y	

60	61	I	N	N	A	S	N		
61	62	I	Q	E	Q	Q	Q		
62	63	I	K	K*	K	K	K		
63	64	I	F	F*	F	F	F		
64	65	I	K	K	Q	Q	K		
65	66	CDR2	G	S	G	G	G		
66	67	GR3	K	K*	R	R	R	Oberfläche	Distal zur BS. R=39/49, K in Human-I nicht zu sehen.
67	68	I	A	A*	V	V	V	Halb vergraben	Distal zur BS. V=45/48, A in Human-I nicht zu sehen.
68	69	I	T	T*	T	T	T	T	

69	70	I	L	L*	I	I	I	I	L	Vergraben	Leu unter der H2-Schleife und stützt die H2-Schleife ($\Delta 3$). Ile=26/49, Leu=1/49 in Human-I.
70	71	I	T	T*	T	T	T	T	T		
71	72	I	V	V	A	R	V	V	V	Vergraben	Kanonische AA für H2-Schleife ($\Delta 4$).
72	73	I	D	D*	D	D	D	D	D		

73	74	I	I	K	T	T	I	Oberfläche	Hinter Schleife; könnte direkt an der Ag-Bindung teilnehmen (Δ 5). Ile in Maus-IIB oder Human-I nicht zu sehen. T=21/49 in Human-I.	H2-
74	75	I	S	S	S*	S	S			
75	76	I	S	S*	T	A	<u>A</u>	Oberfläche	Distal zur BS. T=26/50, A=4/50, S nicht zu sehen in Human-I.	
76	77	I	S	S	S	S	S			
77	78	I	T	T*	T	T	T			
78	79	I	A	A	A	A	A			

79	80	I	Y	Y*	Y	Y	Y	Y	
80	81	I	M	M	M	M	M	M	
81	82	I	Q	Q	E	E	E	E	Distal zur BS. Q=163/194 in Maus-IIB. E=35/50, A=11/50 in Human-I.
82	83	I	L	L*	L	L	L	L	
82A	84	I	S	S	S	S	S	S	
82B	85	I	S	S	S	S	S	S	
82C	86	I	L	L*	L*	L	L	L	
83	87	I	T	T*	R	R	R	R	Distal zur BS. R=33/51, T=4/51 in Human-I.
84	88	I	S	S*	S	S	S	S	
85	89	I	E	E	E	E	E	E	
86	90	I	D	D*	D*	D	D	D	
87	91	I	S	S*	T	T	T	T	Distal zur BS. T=48/51, S=2/51 in Human-I.

88	92	I	A	A*	A	A	A				
89	93	I	V	V*	V	V	V				
90	94	I	Y	Y*	Y*	Y	Y				
91	95	I	Y	Y	Y	Y	Y				AA zur Packung. Häufigste AA.
92	96	I	C	C*	C*	C	C				
93	97	I	A	A	A*	A	A				AA zur Packung. Häufigste AA.
94	98	GR3	R	R	R	R	R				Kanonische AA für H1-Schleife
95	99	CDR3	G	Y	A	G	G				AA zur Packung. Zweithäufigster Rest an dieser Stelle-OK.
96	100	I	G	Y	P	-	G				
97	101	I	Y	Y	G	-	Y				
98	102	I	D	G	Y	-	D				
99	103	I	G	G	G	G	G				
100	104	I	W	S	S	-	W				
100A	105	I	D	S	G		D				
100B	106	I	Y	X	G	-	Y				

100C	107	I	A	X	G	-	A	
100D	108	I	I	V	C	-	I	Aa zur Packung. I=26/1211. F und M sind am häufigsten.
100E		I	-	Y	Y	-		
100F		I	-	X	R	Y		
100G		I	-	-	G	Y		
100H		I	-	Y*	D	G		
100I		I	-	W	Y	S		
100J		I	-	Y	X	G		
100K		I	-	F	F	S		
101	109	I	D	D	D	N	D	
102	110	CDR3	Y	Y	Y	Y	Y	
103	111	GR4	W	W*	W*	W	W	AA zur Packung. Häufigste AA.
104	112	I	G	G*	G	G	G	
105	113	I	Q	Q	Q	Q	Q	
106	114	I	G	G*	G*	G	G	
107	115	I	T	T*	T	T	T	

108	116	I	S	T	L	L	L	Oberfläche	Distal zur BS. T=88/149 in Maus-IIB. L=25/39, T=7/39 in Human-I.
109	117	I	V	V	V*	V	V		
110	118	I	T	T*	T	T	T		
111	119	I	V	V*	V	V	V		
112	120	I	S	S*	S*	S	S		
113	121	GR4	S	S	S*	S	S		

[0126] Was den Entwurf der umgeformten variablen Region der leichten Kette des humanen Act-1 anbelangte (Tabelle 3), wurde ein Rest in den humanen GR von der in den humanen GR vorhandenen Aminosäure zu der in den ursprünglichen Maus-FR vorhandenen Aminosäure geändert. Diese Änderung war an Position 2 in GR1 (wie definiert von Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fünfte Auflage, U.S. Department of Health und Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)). Insbesondere wurde das in der variablen Region der leichten Kette des humanen GM607'CL gefundene Isoleucin zu Valin geändert, wie es in der variablen Region der leichten Kette von Maus-Act-1 gefunden wird. Diese Position in der variablen Region der leichten Kette kappa wurde von Chothia, C., et al., Nature 342:877-883 (1989) als eine der Positionen identifiziert, die für die korrekte Ausrichtung und Struktur der L1-Schleife relevant sind, und als solche als eine der „kanonischen Aminosäuren“ bekannt ist. Aufgrund von deren wichtiger Rolle bei der Konformation der Schleifen, sind solche Mausgerüstreste im Allgemeinen in der umgeformten variablen Region immer konserviert.

[0127] An Position 4 in GR1 befindet sich in der Maussequenz ein Valin und in der humanen Sequenz ein Methionin. Eine Veränderung von einem Valin zu einem Methionin ist an sich keine drastische Veränderung, da beide Aminosäuren nicht-polare hydrophobe Reste sind, weshalb das in der humanen Sequenz vorhandene Methionin in der umgeformten variablen Region des humanen Act-1 verwendet wurde. Das Modell deutet jedoch an, dass das Valin zwischen den Schleifen L1 und L2 vergraben ist, und das mittlere Volumen von Valin beträgt, wenn es in Proteinen vergraben ist, $142 \text{ \AA}^3$, während Methionin etwa $171 \text{ \AA}^3$ Raum einnimmt. Der größere Methioninrest könnte eine Veränderung der Konformation einer der beiden Schleifen L1 und L2 oder beider Schleifen L1 und L2 verursachen. Die Antigenbindung des umgeformten humanen Act-1 könnte sich durch eine zusätzliche Veränderung an Position 4 der variablen Region der leichten Kette des umgeformten humanen Act-1 von Methionin zu einem Valin verbessern lassen.

[0128] Was den Entwurf der variablen Region der schweren Kette des umgebildeten humanen Act-1 anbelangte (Tabelle 4), gab es fünf Reste in den humanen GR, die von den in den humanen GR vorhandenen Aminosäuren zu den in den ursprünglichen Maus-GR vorhandenen Aminosäuren geändert wurden. An Position 24 in GR1 und 71 in GR3 (wie definiert von Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fünfte Auflage, U.S. Department of Health und Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)) wurden die Aminosäurereste, wie sie in der Maussequenz vorhanden sind, in der variablen Region der schweren Kette des umgeformten humanen Act-1 beibehalten, da diese Positionen Teil der kanonischen Struktur für die Schleifen H1 bzw. H2 sind (Chothia, C., et al., Nature 342:877-883 (1989)). Da alle Aminosäureveränderungen an diesen Positionen die Packung und die endgültigen Strukturen der Schleifen H1 und H2 stören könnten, sind Mausreste an diesen relevanten Positionen in der humanisierten variablen Region der schweren Kette routinemäßig konserviert.

[0129] An Position 48 in GR2 wurde das Methionin in der humanen Sequenz zu einem Isoleucin geändert, wie es in der Maus-Act-1-Sequenz vorhanden ist. Die Substitution von Methionin durch Isoleucin ist ungewöhnlich. Noch wichtiger ist, dass das Modell zeigt, dass der Isoleucinrest unter der Schleife H2 vergraben ist. Daraus folgt, dass Veränderungen an dieser vergrabenen Position die Struktur der Schleife H2 beeinflussen könnten und daher in die Antigenbindung eingriffen.

[0130] An Position 69 in GR3 wurde das Isoleucin in der humanen Sequenz zu einem Leucin ausgetauscht, wie es in der Maus-Act-1-Sequenz vorhanden war. Obgleich die Substitution eines Isoleucins durch ein Leucin nicht ungewöhnlich ist, zeigt das Modell, dass das Leucin unter der Schleife H2 vergraben ist. Demnach könnten Veränderungen an dieser Stelle wie beim Rest an Position 48 die Konformation der Schleife H2 beeinflussen und daher die Antigenbindung stören.

[0131] Schließlich wurde das Threonin an Position 73 der GR3 der humanen Sequenz zu einem Isoleucin geändert, wie es in der Maussequenz vorkommt. Ein Isoleucin an dieser Position in GR3 wurde zuvor weder in der Maus-Untergruppe IIB noch in der humanen Untergruppe I (wie definiert von Kabat, E.A., et al., Fünfte Auflage, U.S. Department of Health und Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)) gesehen, was den Schluss zulässt, dass Isoleucin an dieser Position eine wichtige Rolle bei der Antigenbindung spielen könnte.

[0132] In dem Modell scheint das Leucin an Position 73 an der Oberfläche neben dem Rand der Bindungsstelle zu liegen, und könnte, je nach Größe und Ausrichtung des Epitops auf dem $\alpha 4 \beta 7$ -Integrin, möglicherweise eine direkte Rolle bei der Antigenbindung spielen. Da es sich aber um einen Rest handelt, der an der Oberfläche positioniert ist, hätte der Antikörper insgesamt geringeres immunogenes Potenzial, wenn die Maus-Aminosäure im umgeformten humanen Antikörper nicht vorhanden wäre. In Derivaten des umgeformten Antikör-

pers ließe sich das Isoleucin durch den humanen Threoninrest ersetzen, und das neue Konstrukt könnte erneut getestet werden um zu bestimmen, ob die zweite Version ein ähnliches Maß an Antigenbindung beibehalten hat.

[0133] Außer den fünf Veränderungen in den humanen GR, die im ursprünglichen Entwurf der variablen Region der schweren Kette des umgeformten humanen Act-1 vorgenommen wurden, konnten zwei weitere Veränderungen vorgenommen werden, die die Antigenbindung verbessern könnten. Das Modell lässt den Schluss zu, dass Rest 38 Lys und 40 Arg in der variablen Region der schweren Kette des Maus-mAb Act-1 unter der Schleife H2 positioniert sind und sich in der Nähe des 63 Phe in CDR2 anordnen (Packing) (Nummerierung wie in Tabelle 4). Diese Reste befinden sich aber auch im Herzen der variablen Region der schweren Kette und könnte daher andere, möglicherweise schädliche, Effekte haben, wenn sie verwendet würden, um ihre entsprechenden humanen Aminosäuren zu ersetzen (respektive 38 Arg und 40 Ala). Die Veränderungen an Position 38 und 40 in GR2 wurden daher nicht in die umgeformte humane variable Region der schweren Kette des mAb Act-1 aufgenommen. Eine oder beide Modifikationen der umgeformten schweren Kette kann bzw. können aber in Derivaten verwendet werden, um die Antigenbindung zu verbessern.

Schlussfolgerungen

[0134] Ein Modell der variablen Regionen des Maus-Act-1 wurde hauptsächlich basierend auf den aufgeklärten Strukturen variabler Regionen anderer Antikörper erstellt. Das Modell wurde beim Entwurf der variablen Regionen von humanisiertem Act-1 verwendet. Besondere Beachtung galt dem Erhalt der Struktur der Antigenbindungsstelle in den umgeformten humanen variablen Regionen.

[0135] Es wurden eine umgeformte variable Region der leichten Kette von humanem Act-1 und eine umgeformte variable Region der schweren Ketten von humanem Act-1 entworfen (Tabelle 3 und 4). Die umgeformte variable Region der leichten Kette von humanem Act-1 beruhte auf den CDR der variablen Region der leichten Kette von Maus-Act-1 und auf den GR der variablen Region der leichten Kette von humanem GM607'CL-Antikörper. In den humanen GR an Position 2 wurde eine Aminosäureveränderung vorgenommen. Die umgeformte variable Region der schweren Kette von humanem Act-1 beruhte auf den CDR der variablen Region der schweren Kette von Maus-Act-1 und auf den GR der variablen Region der schweren Kette des humanen 21/28'CL-Antikörpers. In den humanen GR an Position 24, 48, 69, 71 und 73 wurden fünf Aminosäureveränderungen vorgenommen.

[0136] Darüber hinaus wurde eine einzelne Stelle an Position 4 in GR1 der leichten Kette kappa und zwei Stellen an Position 38 und 40 in GR2 der schweren Kette bemerkt, die beim Entwurf weiterer Versionen von umgeformten variablen Regionen des humanen Act-1 in Betracht gezogen werden könnten. Auch ein einzelner Rest an Position 73 in GR3 der schweren Kette wurde in Anbetracht seiner Position an der Oberfläche des Antikörpers als ein Kandidat für eine Rückmutation von der Mausaminosäure zur humanen Aminosäure identifiziert.

Beispiel 3 Konstruktion von Nukleinsäuren, die umgeformte variable Regionen kodieren

[0137] Nachdem biochemisch (partielle Aminosäuresequenz) und funktionell (chimäre Antikörperfärbung von HuT 78-Zellen) bestätigt worden war, dass die korrekten variablen Regionen der schweren Kette und der leichten Ketten kloniert worden waren, wurde eine umgeformte Aminosäuresequenz wie oben beschrieben entworfen. Anschließend wurden Gene entworfen und hergestellt, welche die umgeformten Antikörperketten kodieren.

Entwurf, Konstruktion und Expression von humanisiertem ACT-1

[0138] Nachdem die primäre Aminosäuresequenz des humanisierten Antikörpers wie beschrieben in Beispiel 2 bestimmt worden war, wurde die Sequenz revers zu einer degenerierten Nukleinsäuresequenz translatiert und mithilfe von MacVector (Kodak, Scientific Imaging Systems) Version 4.5.3. hinsichtlich möglicher Restriktionsenzymststellen analysiert. Es wurde dann eine Nukleinsäuresequenz ausgewählt, die Restriktionsenzymststellen enthielt, aber die primäre Aminosäuresequenz konservierte. Die Nukleinsäuresequenz (SEQ ID NO: 18) und die Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 19) der schweren Kette sind in [Fig. 11](#) gezeigt, und die Nukleinsäuresequenz (SEQ ID NO: 20) und die Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 21) der leichten Kette sind in [Fig. 12](#) gezeigt, wobei die Restriktionsenzymststellen, die zum Subklonieren verwendet wurden, gekennzeichnet sind.

[0139] Die Gene der variablen Region der schweren und leichten Kette des humanisierten Act-1 wurden folgenderweise konstruiert. Mit einem DNA Synthesizer Modell 392 von Applied Biosystems wurden überlappende, komplementäre Oligonukleotide, bezeichnet als L1-L6 (SEQ ID NOS: 22-27 respektive) für die leichte Kette und H1-H10 (SEQ ID NOS: 28-37 respektive) für die schwere Kette, synthetisiert ([Fig. 13](#)). Nach dem Entschützen über Nacht bei 55°C wurden die Oligos in einer Speed-Vac-Vorrichtung getrocknet, in 100 ml Wasser resuspendiert und über Bio-Spin-6-Säulen (Bio-Rad) entsalzt. Die Konzentration der Oligos wurde durch Messen der Absorption bei 260 nm bestimmt, und die Oligos wurden durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese gereinigt.

[0140] 100 µg jedes Oligos wurde mit 2 Volumen Ladefarbstoff (95% Formamid, 20 mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylolcyanol FF) gemischt, 2 Minuten bei 65°C erhitzt und in 1 × TBE etwa 3 Stunden bei 250 V aufgetrennt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und unter ultraviolettem Licht betrachtet. Oligos der korrekten Länge wurden dann aus dem Gel ausgeschnitten, in Dialyseschläuche mit Wasser gegeben und elektroeluiert. Die Oligos wurden zweimal mit gleichen Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 Vol./Vol.) (Gibco/BRL) extrahiert und ausgefällt, indem 0,1 Volumen von 3,0 M Kaliumacetat (pH 6) und 2 Volumen kaltes Ethanol zugegeben wurden. Nach der Zentrifugation wurden die Pellets einmal mit 70% Ethanol gewaschen, vakuumgetrocknet und in 50 µl Wasser resuspendiert.

[0141] Komplementäre Oligos wurden angeheftet (Annealing), indem äquimolare Mengen (etwa 100 µg in 50 µl Wasser) des gereinigten Oligos mit einem gleichen Volumen (100 µl) von 2X-Annealingpuffer (2X = 1M NaCl, 40 mM Tris-HCl bei pH 7, 5, 2 mM EDTA) gemischt wurden. Die Oligos wurden durch 10-minütiges Erhitzen bei 95°C denaturiert, gefolgt von einer 8-stündigen Inkubation bei 65°C. Angeheftete Oligos wurden dann mit Ethanol ausgefällt, wie oben beschrieben, und in 40 µl Wasser resuspendiert.

[0142] Die Verlängerung (Extension) der angehefteten Oligos wurde erreicht, indem 2 µl Large Fragment DNA Polymerase I (Klenow), 5 µl 2,5 mM dNTPs und 5 µl 10 X-Puffer (10X = 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,9 bei 25°C) zugegeben und das Endvolumen auf 52 µl gebracht wurde. Die Mischung wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden weitere 1 µl dNTPs und 1 µl Klenow zugegeben und eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert. Das Fragment A der schweren Kette musste nicht verlängert werden.

[0143] Angeheftete und verlängerte Fragmente wurden durch Elektrophorese durch ein 12%iges natives Polyacrylamidgel aus einzelsträngigem, nicht angeheftetem Material gereinigt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und unter ultraviolettem Licht betrachtet. Die Fragmente mit korrekter Länge wurden ausgeschnitten und durch Elektroelution in Dialyseschläuchen wie oben beschrieben zurückgewonnen. Die Fragmente wurden zweimal mit gleichen Volumen von Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol gewaschen, mit Ethanol ausgefällt und in 10 µl Wasser resuspendiert.

[0144] Die drei Fragmente der leichten Kette (LA, LB & LC) und fünf Fragmente der schweren Kette (als HA-HE bezeichnet) wurden unabhängig in pCR-Script™ ligiert und, außer wie unten beschrieben, mit einem pCR-Script-Kit (Stratagene) nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll in superkompetente Zellen XL-1 transformiert. Die Fragmente pCR-LA und pCR-LB wurden in kompetente Zellen DM1 (Gibco/BRL) transformiert, um die Dcm-Methylase zu vermeiden, die den Verdau mit dem Restriktionsenzym MscI blockieren würde. Weiße Kolonien wurden gepickt, und Miniprep-DNA wurde nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll mit dem Sequenase T7 DNA-Polymerase-Kit sequenziert. Zum Sequenzieren wurden die Primer T3 und T7 verwendet, die sich an gegenüber liegende Seiten des Inserts anheften.

[0145] Gesammeltes Subklonieren der Fragmente der humanisierten variablen Region der schweren Kette und der variablen Region der leichten Kette wurde durch Verwendung spezifischer Restriktionsschnittstellen erreicht, die während der Synthese in die Sequenz eingebaut wurden. Die Fragmente HA-HD der schweren Kette enthielten eine zusätzliche AgeI-Restriktionsschnittstelle am Ende jeder Sequenz, was ein anschließendes Subklonieren der Fragmente wie unten beschrieben erlaubte.

[0146] Miniprep-DNA von pCR-HA und pCR-HB wurde mit den Restriktionsenzymen SpeI und AgeI verdaut. DNA wurde auf einem 1%igen Agarosegel durch Elektrophorese aufgetrennt. Das Fragment HB mit 141 bp wurde aus dem Gel zurückgewonnen und in die Schnittstellen SpeI und AgeI in pCR-HA ligiert, wodurch pCR-HAB entstand. Als nächstes wurde das Fragment HC mit 112 bp mit XbaI und AgeI aus pCR-HC freigesetzt und in die Schnittstellen XbaI und AgeI in pCR-HAB ligiert, wodurch pCR-AC entstand. Fragment HD (141 bp) und HC (130 bp) wurden in derselben aufeinander folgenden Art ligiert, wobei für Fragment HD die Restriktionsenzymsschnittstellen NheI und AgeI und für Fragment E die Restriktionsenzymsschnittstellen BstEII und AgeI verwendet wurden. Das Endplasmid, das alle fünf Fragmente der variablen Region der schweren Kette

in pCR-script enthielt, wurde als pCR-HAE bezeichnet. Alle Verdauungen wurden mit Miniprep-DNA mit Inkubationen bei 37°C für mindestens zwei Stunden durchgeführt, außer die, bei denen BstEII verwendet wurde, dessen optimale Inkubationstemperatur 65°C beträgt. Ligationen wurden über Nacht bei 16°C mit T4 DNA-Ligase und einem Vektor-zu-Insert-Verhältnis von 1:10 durchgeführt und am folgenden Tag nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll in kompetente Zellen DH5α für effizientes Subklonieren (Gibco/BRL) transformiert.

[0147] Die humanisierte variable Region der schweren Kette von Act-1 in pCR-Script™ wurde durch Verdauung von PCR-HAE mit HindIII und AgeI freigesetzt. Dieses 411-bp-Fragment wurde verwendet, um die variablen Mausregionsequenzen von pEE6mhACT1Hchi (Beispiel 1) zu ersetzen, das mit HindIII und AgeI verdaut worden war, um das Gen der schweren Kette des humanisierten ACT-1 in pEE6hCMV-B zu erhalten. Das resultierende Plasmid wird als pEE6hACT1H bezeichnet. Die korrekte DNA-Sequenz wurde durch Sequenzierung bestimmt.

[0148] Das Fragment A der leichten Kette in pCR-Script™ wurde mit BspEI und MscI verdaut. Dieses 153-bp-Fragment wurde dann verwendet, um den Mausanteil von BspEI bis MscI der murinen variablen Region der leichten Kette in pCR-script™ zu ersetzen. Dieses Plasmid wird als pCR-LhAmBC bezeichnet. Fragment B der leichten Kette, verdaut mit MscI und NruI, und Fragment C der leichten Kette, verdaut mit NruI und KsaI, wurden dreifach in die MscI- und KsaI-Schnittstellen von pCR-LhAmBC ligiert, wodurch die verbleibenden Maussequenzen ersetzt wurden. Verdauung, Ligationen und Transformationen verwendeten dasselbe Verfahren wie zuvor beschrieben, außer dass bei allen, außer der letzten Transformation, kompetente Zellen DM1 verwendet wurden.

[0149] Die humanisierte variable Region der leichten Kette in pCR-Script™ und das Plasmid pEE12mhACT1Lchi (Beispiel 1) wurden mit HindIII und KsaI verdaut. Das 360-bp-Fragment der variablen Region der leichten Kette und das 315-bp-Fragment der konstanten Region der leichten Kette wurden im Gel gereinigt und dreifach in die HindIII-Restriktionsschnittstelle von pEE12 ligiert, um pEE12hACT1L zu erhalten. Zur Bestätigung der korrekten Ausrichtung und Nukleinsäuresequenz wurde eine Sequenzierung durchgeführt.

[0150] Ein Expressionsvektor, der die Gene der humanisierten schweren und der leichten Kette enthielt, wurde mit demselben Verfahren konstruiert, wie für den chimären Antikörper beschrieben wurde (siehe Beispiel 1, Expression eines chimären Immunglobulins), mit folgender Ausnahme. Aufgrund einer zusätzlichen BglII-Restriktionsschnittstelle in der variablen Region der humanisierten schweren Kette wurde ein partieller Verdau verwendet, wenn mit BglII geschnitten wurde, um das korrekte Fragment zu erhalten. Der Vektor, welcher sowohl das Gen der humanisierten schweren als auch das Gen der humanisierten leichten Kette enthielt, wird als pEE12hACT1LH bezeichnet.

[0151] Transiente Expression aller humanisierten Antikörperkonstrukte und Zellfärbung wurde anhand desselben Protokolls durchgeführt, wie sie für den chimären Antikörper angewandt wurden (siehe Beispiel 1, Expression eines chimären Immunglobulins). [Fig. 14](#) zeigt die Ergebnisse der Färbung von HuT 78 mit der Maus-Human-Chimäre des Act-1-Antikörpers oder dem humanisierten Act-1-Antikörper im Vergleich mit einem irrelevanten Kontrollantikörper gleichen Isotyps (IgG1, kappa).

[0152] Stabile Transfektanten von NSO-Zellen, einer Myelomzelllinie (Methods in Enzymol. 73 (B):3-46 (1981); European Collection of Animal Cell Cultures, PHLS CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, GB, ECACC Nr. 85110503), wurden durch Elektroporation von NSO-Zellen mit pEE12hACT1LH erhalten.

Stabile Expression in NSO-Zellen

[0153] Für eine stabile Transfektion wurden 40 µg von pEE12hACT1LH durch Verdauung mit Sall-Restriktionsenzym, das innerhalb des bakteriellen Plasmidanteils des Konstruktes schneidet, linearisiert. Die linearisierte DNA wurde unter Verwendung von zwei Volumen Ethanol plus 1/10 Volumen Natriumacetat aus der Lösung ausgefällt, in 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in sterilem Wasser resuspendiert.

[0154] NSO-Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase wurden in nicht-selektivem Medium (Dulbecco's Modified Eagles' Medium (hohe Glukosekonzentration) mit 2 mM L-Glutamin, ohne Natriumpyruvat, mit 4500 mg/l Glukose und mit 25 mM HEPES-Puffer (GIBCO/BRL, Bestell-Nr. 12430-021), plus 10% fetales Rinder Serum (Gibco/BRL, Bestell-Nr. 16000-044)) gehalten. NSO-Zellen wurden zentrifugiert, gewaschen und derart in kaltem PBS aufgenommen, dass nach Zugabe der DNA die Zellen in einer Konzentration von 10⁷ Zellen/ml

vorliegen. Die linearisierte Plasmid-DNA (40 µg) wurde zu 10^7 Zellen in einer Elektroporationskuvette auf Eis gegeben. Die Zellen und die DNA wurden vorsichtig gemischt, um Blasenbildung zu vermeiden, und die Mischung wurde 10 Minuten auf Eis stehen gelassen. Die Außenseite der Kuvette wurde trocken gewischt, und mit einem Gene Pulser (Bio-Rad) wurden zwei aufeinander folgende Impulse von 1500 V, 3 µF abgegeben. Die Kuvette wurde für 10 Minuten wieder auf Eis gestellt.

[0155] Transfizierte Zellen wurden in einer Dichte von 3×10^5 , $7,5 \times 10^4$ und $1,5 \times 10^4$ Zellen/ml in 50 µl nicht-selektivem Medium in Platten mit 96 Vertiefungen überführt und bei 37°C 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde allen Vertiefungen 150 µl Selektionsmedium (glutaminfreies Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit 4500 mg/l Glukose, 4 mg/l Pyridoxin-HCl, 110 mg/l Natriumpyruvat, ohne Eisen(III)nitrat, ohne L-Glutamin (JRH BioSciences, Bestell-Nr. 51435-78P), plus 1X GS-Supplement (50X GS-Supplement erhalten von JRH Bioscience, Bestell-Nr. 58672-77P), plus 10% dialysiertes fetales Rinderserum (Gibco/BRL, Bestell-Nr. 26300-061)) zugegeben. Die Platten wurden zurück in den Inkubator gegeben, bis erheblicher Zelltod stattgefunden hatte und diskrete überlebende Kolonien erschienen waren. Sobald glutaminunabhängige Transfektanden zu sehen waren, wurden Vertiefungen mit Einzelkolonien ausgewählt und verbrauchte Gewebekulturüberstände wurden abgenommen und hinsichtlich der Sekretion von humanem IgG durch ELISA getestet, wie unten beschrieben. Auf diese Weise wurde ein Antikörper produzierender Klon mit der Bezeichnung 3A9 erhalten, der in anschließenden Untersuchungen verwendet wurde. Nach der oben beschriebenen Vorgehensweise wurde eine zweite Transformation durchgeführt, außer dass die Selektion in Gegenwart von L-Methioninsulfoximin (MSX, ein Glutaminsynthetaseinhibitor) stattfand.

[0156] Positive Kolonien wurden wie folgt durch ELISA auf Sekretion von humanem IgG getestet. ELISA-Platten (NUNC Maxisorp) wurden über Nacht bei 4°C mit 100 µl AffiniPure-gereinigtem F(ab')₂-Fragment von Esel-Anti-Human-IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) bei 2,5 µg/ml in Carbonatpuffer pH 9,5 inkubiert. Die Platten wurden viermal mit PBS Tween 20 gewaschen und mit 200 µl PBS, 1% BSA 2 Stunden bei 37°C blockiert. Die Platten wurden gewaschen und 15 Min. bei 37°C mit 100 µl Überstand von stabil transfizierten NSO-Zellen inkubiert. Als Standard wurde humanes IgG1-kappa bei 1 mg/ml in PBS 1% BSA verwendet. Als Negativkontrolle wurde frisches NSO-Medium (DME + GS-Supplement) verwendet. Die Platten wurden gewaschen und 15 Min. bei 37°C mit 100 µl peroxidase-konjugiertem AffiniPure-gereinigtem F(ab')₂-Fragment von Esel-Anti-Human-IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) bei 0,05 µg/ml in PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) inkubiert. Eine Tablette mit 5 mg O-Phenylendiamindihydrochlorid (OPD) (Sigma) wurde in 12 ml Citratpuffer (0,1 M, pH 5,0) gelöst, und nachdem sich die Tablette aufgelöst hatte, wurde 12 µl 30% Wasserstoffperoxid zugegeben. Nachdem gewaschen wurde, um den sekundären Antikörper zu entfernen, wurde 100 µl gelöstes OPD-Substrat zugegeben. Die Reaktion wurde mit 12,5% Schwefelsäure angehalten, und die Platten wurden auf einem Dynatech Plate Reader bei 490 nm gemessen. Positive Vertiefungen wurden durch Grenzwertverdünnung (Limiting Dilution) auf 2, 1 und 0,5 Zellen je Vertiefung kloniert. Wenn alle Vertiefungen einer einzelnen Klonierung im ELISA positiv auf Antikörperproduktion testeten, wurde die Linie als kloniert betrachtet.

[0157] Reinigung von humanisiertem Act-1-Antikörper aus Zellkulturüberständen von Kulturen transienter oder stabiler Zelltransfektanden erfolgte durch Protein-A-Affinitätschromatographie (Poros A/M 4.6/100 mm, 5 ml/Min unter Verwendung einer Bio-Cad-Arbeitsstation (Perseptive Biosystems, Inc.). Die Säule wurde mit PBS äquilibriert, gefolgt von der Auftragung des Zellkulturüberstandes, der davor durch 0,2-Mikron-Filter filtriert wurde. Das in jedem Lauf aufgetragene Volumen an Zellkulturüberstand variierte je nach Konzentration des Antikörpers. Normalerweise wurden in einem Lauf nicht mehr als 15 mg Antikörper auf die Säule aufgetragen. Die Flussrate war während des gesamten Reinigungsvorgangs 5 ml/Min. Nach der Bindung wurde die Säule zuerst gründlich mit PBS gewaschen, bis OD₂₈₀ nm = 0 erreicht war. Die Säule wurde dann weiter mit mindestens 50 Säulenvolumen gewaschen. Die Säule wurde anschließend mit 0,1 M Natriumacetat, pH 5,0, gewaschen. Eluiert wurde durch Waschen mit 0,1 M Na-Citrat, pH 3,5. Das Eluat wurde in 5-ml-Fractionen aufgefangen und der pH-Wert durch Zugabe von 200 µl 1,5 M Na₂CO₃ pH 12 neutralisiert. Antikörper-enthaltende Fractionen wurden daraufhin vereinigt und durch Ultrafiltration auf die gewünschte Konzentration eingeeengt (Centricon, 30.000 kDa Ausschlussgröße (Cut-Off), Amicon).

Konstruktion einer Fc-mutierten Variante

[0158] Es wurde auch eine Nicht-Fc-bindende (Fc-mutierte) Version des humanisierten Act-1-Antikörpers konstruiert. Dieser Antikörper hatte dieselben variablen Regionen wie der humanisierte Act-1-Antikörper ([Fig. 11](#) und [Fig. 12](#)) und eine identische konstante Region des humanen IgG1, mit Ausnahme zweier Aminosäuresubstitutionen in der konstanten Region der schweren Kette von IgG1, welche die FcR-Erkennung aufheben und die Fc-Bindung beseitigen sollen (d. h. eine Leu²³⁵ → Ala²³⁵-Substitution und eine Gly²³⁷ →

Ala²³⁷-Substitution). Die Nukleinsäure, welche die schwere Kette des Fc-mutierten Derivates kodiert, wurde folgenderweise konstruiert. Ein Konstrukt mit der Bezeichnung 3678 (erhalten von Dr. Herman Waldmann, Universität Oxford), das die leichte Kette und die schwere Kette eines humanisierten Anti-CD18-Antikörpers kodiert (WO 93/02191 (veröffentlicht am 4. Februar 1993); Sims, M.J., et al., J. Immunol. 151(4): 2296-2308 (1993)), in einem pEE12-Expressionsvektor, in den aber durch ortsgerichtete Mutagenese zwei Aminosäuresubstitutionen in die konstante Region der schweren Kette von IgG1 eingeführt wurden (Leu²³⁵ → Ala²³⁵ und Gly²³⁷ → Ala²³⁷), wurde mit AgeI und EcoRI verdaut, um ein 900-bp-Fragment frei zu setzen, das die Mutante der konstanten Region gamma enthielt. Dieses Fragment wurde dann verwendet, um die konstante Region gamma eins des Wildtyps der schweren Kette an den AgeI/EcoRI-Schnittstellen in pEE6hACT1H zu ersetzen, woraus pEE6hACT1H/FCmut entstand. Auf analoge Weise zu der oben für andere, beide Ketten umfassende Konstrukte Beschriebenen wurde ein einzelnes Konstrukt (pEE12hACT1LH/FCmut) hergestellt, welches das Gen der umgeformten leichten Kette und das Gen der Fc-mutierten umgeformten schweren Kette enthält.

Beispiel 4 Charakterisierung von LDP-02, einem humanisierten ACT-1-Antikörper

[0159] Die ersten Charakterisierungsstudien wurden mit einem Antikörper durchgeführt, der aus transient mit pEE12hACT1LH/FCmut transfizierten COS-7-Zellen isoliert wurde. Diese Antikörperpräparation wurde hergestellt und gereinigt wie oben beschrieben, und wird unten als „1°HUM ACT-1“ bezeichnet, gefolgt von der jeweiligen Chargennummer.

[0160] Es wurden weitere Assays durchgeführt, in denen ein Antikörper verwendet wurde, der aus einem stabilen Transfektanten der murinen Zelllinie NSO wie oben beschrieben (transfiziert mit linearisiertem pEE12hACT1LH/FCmut) hergestellt wurde. Diese Antikörperpräparation wird unten als „LDP-02/3A9/Lot 1“ bezeichnet.

[0161] „LDP-02/3A9/Lot#1“-Antikörper wurde in den folgenden unten beschriebenen Studien verwendet: SDS-PAGE, Western-Blot-Analyse, isoelektrische Fokussierung, Analyse der Aminosäurezusammensetzung, Kreuzreaktivität der Arten, Titration, Komplementvermittelte Lyse-Assays, ADCC-Assays und Bindungsinhibitionsassays. „1°HUM ACT-1 Lot #7“ wurde in den Affinitätstests 1-2 verwendet, „1°HUM ACT-1 Lot #8/9“ wurde in den Affinitätstests 3-5 verwendet, und „1°HUM ACT-1 Lot #8/9“ wurde in Clq-Bindungsassays verwendet.

A. Physikalisch-chemische Eigenschaften

1. SDS-PAGE

[0162] Zur Unterstützung der Etablierung der Identität, zur Charakterisierung der ersten Präparation und zur Untersuchung der Reinheit wurde LDP-02/3A9/Lot#1 einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen unterzogen und mit kolloidalem Coomassie-Blau gefärbt.

[0163] 80 µl von LDP-02/3A9/Lot#1 bei einer Nennkonzentration von 0,82 mg/ml wurde in einen Mikrokonzentratoren gegeben. Der Citratpuffer, in dem der Antikörper gelöst war, wurde dreimal durch 160 µl Tris-Puffer (0,5 mM, pH 8,8) ersetzt. Das Endvolumen der Probe nach dem Pufferaustausch war 135 µl, was eine Proteinkonzentration von 0,486 mg/ml ergab. Diese Lösung wurde zweifach mit sowohl nicht-reduzierendem als auch reduzierendem Puffer verdünnt, um eine Konzentration von 0,243 mg/ml zu erhalten. Ein Aliquot von 13 µl der Lösung mit 0,243 mg/ml, das 3,16 µg Protein enthielt, wurde in die entsprechenden Probenspuren des SDS-Gels geladen. Es wurde eine SDS-PAGE durchgeführt, und Kontrollen umfassten Mark-12-Molekulargewichtsstandards (Novex, Nr. LC5677).

[0164] Unter nicht-reduzierenden Bedingungen war eine Hauptbande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwas kleiner als 200.000 Dalton in LDP-02/3A9/Lot#1 vorhanden. Zwischen 116.300 und 200.000 Dalton wurden mehrere kleinere Bestandteile beobachtet. Außerdem wurden drei weitere kleinere Bestandteile mit ungefähren Molekulargewichten von 97.400 Dalton, etwas größer als 55.400 Dalton und kleiner als 31.000 Dalton beobachtet. Durch laserdensitometrisches Einscannen des Gels war eine quantitative Analyse der gefärbten Polypeptidbanden und anschließend eine Berechnung der prozentualen Fläche in Verbindung mit jeder sichtbaren Bande möglich (Tabelle 5). Die aus der quantitativen Analyse erhaltenen Daten zeigen, dass die Hauptkomponente, die bei etwa 200.000 Dalton beobachtet wurde, 84,4 der gesamten gefärbten Banden in der Testprobenspur darstellte. Diese Hauptbande stellte den intakten Antikörper dar, während die anderen Banden bei 55.000 und 31.000 Dalton die schwere bzw. die leichte Kette darstellten.

[0165] Unter reduzierenden Bedingungen wurden zwei Hauptbestandteile auf dem Elektrophoresegel beobachtet. Das Molekulargewicht eines der Bestandteile war etwa 55.400 Dalton und stellte 68,6 der gesamten gefärbten Banden dar, die in der Gelspur sichtbar waren, während der zweite Bestandteil etwas weniger als 31.000 Dalton entsprach, was 30,5 der gesamten gefärbten Banden darstellte (Tabelle 5). Das Molekulargewicht dieser beiden Bestandteile stimmt gut mit den erwarteten Molekulargewichten der schweren und leichten Ketten eines Immunglobulins G überein. Diese Daten zeigen, dass etwa 99% der Präparation entweder aus intaktem Antikörper oder einzelnen schweren oder leichten Immunglobulinketten bestanden. Neben den beiden Hauptbestandteilen wurde auch ein kleinerer Bestandteil bei etwas weniger als 66.300 Dalton beobachtet.

[0166] Aus diesen Analysen ergab sich, dass eine hochmolekulare Art, die mit der für intaktes Immunglobulin G übereinstimmt, als Hauptbande in LDP-02/3A9/Lot#1 vorhanden ist. In LDP-02/3A9/Lot#1 sind auch mehrere kleine Banden vorhanden. Nach Reduktion wurden zwei Hauptbanden beobachtet, deren elektrophoretische Migration mit der der schweren und leichten Ketten eines Immunglobulin-G-Moleküls übereinstimmte.

TABELLE 5

ZUSAMMENFASSUNG DER REINHEITSDATEN; FÄRBUNG MIT KOLLOIDALEM COOMASSIE-BLAU; NICHT-REDUZIERENDE BEDINGUNGEN			
Probe	Spur	Prozentuale Fläche (Hauptbestandteil)	
LDP-02/3A9/Lot #1	5	84,4%	

ZUSAMMENFASSUNG DER REINHEITSDATEN; FÄRBUNG MIT KOLLOIDALEM COOMASSIE-BLAU; REDUZIERENDE BEDINGUNGEN			
Probe	Spur	Prozentuale Fläche, niederes Molekulargewicht	Prozentuale Fläche, niederes Molekulargewicht
LDP- 02/3A9/Lot #1	9	68,6%	30,5%

2. Western-Blot Analyse

[0167] Proben und Standards wurden per SDS-PAGE wie oben beschrieben analysiert. In Kürze wurden nicht-reduzierte und reduzierte Proben auf einem 420%igen Tris-Glycinegel analysiert. Auf dem Gel wurden auch Novex Mark 12 Molekulargewichtsstandards mit aufgetrennt. Volumen von 2,1-µl- und 4,5-µl-Aliquots der Lösung mit 0,2143 mg/ml, was 0,51 µg bzw. 1,09 µg Protein ergab, wurden in die entsprechenden Probenspuren des SDS-Gels geladen.

[0168] Nach der SDS-PAGE wurde Probenprotein nach den Anleitungen von Novex zu der Western-Transfer-Vorrichtung aus dem Gel auf Nitrozellulose übertragen. Als Transferpuffer wurde 1X Tris-Glycin-Puffer in 20% Methanol verwendet. Nach etwa 2 Stunden wurde der Nitrozelluloseblot aus der Transfervorrichtung entnommen und mit doppelt destilliertem Wasser gespült. Der Nitrozelluloseblot wurde dann bei 37°C für 35 Minuten in Tris-Puffer (20 mM), der 3% Gelatine und 0,1% Tween 20 enthielt, blockiert. Der Blot wurde aus der Blockierlösung genommen und zweimal mit Tris-Puffer gewaschen. Zu dem Blot wurde Ziege-Anti-Maus-IgG-Lösung gegeben, die durch 100-fache Verdünnung der Anti-Maus-IgG-Antikörper-Stammlösung mit 20 mM Tris-3%-BSA-Lösung hergestellt wurde, und bei 2-8°C über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation

wurde der Blot viermal jeweils 5 Minuten mit jeweils frischem Tris-Puffer gewaschen. Zu dem Blot wurde Anti-Ziege-IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat-Lösung, hergestellt durch 5000-fache Verdünnung des Anti-Ziege-IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugates mit 20 mM Tris-3%-BSA-Lösung, gegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Blot viermal jeweils 5 Minuten mit jeweils frischem Tris-Puffer gewaschen. Zu dem Blot wurden jeweils 10 ml auf einmal BCIP/NBT-(5-Brom-4-chlor-3'-indolylphosphat-p-toluidinsalz/Nitroblautetrazoliumchlorid)-Substrate gegeben. Der Blot wurde bei Raumtemperatur unter Hin- und Herbewegen entwickelt. Die Reaktion wurde durch Spülen des Blots mit Tris-Puffer angehalten. Der obige Vorgang wurde anschließend mit Ziege-Anti-Human-IgG anstelle von Ziege-Anti-Maus-IgG wiederholt.

[0169] Sowohl unter nicht-reduzierenden als auch unter reduzierenden Bedingungen wurden unter Verwendung des Anti-Maus-IgG-Reagens die 0,51- μ g- und die 1,09- μ g-Probe deutlich auf dem Nitrozelluloseblot festgestellt. Die Intensität der Banden erhöhte sich mit steigender Konzentration. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurde eine Hauptbande festgestellt, die etwas schneller als der 200.000-Dalton-Marker lief. Außerdem wurden mehrere schwächere Banden festgestellt. Zwei dieser Banden wanderten langsamer als die Hauptbande und etwa drei weitere Banden wanderten schneller. Unter reduzierenden Bedingungen wurden zwei Banden festgestellt, die kennzeichnend sind für die schweren und leichten Ketten von Immunglobulin G.

[0170] Unter Verwendung des Anti-Human-IgG-Reagens sowohl unter nicht-reduzierenden als auch unter reduzierenden Bedingungen wurden die 0,51- μ g- und die 1,09- μ g-Probe deutlich auf dem Nitrozelluloseblot festgestellt. Die Intensität der Banden erhöhte sich mit steigender Konzentration. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurde eine Hauptbande festgestellt, die einer Art mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwas unter 200.000 Dalton entsprach. Auch die schwächeren Banden im Blot, die mit Anti-Maus-IgG festgestellt wurden, waren vorhanden. Die Intensität der Immunfärbung war bei allen Banden höher, wenn sie mit Anti-Human-IgG festgestellt wurden. Es wurden mehrere weitere Banden festgestellt, die im anderen Blot nicht beobachtet wurden. Es ist wahrscheinlich, dass diese Banden IgG-Fragmenten entsprechen, die keine Epitope aufweisen, welche von dem Anti-Maus-IgG erkannt werden. Unter reduzierenden Bedingungen wurde eine Bande festgestellt, die kennzeichnend ist für die schwere Kette von Immunglobulin G. Da der Antikörper spezifisch war für den Fc-Anteil von humanem IgG, wurde die leichte Kette nicht festgestellt. Es wurden mehrere kleinere Banden festgestellt, die in dem mit Anti-Maus-IgG entwickelten Blot nicht zu sehen waren, wenn zum Feststellen Anti-Human-IgG verwendet wurde. Dieser Unterschied zwischen den beiden Blots könnte das Resultat des Vorhandenseins von IgG-Fragmenten sein, die keine Epitope für die Bindung von Anti-Maus-IgG aufweisen.

3. Isoelektrische Fokussierung

[0171] LDP-02/3A9/Lot#1 wurde einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) unterzogen und mit kolloidalem Coomassie-Blau gefärbt. Die für LDP-02/3A9/Lot#1 erhaltenen Ergebnisse wurden mit IEF-Standards verglichen, die auf demselben Gel fokussiert wurden.

[0172] 80 μ l von LDP-02/3A9/Lot#1 mit einer Nennkonzentration von 0,82 mg/ml wurden in einen Mikrokonzentratoren gegeben. Der Citratpuffer, in dem der Antikörper vorhanden war, wurde dreimal mit 160 μ l Tris-Puffer (0,5 mM, pH 8,8) ausgetauscht. Das Endvolumen der Probe war 135 μ l. Die Endkonzentration wurde auf 0,486 mg/ml berechnet. Diese Lösung wurde zweifach mit 2XIEF-Probenpuffer verdünnt, um eine Konzentration von 0,243 mg/ml zu erhalten. Ein 13- μ l-Aliquot der Lösung mit 0,243 mg/ml, was 3,16 μ g Protein ergab, wurde auf die entsprechende Probenspur des IEF-Gels geladen. Kontrollen umfassten IEF-Standards mit einem pI-Wert von 3,6-9,3 (Sigma, Bestell-Nr. I-3018).

[0173] Es wurde eine Standardkurve erstellt, indem die durchschnittliche relative Distanzwanderung von acht IEF-Standards gegen den bekannten pI-Wert jedes dieser Standardproteine aufgetragen wurde. Die lineare Regressionsanpassung dieser Daten ergab eine negative Steigung von 0,03459 und einen Achsenschnittpunkt von 8,91857. Der R^2 -Wert der Anpassung betrug 0,99206.

[0174] Tabelle 6 enthält die mittleren Distanzen, über die die sechs IEF-Standards und LDP-02/3A9/Lot#1 wanderten. In der Tabelle sind auch die für LDP-02/3A9/Lot#1 berechneten pI-Werte gezeigt.

[0175] Anhand der linearen Regressionsparameter der Standardkurve wurden die genäherten pI-Werte der fünf Banden für LDP-02/3A9/Lot#1 auf 7,88, 7,95, 8,09, 8,26, und 8,43 berechnet, wobei die Hauptspitze einen pI-Wert von 8,09 aufwies (Tabelle 6). Der pI-Wert dieser Hauptspitze stimmt gut mit einem auf Basis der primären Aminosäuresequenz vorhergesagten pI-Wert von 7,91 überein.

TABELLE 6

<u>Standard</u>	<u>Wanderungsdistanz*</u>	<u>pI¹</u>
Lectin	3,3 mm	8.8
Lectin	9,5 mm	8.6
Lectin	17,88 mm	8.2
Myoglobin	59,3 mm	6.8
Carboanhydrase I	74,0 mm	6.6
Carboanhydrase II	92,5 mm	5.9
β-Lactoglobulin A	105,8 mm	5.1
Trypsininhibitor	122,0 mm	4.6

<u>Probe</u>	<u>Wanderungsdistanz</u>	<u>pI¹</u>
LDP-02/3A9/Lot #1 (Bande 1)	14,0 mm	8.43
LDP-02/3A9/Lot #1 (Bande 2)	19,0 mm	8.26
LDP-02/3A9/Lot #1 (Bande 3)	24,0 mm	8.09
LDP-02/3A9/Lot #1 (Bande 4)	28,0 mm	7.95
LDP-02/3A9/Lot #1 (Bande 5)	30,0 mm	7.88

* Mittelwert

¹ Auf Basis der Standardkurve (pI-Wert gegenüber Wanderungsdistanz), in der: Proben-pI = Achsenschnittpunkt - Steigung (Probenwanderungsdistanz).

4. Analyse der Aminosäurezusammensetzung

[0176] Die Analyse der Aminosäurezusammensetzung diente der Bestimmung des Proteingehaltes und der Aminosäurezusammensetzung von LDP-02/3A9/Lot#1 und zur Bestätigung der Identität.

[0177] Zunächst wurden 45-µl-Aliquots in dreifacher Ausführung für Hydrolyse entnommen. Hydrolyse wurde bei 165°C für 60 Minuten mit 6 N HCl-Dämpfen durchgeführt. Als Kontrolle enthielt das Hydrolysegefäß ein Standardprotein, das gleichzeitig mit LDP-02/3A9/Lot#1 hydrolysiert wurde. Außerdem wurden Aminosäurestandards vor und nach der Analyse von LDP-02/3A9/Lot#1 chromatographiert. Kontrollen umfassen Rinder-serumalbumin (Tektagen Solution Control:310:197A) als Standardprotein und eine Aminosäurehydrolysat-Mischung (Tektagen Solution Control:310:199A) als Aminosäurestandard.

[0178] Das Testverfahren verwendete eine Analyse des resuspendierten Proteinhydrolysates oder der Lösung mit freien Aminosäuren durch Ionenaustausch-HPLC mit Ninhydrinreaktion nach der Säule und Absorptionsüberwachung bei zwei Wellenlängen. Die Absorption bei beiden Wellenlängen wurde durch Vergleich mit einer Kalibrationstabelle quantifiziert, die durch Analyse von Aminosäurestandards in dreifacher Ausführung erhalten wurde.

[0179] Die Aminosäurezusammensetzung ist in Tabelle 7 angegeben. Die Proteinkonzentration von LDP-02/3A9/Lot#1 wurde auf 0,709 mg/ml bestimmt. Nach Korrektur wegen mangelnder Quantifizierung von W und C wurde die Proteinkonzentration auf 0,740 mg/ml korrigiert. Die Daten und die entsprechenden Berechnungen sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

[0180] Für LDP-02/3A9/Lot#1 wurde ein einzelner Hydrolysezeitpunkt (60 Min.) bei 165°C unter Anwendung von 6 N HCl-Dämpfen durchgeführt. Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurden Korrekturfaktoren angewandt, die aus dem Standardprotein (BSA) abgeleitet wurden.

[0181] Unter diesen Verfahrensbedingungen sind die Molprozentwerte, die für Prolin erhalten wurden (Tabelle 7), aufgrund des Vorhandenseins einer koeluerenden Cysteinspitze möglicherweise leicht erhöht. Entsprechend ist die Genauigkeit der Prolinquantifizierung probenabhängig und basiert auf der Menge an Cystein, die in den Probenhydrolysaten vorhanden ist. Für diese Analyse wurde der Prolingehalt mit einem von BSA abgeleiteten Korrekturfaktor korrigiert (Tabelle 8). Die Genauigkeit dieser Korrektur ist probenabhängig und basiert auf den relativen Mengen von Cystein in BSA (6,0%) und in der Probe.

[0182] Die auf Basis der Nukleotidsequenz der schweren und leichten Ketten vorhergesagte Aminosäurezusammensetzung von LDP-02 als relative Prozentanteile (Häufigkeit oder Molprozent) (Vorhergesagter Prozentanteil in %), und die tatsächlichen Ergebnisse der Aminosäureanalyse (Tatsächlicher Prozentanteil in %) sind in Tabelle 9 angegeben. Der Vergleich der vorhergesagten Werte mit den tatsächlichen Werten zeigt eine gute Korrelation, außer für Prolin, welches, wie oben beschrieben, wahrscheinlich aufgrund einer koeluerenden Cysteinspitze starke Artefakte produziert.

TABELLE 7

Probe:	LDP-02/3A9/LOT #1 ohne Korrektur	LDP-02/3A9/LOT #1 mit von BSA abgeleiteten Korrekturfaktoren	LDP-02/3A9/LOT #1 mit Korrektur auf W/C ¹ und von BSA abgeleitete Faktoren
AA	% Mol	% Mol	% Mol
N/D	9,1	9,0	8,6
T	6,5	7,5	7,2
S	9,2	13,3	12,7
Q/E	11,4	11,3	10,8
P	8,2	9,8	9,4
G	7,8	7,4	7,1
A	5,9	5,8	5,6
V	10,2	9,5	9,1
M	0,3	0,7	0,7

Probe:	LDP-02/3A9/LOT #1 ohne Korrektur	LDP-02/3A9/LOT #1 mit von abgeleiteten Korrekturfaktoren	LDP-02/3A9/LOT #1 mit Korrektur auf W/C ¹ und von BSA abgeleitete Faktoren
I	2,5	2,6	2,5
L	8,2	7,9	7,6
Y	5,2	5,0	4,8
F	3,4	3,4	3,3
H	2,2	2,2	2,1
K	7,0	6,9	6,6
R	2,9	2,9	2,8
GESAMT	100		

¹ - Korrelationsfaktor ist 0,958, der auf dem W- und C-Gehalt von 1,8% bzw. 2,4% beruht.

TABELLE 8 Bestimmung des Proteingehaltes

AA	Mittelwert der Menge in nmol	² Korrekturfaktor	Korrigierte Menge in nmol	Rest- in MW	Gefundene Menge (ng)
N/D	5,954	0,991	5,900	115,1	679
T	4,243	1,156	4,905	101,1	496
S	6,054	1,448	8,766	87,1	764
Q/E	7,436	0,991	7,369	128,1	944
P	5,365	0,830	4,453	97,1	432
G	5,080	0,951	4,831	57,1	276
A	3,884	0,983	3,818	71,1	271
V	6,681	0,930	6,213	99,1	616
M	0,221	2,433	0,538	131,2	71
I	1,606	1,036	1,664	113,2	188
L	5,379	0,961	5,169	113,2	585
Y	3,374	0,954	3,219	163,2	525

AA	Mittelwert der Menge in nmol	² Korrekturfaktor	Korrigierte Menge in nmol	Rest- in MW	Gefundene Menge (ng)
F	2,229	0,992	2,211	147,2	325
H	1,442	0,981	1,415	137,2	194
K	4,616	0,984	5,542	125,2	582
R	1,922	1,005	1,392	156,2	302
Auf die Säule injizierte Gesamtmenge (ng) :					7250
Rekonstitutionsvolumen (µl):					220
³ Hydrolysierte Gesamtmenge (ng):					31900
Hydrolysierte Gesamtmenge (µg):					31,9
Originalprobenvolumen (µl):					45
Volumen der verdünnten Probe (µl):					45
Aliquotwert für Hydrolyse (µl):					45
Proteinkonzentration (mg/ml):					0,709
Proteinkonzentration (mg/ml) nach Korrektur für W/C:					0,740

¹ Proteingehalt nicht auf Cystein und Tryptophan korrigiert.

² Auf jede festgestellte Aminosäure wurde ein von BSA abgeleiteter Korrekturfaktor angewandt.

³ Hydrolysierte Gesamtmenge in ng = (Injizierte Gesamtmenge in ng x Rekonstitutionsvolumen)/Injektionsvolumen (50 µl).

TABELLE 9 Aminosäurezusammensetzung

Aminosäuresymbol	Aminosäure	Nummer	Vorhergesagter Prozentanteil (%)	Tatsächlicher Anteil (%)
A	Ala	68	5,06	5,6
C	Cys	32	2,38	---
D	Asp	56	4,17	---

Aminosäuresymbol	Aminosäure	Nummer	Vorhergesagter Prozentanteil (%)	Tatsächlicher Anteil (%)
E	Glu	68	5,06	---
F	Phe	40	2,98	3,3
G	Gly	90	6,70	7,1
H	His	28	2,08	2,1
I	Ile	30	2,23	2,5
K	Lys	96	7,14	6,6
L	Leu	98	7,29	7,6
M	Met	10	0,74	0,7
N	Asn	50	3,72	---
P	Pro	94	6,99	9,4
Q	Gln	64	4,76	---
R	Arg	36	2,68	2,8
S	Ser	170	12,65	12,7
T	Thr	100	7,44	7,2
V	Val	126	9,38	9,1
W	Trp	24	6,98	---
Y	Tyr	64	4,76	4,8
N/D	Asn/Asp	106	7,89	8,6
Q/E	Gln/Glu	132	9,82	10,8

5. MALDI-TOF-MS-Analyse

[0183] LDP-02/3A9/Lot#1 wurde mit MALDI-TOF-MS analysiert, um das Molekulargewicht zu bestimmen. Es wurde eine Hauptspitze festgestellt, deren Masse bei 149.808 Da zentriert war. Die bei 74.927 Da zentrierte Spitze stellte das +2-Ion der in der Hauptspitze gefundenen Art dar. Die Masse von +2-Ionen ist nicht genau die Hälfte der M + H-Ionen; diese geringfügige Diskrepanz wird wahrscheinlich durch experimentelle Ungenauigkeit verursacht, welche innerhalb von +/-0,2% des Messwertes liegt.

[0184] Auf der Basis der vorhergesagten primären Sequenz des Antikörpers sollte die erwartete molekulare Masse 147.154 Da betragen. Die Massedifferenz von 2.654 Da zwischen der beobachteten und vorhergesagten molekularen Masse von IgG lässt sich höchstwahrscheinlich einer Glykosylierung des Moleküls zuschreiben. Diese beobachtete Differenz würde einem Glykosylierungsgrad von etwa 1,8% entsprechen.

B. Affinität

[0185] Zuerst wurde anhand einer Durchflusszytometrie von humanen HUT-78-Zellen eine Titration von LDP-02/3A9/Lot#1 und murinem ACT-1 (Lot#2) durchgeführt. In Kürze wurden $1,0 \times 10^6$ HUT-78-Zellen für 20

Minuten bei 4°C in einem Volumen von 100 µl von biotinyliertem murinem ACT-1 (Lot#2), biotinyliertem murinem IgG1 (Lot#1, hergestellt bei LeukoSite, Inc.), biotinyliertem LDP-02/3A9/Lot#1 oder biotinyliertem humanem IgG (Jackson ImmunoResearch, Avondale, PA; Lot 25794) suspendiert, woraufhin der Antikörper entfernt wurde. Sofern nicht anders angegeben, wurde alle Reagenzien in 0,15 M PBS/1,0% FKS/0,1% Natriumazid verdünnt. Die variierenden Konzentrationen für beide Antikörper umfassten 30 µg/ml (nur muriner ACT-1), 15 µg/ml, 7,5 µg/ml und anschließende 1:10-Verdünnungen von jeder Konzentration. Nach dem Entfernen des primären Antikörpers wurden die Zellen in 100 µl 1:200 verdünntem Streptavidin-Phycoerythrin (Dako Corp., Carpinteria, CA, USA) suspendiert. Nach dem Waschen in 200 ml PBS wurden die Zellen in 0,5 ml PBS/1% Formalin resuspendiert und bis zur Analyse gekühlt. Proben wurden auf einem FACScan (Becton Dickinson Corp., San Jose, CA) unter Verwendung eines 488-nm-Lasers zur Anregung von Phycoerythrin analysiert. Von jeder Probe wurden mindestens 10.000 Zellen analysiert, und es wurde die halbmaximale mittlere Kanalfluoreszenz (Mean Channel Fluorescence, MCF) berechnet. Alle Proben wurden in doppelter Ausführung analysiert.

[0186] Diese Titrationsstudien zeigten, dass bei Konzentrationen von etwa 1,0 µg/ml sowohl bei Verwendung von murinem ACT-1 als auch von LDP-02/3A9/Lot#1 fast maximale Fluoreszenz erreicht wurde ([Fig. 15](#)). Die halbmaximale mittlere Kanalfluoreszenz (Mean Channel Fluorescence, MCF) wurde bei LDP-02 bei niedrigeren Konzentrationen als bei murinem ACT-1 erhielt (0,1 µg/ml für biotinylierten murinen ACT-1-Lot#2 bzw. 0,02 µg/ml für LDP-02/3A9/Lot#).

[0187] Eine relative Bestimmung der Affinität (und Spezifität) wurde durch Durchflusszytometrie und kreuz-kompetitive Bindung von LDP-02 und dem murinen Act-1-Antikörper und umgekehrt mit humanen HuT-78-Zellen durchgeführt. In Kürze wurden $1,0 \times 10^6$ HuT-78-Zellen für 20 Minuten bei 4°C mit 100 µl des biotinylierten murinen Act-1 (Lot#2) bei 0,1 µg/ml, mit verschiedenen Konzentrationen von unkonjugiertem 1° HUM ACT-1 oder unkonjugiertem murinem Act-1 inkubiert, woraufhin der Antikörper entfernt wurde. In einem separaten Experiment wurden 100 µl biotinylierter LDP-02/3A9/Lot#1 bei 0,02 µg/ml mit verschiedenen Konzentrationen von unkonjugiertem murinem ACT-1 (Lot#2) und unkonjugiertem LDP-02/3A9/Lot#1 verwendet. Die konstant gehaltene Konzentration an biotinyliertem Antikörper entsprach den Konzentrationen, die unter identischen Bedingungen zu einer halbmaximalen mittleren Kanalfluoreszenz (MCF) auf HUT 78-Zellen führte, wie oben gezeigt. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Reagenzien in 0,15 M PBS/1,0% FKS/0,1% Natriumazid verdünnt. Die verschiedenen Konzentrationen für beide Antikörper lagen im Bereich halblogarithmischer Stufen von $2,0 \times 10^{-6}$ M bis $5,0 \times 10^{-11}$ M. Nach dem Entfernen des primären Antikörpers wurden die Zellen dann in 100 µl 1:2000 verdünntem Streptavidin-Phycoerythrin (Dako Corp., Carpinteria, CA, USA) suspendiert. Nach dem Waschen in 200 µl PBS wurden die Zellen in 0,5 ml PBS/1% Formalin resuspendiert und bis zur Analyse gekühlt. Die Proben wurden auf einem FACScan (Becton Dickinson Corp., San Jose, CA, USA) unter Verwendung eines 488-nm-Lasers zur Anregung von Phycoerythrin analysiert. Für jede Probe wurden mindestens 10.000 Zellen analysiert und die MCF berechnet. Alle Proben wurden in doppelter Ausführung getestet. Der IC_{50} -Wert wurde als die Konzentration von unkonjugiertem Antikörper bestimmt, die eine Verringerung der MCF um 50% gegenüber dem biotinylierten homologen Antikörper produzierte.

[0188] Anhand von fünf unabhängigen Kreuzkompetitions-Experimenten mit LDP-02 (1° HUM ACT-1) und murinem ACT-1 wurde die Affinität geschätzt. Wenn biotinylierter muriner Act-1 als in dem Test konstant gehaltener Antikörper verwendet wurde, waren die mittleren IC_{50} -Werte (± 1 mittlere Standardabweichung) für LDP-02 ($5,43 \pm 0,86$ nM) statistisch niedriger als die für murinen ACT-1 ($7,94 \pm 1,17$ nM; $p=0,02$, zweiseitiger T-Test: zwei gepaarte Stichproben für Mittelwert), während irrelevantes humanes IgG1 oder murines IgG1 keinen kompetitiven Effekt hatten (alle Experimente sind in Tabelle 10 zusammengefasst; ein Experiment ist in [Fig. 16](#) gezeigt). Entsprechend war eine höhere Konzentration von unkonjugiertem murinem Act-1 als von LDP-02/3A9/Lot#1 erforderlich, um LDP-02 durch Konkurrenz von der Zellmembran von HuT 78-Zellen zu verdrängen ($IC_{50} = 6,3$ nM gegenüber 4,3 nM), wenn der im Test konstant gehaltene Antikörper biotinylierter LDP-02/3A9/Lot#1 war. In jedem Experiment hatte LDP-02 einen niedrigeren IC_{50} -Wert als muriner Act-1. Diese Ergebnisse zeigen, dass LDP-02 spezifisch für das von murinem Act-1 erkannte Epitop war, und dass seine Bindungsaffinität besser war als die des murinen Antikörpers.

TABELLE 10 Muriner ACT-1 und humanisierter ACT-1 (LDP-02) Affinitätsbestimmung

Experiment-Nr.	Antikörper	Lot #	IC ₅₀ (nM)
1	ACT-1 (murin)	2	7,57
2		2	10,95
3		2	6,02
4		2	4,91
5		2	10,24
		MITTELWERT	± 7,94 ±
		MITTLERE	1,17
		STANDARDABWEICHUNG	
1	LDP-02 (humanisiert)	7	4,34
2		7	6,13
3		8/9	4,71
4		8/9	3,53
5		8/9	8,44
		MITTELWERT	± 5,43 ±
		MITTLERE	0,86
		STANDARDABWEICHUNG	

p = 0,02

zweiseitiger t-Test: zwei gepaarte Stichproben für Mittelwerte

C. Kreuzreaktivität zwischen Arten

[0189] Die Kreuzreaktivität zwischen Arten wurde durchflusszytometrisch bestimmt. 100 µl von Blut, das unter Verwendung von EDTA als Gerinnungshemmer entweder von einem Menschen, Hund, von einer Katze, einem Meerschweinchen oder einer Ratte abgenommen wurde, in FACS-Röhrchen gegeben. Das Plasma wurde entfernt, und Blutpellets wurden dann in 100 µl biotinyliertem LDP-02/3A9/LOT#1, irrelevantem biotinyliertem humanem IgG (Jackson ImmunoResearch, Avondale, PA, USA), biotinyliertem murinem Act-1 Lot#2 oder irrelevantem biotinyliertem murinen IgG1 (Dako Corp., Carpinteria, CA, USA) in einer Konzentration von 15 µg/ml resuspendiert. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Reagenzien in 0,15 M PBS/1,0% FKS/0,1% Natriumazid verdünnt. Die Proben wurden 20 Minuten bei 4°C mit Antikörper inkubiert, woraufhin der Antikörper durch Waschen entfernt wurde. Die Zellen wurden dann für 20 Minuten bei 4°C mit 100 µl 1:200 verdünntem Streptavidin-Phycoerythrin (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL, USA) inkubiert. Rote Blutkörperchen wurden dann mit einem kommerziell erhältlichen Lysereagens (FACS Lysing Solution, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) nach dem Protokoll des Herstellers lysiert. Nach dem Waschen in PBS wurden die Zellen in 0,5 ml PBS/1% Formalin resuspendiert und bis zur Analyse gekühlt. Die Proben wurden auf einem

FACScan (Becton Dickinson Corp., San Jose, CA, USA) unter Verwendung eines 488-nm-Lasers zur Anregung von Phycoerythrin analysiert. Das Lymphozyten-Akquisitions-Gate wurde auf Vorwärts-Lichtstreuung (Forward Scatter) und 90-Grad-Seitwärtslichtstreuung gestellt. Von jeder Probe wurden 10.000 Zellen analysiert.

[0190] Biotinylierter LDP-02/3A9/Lot#1 erkannte eine Unterpopulation von humanen Lymphozyten mit einem heterogenen Färbemuster, ähnlich zu dem, das mit murinem Act-1 produziert wurde und anders als das Muster, das durch Färbung mit humanen und murinen Kontrollen gleichen Isotyps produziert wird. Darüber hinaus produzierten sowohl LDP-02/3A9/Lot#1 als auch muriner Act-1, wenn sie auf Lymphozyten von Hund oder Katze untersucht wurden, ein ähnliches heterogenes Färbemuster wie das, das unter Verwendung humaner Lymphozyten entstand. LDP-02/3A9/Lot#1 oder muriner ACT-1 erkannten unter diesen Bedingungen Lymphozyten von Ratte oder Meerschweinchen nicht.

D. C1q-Bindung

[0191] Das Potenzial von LPD-02 zur Bindung an die humane Komplementkomponente C1q wurde durchflusszytometrisch anhand einer zuvor beschriebenen Technik (Sims, M.J. et al., J. Immunol. 151: 2296-2308 (1993)) bestimmt. Humane periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) wurden durch standardmäßige Ficoll-Dichtentrennung isoliert. 375.000 Zellen wurden zuerst mit 10% normalem Kaninchenserum/PBS für 10 Minuten bei 4°C blockiert. Nach dem Entfernen durch Waschen wurden die Zellen für 20 Minuten bei 4°C mit 100 µl von (a) CAMPATH-1H (Therapeutic Antibody Center, Cambridge, GB), (b) humanem IgG1 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), (c) LDP-01 (ein Derivat des Anti-CD18-Antikörpers, der in WO 93/02191 (veröffentlicht am 4. Februar 1993) und Sims, M.J., et al., J. Immunol. 151(4): 2296-2308 (1993) beschrieben ist und der zwei Aminosäuresubstitutionen in der konstanten region der schweren Kette von IgG1 enthält (Leu²³⁵ → Ala²³⁵ und Gly²³⁷ → Ala²³⁷), auch bezeichnet als „FcRmut CD18“, Therapeutic Antibody Center, Cambridge, GB) oder mit (d) LDP-02 (1°C hum ACT-1 Lot#8/9) mit 10 µg/ml inkubiert. CAMPATH-1H diente als positiver Kontrollantikörper, während LDP-01 und humanes IgG1 als negative Kontrollantikörper verwendet wurden. Alle Reagenzien wurden in 2% BSA/PBS. Als zusätzliche negative Kontrolle wurde 2% BSA/PBS auch alleine zugegeben. Antikörper wurde anschließend durch Waschen entfernt, und die Zellen wurden für 30 Minuten bei 4°C in 50 µl humaner Komplementkomponente C1q (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) mit 10 µg/ml resuspendiert. Die Zellen wurden dann gewaschen und für 20 Minuten bei 4°C in 100 µl FITC-konjugiertem Antikörper Kaninchen-Anti-Human-C1q (Dako Corp., Carpinteria, CA, USA) mit 20 µg/ml inkubiert. Nach dem Waschen in 200 ml PBS wurden die Zellen in 0,5 ml PBS/1% Formalin resuspendiert und in bis zur Analyse gekühlt. Die Proben wurden auf einem FACScan (Becton Dickinson Corp., San Jose, CA, USA) unter Verwendung eines 488-nm-Lasers zur Anregung von Phycoerythrin analysiert. Von jeder Probe wurden mindestens 10.000 Zellen analysiert, und es wurde die mittlere Kanalfluoreszenz (Mean Channel Fluorescence, MCF) berechnet.

[0192] Humane PBMC, die mit CAMPATH-1H inkubiert wurden, banden humanes C1q, was zu einer signifikanten Verschiebung des MCF-Wertes führte, während die durch Inkubation von PBMC mit LDP-01, BSA oder humanem IgG1 hervorgerufenen Färbemuster alle ähnlich und von einer relativ geringen Hintergrundfärbung gekennzeichnet waren. Das Muster der Färbung, das durch Vorinkubation der PBMC mit LDP-02 produziert wurde, war identisch zu dem in diesen negativen Kontrollproben, was zeigt, dass LDP-02 C1q unter diesen Bedingungen nicht bindet.

E. Komplementvermittelte Lyse

[0193] Die Fähigkeit von LDP-02/3A9/Lot#1 zur Teilnahme an komplementvermittelter Zellyse wurde mit einem Protokoll untersucht, dass zuvor in Bindon, C.I., et al. (Transplantation, 40: 538-544 (1985)) beschrieben wurde. Heparinisiertes humanes Blut wurde aseptisch abgenommen und Plasma wurde gesammelt und sofort auf Eis gelegt. Periphere mononukleäre Zellen (PBMC) wurden durch Zentrifugation für 15 Minuten über einer Schicht Ficoll-Hypaque, Dichte 1,077 g/ml, isoliert und zweimal in Komplettmedium gewaschen, das aus RPMI 1640/10% FKS/100 E/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin/2,0 mM L-Glutamin bestand. 25 Millionen Zellen wurden dann bei 37°C für 1 Stunde in 150 µCi Natrium⁵¹chromat in steriler Salzlösung (E.I. du Pont de Nemours & Co. Inc., Wilmington, DE; USA) inkubiert. Die Zellen wurden zweimal in Medium gewaschen und bei 10⁶/ml resuspendiert. 50 µl der Suspension (5,0 × 10⁴ Zellen) wurden dann zu Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit U-förmigem Boden gegeben, die 100 µl von (a) CAMPATH-1H (Therapeutic Center, Cambridge, GB), (b) CAMPATH-1G (Therapeutic Center, Cambridge, GB), (c) humanes IgG1 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), (d) LDP-02/3A9/Lot#1 oder (e) LDP-01 (FcRmut CD18, Therapeutic Antibody Center, Cambridge, GB (siehe oben)) in Konzentrationen von 50, 25, 5, 2,5 und 0,5 µg/ml in Medium enthielten. CAMPATH-1-Antikörper wurde in dem Test als positiver Kontrollantikörper verwendet, während humanes IgG1 und LDP-01 als

Negativkontrollen verwendet wurden. Weitere Vertiefungen enthielten Zellen, die in 100 µl von 0,1% Triton-X-100 (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA) in Komplettmedium suspendiert waren. Mit Triton-X-100 inkubierte Zellen wurden verwendet, um die Gesamtfreisetzung zu messen, während Kontrollvertiefungen ohne Antikörper verwendet wurden, um die spontane Freisetzung zu messen. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden in jede Vertiefung 50 µl autologes Plasma als Komplementquelle gegeben, um eine Endkonzentration von 20% zu erhalten. Die Zellen wurden 45 Minuten bei 37°C inkubiert, dann bei 100 g für 2 Minuten zentrifugiert, und es wurden 100 µl der Überstände aufgefangen. Freigesetztes ^{51}Cr wurde in einem Gammazähler Cobra II (Packard Instruments, Downers Grove, IL, USA) gemessen. Alle Proben waren in doppelter Ausführung vorhanden. Die prozentuale spezifische Freisetzung von ^{51}Cr wurde anhand folgender Formel berechnet:

Spezifische Freisetzung = (Spontane Freisetzung im Test) $\times$ 100%/Gesamte spontane Freisetzung

[0194] Wie zuvor von Bindon et al. (Transplantation, 40: 538-544 (1985)) berichtet, induzierten sowohl CAMPATH-1H als auch CAMPATH-1G eine dosisabhängige komplementvermittelte Lyse humaner PBMC bis zu 35%. Wie erwartet, induzierten darüber hinaus die Kontrollen humanes IgG1 und LDP-01 (Fc-mut CD18) keine feststellbare Zelllyse. LDP-02 vermittelte bei keiner der untersuchten Konzentrationen von bis zu und einschließlich 25 µg/ml eine Zelllyse ([Fig. 17](#)).

F. Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC)

[0195] Humane CD3+-Blasten wurden als Zielzellen verwendet, um die Fähigkeit von LDP-02 zur Teilnahme an antikörperabhängiger zellvermittelter Zytotoxizität (ADCC) teilzunehmen. CD3+-Blasten wurden in Platten mit 24 Vertiefungen erzeugt, die mit dem Anti-CD3-Antikörper in einer Konzentration von 5 µg/ml, verdünnt in PBS, beschichtet waren. Humane periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) wurden durch 15-minütige Zentrifugation über einer Schicht Ficoll-Hypaque, Dichte 1,077 g/ml, isoliert und wie im vorigen Abschnitt beschrieben mit Komplettmedium gewaschen und resuspendiert. Anschließend wurden in jede Vertiefung der Platte mit 24 Vertiefungen 2 Millionen Zellen gegeben und bei 37°C, 5% CO₂ für 4 Tage inkubiert. Zellen wurden dann in eine Kulturflasche überführt und bei 37°C, 5% CO₂ in Medium mit humanem rekombinantem IL-2 (Genzyme Corp., Cambridge, MA, USA) mit einer Konzentration von 10 Einheiten/ml inkubiert. Nach dreitägiger Kultur wurden 10,0 $\times$ 10⁶ CD3+-Blasten anschließend bei 37°C für 45 Minuten in 150 µCi Natrium⁵¹chromat in steriler Salzlösung (E.I. du Pont de Nemours & Co. Inc., Wilmington, DE, USA; Lot#95M682) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in Komplettmedium wurden die Zellen zu einer Konzentration von 2 $\times$ 10⁵ Zellen/ml resuspendiert, und je 50 µl (10.000 Zellen) der Suspension wurden zu Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen mit U-förmigem Boden gegeben. Die Vertiefungen enthielten 50 µl CAMPATH-1H (Therapeutic Antibody Center, Cambridge, GB) oder LDP-02/3A9/Lot#1 in Endkonzentrationen von 50, 5, 2,5, 0,5, 0,25 oder 0,05 µg/ml in Medium. Die Zellen wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Antikörper inkubiert, woraufhin in jede Vertiefung 0,5 $\times$ 10⁶ frisch isolierte PBMC (Ficoll-Hypaque-Gradient, 2 Waschschrte in Komplettmedium bei 37°C) von einem anderen Spender als Effektorzellen gegeben wurden (Verhältnis von Effektor zu Zielzelle: 50:1). In weitere Vertiefungen wurden 100 µl 5% Triton-X-100 in Medium (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA) gegeben. Die mit Triton-X-100 inkubierten Zellen wurden verwendet, um die Gesamtfreisetzung zu messen, während Kontrollen ohne Antikörper und Effektorzellen verwendet wurden, um die spontane Freisetzung von Radioaktivität zu messen. Die Zellen wurden bei 100 g für 2 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und 20 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert, woraufhin Zellen in eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen mit V-förmigem Boden überführt wurden und bei Raumtemperatur abzentrifugiert (pelletiert) wurden. Es wurde 100 µl Überstand abgenommen, und die freigesetzte Radioaktivität wurde in einem Gammazähler Cobra II (Packard Instruments, Downers Grove, IL, USA) gemessen. Alle Proben wurden in doppelter Ausführung gemessen. Die prozentuale spezifische Freisetzung von ^{51}Cr wurde anhand folgender Formel berechnet:

Spezifische Freisetzung = (Spontane Freisetzung im Test) $\times$ 100%/Gesamte spontane Freisetzung

[0196] Wie zuvor von Sims, M.J. et al., J. Immunol., 151(4): 2296-2308 (1993) gezeigt, nahm CAMPATH-1H in dosisabhängiger Weise an der ADCC teil und rief in Konzentrationen von 5,0 µg/ml eine spezifische ^{51}Cr -Freisetzung von rund 30% hervor. In Vertiefungen, die LDP-02 enthielten, wurde bei keiner der untersuchten Konzentrationen eine spezifische Freisetzung festgestellt.

G. Hemmung der Adhäsion an MAdCAM-1

[0197] Die Fähigkeit von LDP-02 zur Hemmung der Bindung von α4β7 an MAdCAM-1 wurde mit fluoreszierend markierten α4β7+-RPMI-8866-Zellen (einem humanen B-Zelllymphom) und einer MAdCAM-1-Chimäre

bestimmt, welche die gesamte extrazelluläre Domäne von humanem MAdCAM-1, fusioniert mit der Fc-Region eines humanen IgG1, umfasste (eine konstante Region, die aus dem gleichen Konstrukt stammte, das auch zur Herstellung der konstanten Region von Fc-mutiertem LDP-02 verwendet wurde).

I. Konstruktion einer MAdCAM-IgG-Chimäre

[0198] Ein humaner MAdCAM-1-Klon mit der Bezeichnung pcDhuMAd4 (Klon-4-cDNA in pCDNA3; Shyjan, A.M. et al., J. Immunol., 156: 2851-2857 (1996), dessen Lehren hierin in Gänze durch Bezugnahme enthalten sind, wurde als Vorlage für die PCR-Amplifikation extrazellulärer Regionen von humanem MAdCAM-1 verwendet, die mit der konstanten Region von humanem IgG1 fusioniert werden sollten, wie beschrieben in der Internationalen Anmeldung Nr. PCT/US96/02153 (WO 96/24673), beantragt am 12. Februar 1996, bei der es sich um eine Teilfortsetzung (Continuation-in-part) von US-Seriennr. 08/523,004 handelt, beantragt am 1. September 1995, bei der es sich um eine Teilfortsetzung (Continuation-in-part) von US-Seriennr. 08/386,857, beantragt am 10. Februar 1995, handelt. Zur Konstruktion der MAdCAM-IgG-Chimäre wurde Primer HUMADIG4/2 (SEQ ID NO: 62), der das 5'-Ende der Kodierungssequenz des humanen mAdCAM-1 (ATG-Codon, fett) enthält, synthetisiert:

HindIII

5'-GGAAGCTTCCACCATGGATTTCGGACTGGCCC-3'

[0199] Dieser 5'-Primer wurde in Verbindung mit einem 3'-Primer mit der Bezeichnung HUMADIG3 verwendet, um eine Region zu amplifizieren, welche die gesamte extrazelluläre Domäne von humanem MAdCAM-1 kodiert. Der 3'-Primer HUMADIG3 (SEQ ID NO: 63) hat folgende Sequenz:

SpeI

5'-GGACTAGTGGTTTGGACGAGCCTGTTG-3'

[0200] Die Primer wurden, wie gezeigt, mit einer 5'-HindIII-Schnittstelle oder 3'-SpeI-Schnittstellen entworfen. Diese Primer wurden zur PCR-Amplifikation eines MAdCAM-Fragmentes unter Verwendung eines PCR-Optimierungskits von Invitrogen (San Diego, CA, USA) verwendet. Die PCR-Produkte wurden mit den Enzymen HindIII und SpeI verdaut, um Enden für die Klonierung zu erzeugen, und wurden durch Gelelektrophorese mit dem DNA-Isolierungssystem Glassmax (Gibco, Bethesda, MD, USA) gereinigt.

[0201] Ein ~1-kb-Fragment, welches die Regionen CH1, H (Hinge), CH2 und CH3 umfasste, wurde durch Verdau mit SpeI und EcoRI aus einem Konstrukt ausgeschnitten, das eine schwere Kette von humanem Immunglobulin γ 1 mit einer Fc-mutierten humanen konstanten Region aufweist. Die humane konstante Region in diesem Konstrukt entspricht der, die durch PCR-Amplifikation der schweren Kette von CAMPATH-1H erhalten wurde (Reichmann, L. et al., Nature, 322: 323-327 (1988)), wie beschrieben von Sims, M.J. et al. (J. Immunol., 151: 2296-2308 (1993)) und Waldmann et al. (WO 93/02191, 4. Februar 1993 (Seite 23)). Die Mutationen in der konstanten Region dieses Konstruktes (Leu²³⁵ Ala²³⁵ und Gly²³⁷ → Ala²³⁷) wurden entworfen, um die Bindung an humane Fc γ -Rezeptoren zu reduzieren, und wurden durch oligonukleotidgerichtete Mutagenese hergestellt. Das MAdCAM-Ig-Fusionsprodukt enthielt also das SpeI-EcoRI-Fragment der konstanten Region, beschrieben von Sims et al. (J. Immunol., 151: 2296-2308 (1993)) und Waldmann et al. (WO 93/02191), abgesehen von der Einführung der Mutationen Leu²³⁵ → Ala²³⁵ und Gly²³⁷ → Ala²³⁷.

[0202] Das 1-kb-SpeI-EcoRI-Fragment, das die Fc-mutierte konstante Region von IgG1 kodierte, wurde durch Gelelektrophorese mit dem DNA-Isolierungssystem Glassmax (Gibco, Bethesda, MD, USA) gereinigt. Dieses Fragment der konstanten Region und das HindIII-SpeI-Fragment, welches die gesamte extrazelluläre Domäne von MAdCAM enthielt, wurden im Rahmen einer Drei-Wege-Ligation (Three-Way-Ligation) in Vektor pEE12 ligiert (Stephens, P.L. und M.L. Cockett, Nucl. Acids Res., 17: 7110 (1989) und Bebbington, C.R. and C.C.G. Hentschel, 1987, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells, (Academic Press, N.Y.)), welcher mit HindIII und EcoRI verdaut wurde. Es wurden Transformanten des Bakterienstammes DH10B erhalten. Es wurden Kolonien gezüchtet und Mini-Plasmid-Präparationen durch Kartierung mittels Restriktionsenzymverdau analysiert. Ein Konstrukt, das ein Fusionsprotein kodiert, welches die gesamte extrazelluläre Domäne von MAdCAM-1 (Konstrukt HuMAdlg21) in Fusion mit der Fc-mutierten konstanten Region von IgG1 umfasst, wurde über den gesamten MAdCAM-1-Anteil hinweg sequenziert, was die ordnungsgemäße Fusion von Segmenten und Abwesenheit PCR-induzierter Mutationen bestätigte. Die Chimäre wurde in NSO-Zellen produziert und durch Protein-A-Standardaffinitätschromatographie gereinigt.

2. Adhäsionsassay

[0203] Eine stark bindende Flachboden-Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (Costar) wurde 1 Stunde lang bei 37°C mit 50 µl der MAdCAM-1-Chimäre beschichtet, welche in Carbonatpuffer, pH 9,5, auf 2,5 µg/ml verdünnt war. Die Vertiefungen wurden anschließend einmal mit Waschpuffer (50 mM Tris HCl, 0,14 M NaCl, 1 mM MnCl_2 , pH 7,2) gewaschen, wobei eine automatische Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) verwendet wurde, und 1,5 Stunden bei 37°C mit 100 µl 10%igem in PBS verdünntem fetalem Rinderserum (FRS) blockiert.

[0204] RPMI-8866-Zellen (eine humane B-Zell-Lymphomlinie, die $\alpha 4\beta 7$ (und nicht $\alpha 4\beta 1$) exprimiert (Erle, D.J., et al., J. Immunol., 153:517 (1994)); ein Geschenk von D. Erle) wurden zunächst in 20 ml PBS (4°C) gewaschen und mit $4,0 \times 10^6$ Zellen/ml in PBS resuspendiert. BCECF (2',7'-Bis-(2-carboxyethyl)-5-(6)-carboxyfluorescein, Acetoxymethylester; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) wurde auf 50 µg/ml in DMSO rekonstituiert und bis zu einer Endkonzentration von 1:500 zu der Zellsuspension gegeben. Nach Inkubation für 30 Minuten bei 37°C wurden die Zellen in Assaypuffer (HBSS mit 2% fetalem Rinderserum, 25 mM HEPES, Penicillin/Streptomycin, pH 7,2) gewaschen, und in jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen mit V-förmigem Boden wurden 50.000 Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 100 µl (a) murinem Act-1, (b) murinem IgG1 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), (c) LDP-02/3A9/Lot#1 oder (d) humanem IgG1 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) in Konzentrationen von 15,0 bis 0,00075 µg/ml in Assaypuffer resuspendiert. Die mit der MAdCAM-1-Chimäre beschichtete Platte wurde gewaschen, um Blockierungspuffer zu entfernen, und dann wurden diese fluoreszenzmarkierten RPMI-8866-Zellen in jede Vertiefung überführt. Die in Aluminiumfolie verpackte Platte wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einen Plattform-Schüttler (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ, USA) bei 40 Umdrehungen pro Minute gegeben. Ungebundene Zellen wurden durch einen einmaligen Waschschrift entfernt, und anschließend wurde mit einem Fluorescence Concentrator Analyzer (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME) die Fluoreszenz vor und nach dem Waschen gemessen (Anregung bei 485 nm, Messung bei 535 nm). Der Prozentanteil gebundener Zellen in jeder Vertiefung wurde aus Relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE) anhand folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ gebundener Zellen} = \frac{\text{RFE vor Waschen}}{\text{RFE nach Waschen}} \times 100$$

[0205] Sowohl LDP-02 als auch muriner Act-1 hemmten die Adhäsion von RPMI-8866-Zellen an humanes MAdCAM in dosisabhängiger Weise ([Fig. 18A](#) bis [Fig. 18B](#)). Die Konzentrationen, welche die Adhäsion um 50% hemmten (IC_{50}) waren für murinen Act-1 (0,0018 µg/ml) und LDP-02 (0,0014 µg/ml) relativ ähnlich. LDP-02 bewirkte also eine funktionelle Hemmung der $\alpha 4\beta 7$ -vermittelten Adhäsion an MAdCAM-1 mindestens so effektiv wie muriner Act-1.

Beispiel 5 Weitere humanisierte Antikörper

[0206] Wie oben beschrieben, können mehrere Varianten der in Beispiel 2 entworfenen umgeformten Antikörper hergestellt werden, um die Affinität zu verbessern und/oder die Antigenität des umgeformten Antikörpers zu verringern. Solche Konstrukte umfassen, jedoch nicht ausschließlich, solche mit einer oder mehreren der folgenden Mutationen: M4V-Mutation in der leichten Kette, R38K-Mutation in der schweren Kette, A40R-Mutation in der schweren Kette und I73T-Rückmutation in der schweren Kette. Mutanten können individuell (z. B. eine Mutation in einer Kette) oder in verschiedenen Kombinationen hergestellt werden.

[0207] Beispielsweise zeigt [Fig. 19](#) die Ergebnisse der HuT 78-Färbung bei Verwendung des umgeformten Antikörpers (entworfen in Beispiel 2) oder eines Derivates mit einer zusätzlichen Mutation in der leichten Kette (MV4) und zwei zusätzliche Mutationen in der schweren Kette (R38K, A40R). Diese beiden Antikörper zeigen ähnliche Färbemuster auf HuT 78-Zellen ([Fig. 19](#)). Die Mutationen wurden hergestellt, indem die Nukleinsäuresequenz mithilfe eines Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit (Clontech) nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll verändert wurde. Mutationen der variablen Region der schweren und der leichten Ketten wurden mit in pCR-Script™ klonierten variablen Fragmenten durchgeführt. Als Trans-Oligo wurde das Trans-Oligo Scal/Stul (Clontech) verwendet. Die Sequenz der mutagenen Oligos (SEQ ID NOS: 38-40) war wie folgt:

H/R38K (SEQ ID NO:38):

5'-C TGG CCA ACG

H/I73T (SEQ ID NO:39):

5'-CAC ATT GAC TGT AGA CAC TTC CGC TAG CAC AGC C

L/M4V (SEQ ID NO:40):

5'-CCG GAG GTG ATG TTG TGG TGA CTC

[0208] Alle anderen Manipulationen, einschließlich Subklonieren in die Expressionsvektoren pEE6hCMV-B und pEE12 und Konstruktion von Expressionsplasmiden, welche die Gene der schweren und der leichten Kette enthielten, entsprachen der Beschreibung für den primären umgeformten Antikörper. Auch transiente Transfektionen und Zellfärbung wurden durchgeführt, wie für den primären umgeformten Antikörper beschrieben.

Patentansprüche

1. Humanisiertes Immunglobulin oder Antigen-bindendes Fragment hiervon, das selektiv an $\alpha\beta 7$ -Integrin bindet, wobei das Immunglobulin oder Fragment eine Antigen-bindende Region nicht humanen Ursprungs und zumindest einen Anteil eines Immunglobulins humanen Ursprungs umfasst.

2. Humanisiertes Immunglobulin oder Antigen-bindendes Fragment nach Anspruch 1, wobei der Anteil des Immunglobulins humanen Ursprungs von einer humanen konstanten Region abgeleitet ist.

3. Humanisiertes Immunglobulin oder Antigen-bindendes Fragment nach Anspruch 2, wobei die humane konstante Region vom Gamma-Typ ist.

4. Humanisiertes Immunglobulin oder Antigen-bindendes Fragment nach einem der Ansprüche 1-3, wobei die Antigen-bindende Region von Nagetier-Ursprung ist.

5. Humanisiertes Immunglobulin oder Antigen-bindendes Fragment nach Anspruch 4, wobei die Antigen-bindende Region von einem murinen monoklonalen Act-1 Antikörper abgeleitet ist.

6. Humanisiertes Immunglobulin oder Antigen-bindendes Fragment nach Anspruch 1, wobei die Antigen-bindende Region eine hypervariable Region (CDR=complementarity determining region) von Nagetier-Ursprung umfasst und der Anteil des Immunglobulins humanen Ursprungs aus einer humanen Gerüstregion abgeleitet ist.

7. Humanisiertes Immunglobulin oder Antigen-bindendes Fragment nach Anspruch 6, wobei die hypervariable Region von einem murinen monoklonalen Act-1 Antikörper abgeleitet ist.

8. Humanisiertes Immunglobulin oder Antigen-bindendes Fragment nach Anspruch 1, wobei die Antigen-bindende Region nicht humanen Ursprungs zumindest eine von drei hypervariablen Regionen (CDR1, CDR2 und CDR3) einer variablen Region der leichten Kette und zumindest eine von drei hypervariablen Regionen (CDR1, CDR2 und CDR3) einer variablen Region der schweren Kette umfasst, wobei die hypervariablen Regionen die unten dargestellten Aminosäuresequenzen aufweisen:

Leichte Kette:

CDR1 Aminosäuren 44-59 von SEQ ID NO: 12

CDR2 Aminosäuren 75-81 von SEQ ID NO: 12

CDR3 Aminosäuren 114-122 von SEQ ID NO: 12

Schwere Kette:

CDR1 Aminosäuren 50-54 von SEQ ID NO: 15

CDR2 Aminosäuren 69-85 von SEQ ID NO: 15

CDR3 Aminosäuren 118-129 von SEQ ID NO: 15.

9. Humanisiertes Immunglobulin oder Antigen-bindendes Fragment nach Anspruch 8, wobei das Immunglobulin oder das Antigen-bindende Fragment eine leichte Kette und eine schwere Kette umfasst, wobei die leichte Kette hypervariable Regionen (CDR1, CDR2 und CDR3) mit den unten dargelegten Aminosäuresequenzen umfasst:

Leichte Kette:

CDR1 Aminosäuren 44-59 von SEQ ID NO: 12

CDR2 Aminosäuren 75-81 von SEQ ID NO: 12

CDR3 Aminosäuren 114-122 von SEQ ID NO: 12; und

eine Gerüstregion, die von der variablen Region einer leichten Kette humanen Ursprungs abgeleitet ist; wobei die schwere Kette hypervariable Regionen (CDR1, CDR2 und CDR3) umfasst, die die unten dargelegten Aminosäuresequenzen aufweisen: Schwere Kette:

CDR1 Aminosäuren 50-54 von SEQ ID NO: 15

CDR2 Aminosäuren 69-85 von SEQ ID NO: 15

CDR3 Aminosäuren 118-129 von SEQ ID NO: 15; und

eine Gerüstregion, die von der variablen Region einer schweren Kette humanen Ursprungs abgeleitet ist.

10. Humanisiertes Immunglobulin oder Antigen-bindendes Fragment nach Anspruch 9, wobei die variable Region einer leichten Kette humanen Ursprungs die variable Region der leichten Kette des GM607'CL Antikörpers (SEQ ID NO: 8) ist.

11. Humanisiertes Immunglobulin oder Antigen-bindendes Fragment nach Anspruch 9 oder Anspruch 10, wobei die variable Region einer schweren Kette humanen Ursprungs die variable Region des humanen 21/28'CL Antikörpers (SEQ ID Nr. 10) ist.

12. Humanisiertes Immunglobulin oder Antigen-bindendes Fragment nach Anspruch 8 oder Anspruch 9, wobei die leichte Kette die variable Region von SEQ ID NO: 21 umfasst und die schwere Kette die variable Region von SEQ ID NO: 19 umfasst.

13. Humanisiertes Immunglobulin oder Antigen-bindendes Fragment nach einem der Ansprüche 8-12, wobei das Immunglobulin oder das Antigen-bindende Fragment mit einem murinen monoklonalen Act-1 Antikörper um die Bindung an $\alpha\beta 7$ -Integrin konkurrieren kann.

14. Humanisiertes Immunglobulin oder Antigen-bindendes Fragment nach einem der Ansprüche 8-13, wobei das Immunglobulin oder das Antigen-bindende Fragment die Epitopspezifität von murinem monoklonalem Act-1 Antikörper aufweist.

15. Leichte Kette des humanisierten Immunglobulins oder Fragment hiervon des humanisierten Antikörpers oder Antigen-bindendes Fragment nach Anspruch 1, wobei die leichte Kette oder das Fragment eine Aminosäuresequenz aufweist, die zumindest einen funktionellen Anteil der variablen Region der leichten Kette-Aminosäuresequenz, dargestellt in [Fig. 7](#) (SEQ ID NO: 12), umfasst.

16. Leichte Kette des humanisierten Immunglobulins oder Fragment nach Anspruch 15, wobei die leichte Kette oder das Fragment eine Aminosäuresequenz aufweist, die die Signalpeptidsequenz umfasst, dargestellt in [Fig. 7](#) (SEQ ID NO: 12) und zumindest einen funktionellen Anteil der leichten Kette-Aminosäuresequenz, dargestellt in [Fig. 7](#) (SEQ ID NO: 12).

17. Leichte Kette eines humanisierten Immunglobulins oder Fragment hiervon, wobei die leichte Kette des humanisierten Immunglobulins oder das Fragment hypervariable Regionen (CDR1, CDR2 und CDR3) der leichten Kette des murinen monoklonalen Act-1 Antikörpers und eine Gerüstregion der leichten Kette humanen Ursprungs umfasst, wobei die hypervariablen Regionen die unten dargestellten Aminosäuresequenzen aufweisen, derart, dass ein Antikörper, der die leichte Kette oder das Fragment hiervon umfasst, selektiv $\alpha\beta 7$ -Integrin bindet:

Leichte Kette:

CDR1 Aminosäuren 44-59 von SEQ ID NO: 12

CDR2 Aminosäuren 75-81 von SEQ ID NO: 12

CDR3 Aminosäuren 114-122 von SEQ ID NO: 12

18. Leichte Kette eines humanisierten Immunglobulins oder Fragment hiervon nach Anspruch 17, wobei die humane Gerüstregion von der variablen Region der leichten Kette des GM607'CL-Antikörpers (SEQ ID NO: 8) abgeleitet ist.

19. Leichte Kette des humanisierten Immunglobulins oder Fragment nach einem der Ansprüche 15-18, wobei die leichte Kette des humanisierten Immunglobulins oder das Fragment die variable Region von SEQ ID Nr. 21 umfasst.

20. Isolierte Nukleinsäure, die eine Nukleotidsequenz umfasst, die die leichte Kette des humanisierten Immunglobulins oder ein Fragment nach einem der Ansprüche 15-19 kodiert.
21. Isolierte Nukleinsäure nach Anspruch 20, wobei die Sequenz die die variable Region kodierende Sequenz von SEQ ID Nr. 20 umfasst.
22. Isolierte Nukleinsäure, die eine Nukleotidsequenz umfasst, die die leichte Kette des humanisierten Immunglobulins oder ein Fragment nach Anspruch 15 oder Anspruch 16 kodiert, wobei die Sequenz die die variable Region kodierende Sequenz von SEQ ID NO: 11 umfasst.
23. Expressionsvektor, der ein fusioniertes Gen umfasst, das eine leichte Kette des humanisierten Immunglobulins oder ein Fragment hiervon nach einem der Ansprüche 15-19 kodiert.
24. Expressionsvektor nach Anspruch 23, wobei das fusionierte Gen die die variable Region kodierende Sequenz von SEQ ID NO: 20 umfasst.
25. Expressionsvektor, der ein fusioniertes Gen umfasst, das eine leichte Kette des humanisierten Immunglobulins oder ein Fragment hiervon nach Anspruch 15 oder Anspruch 16 kodiert, wobei das fusionierte Gen die die variable Region kodierende Sequenz von SEQ ID NO: 11 umfasst.
26. Schwere Kette eines humanisierten Immunglobulins oder Fragment hiervon des humanisierten Antikörpers oder Antigen-bindendes Fragment nach Anspruch 1, wobei die schwere Kette oder das Fragment eine Aminosäuresequenz aufweist, die zumindest einen funktionellen Anteil der Aminosäuresequenz der variablen Region der schweren Kette aufweist, die in [Fig. 9](#) dargestellt ist (SEQ ID NO: 15).
27. Schwere Kette des humanisierten Immunglobulins oder Fragment nach Anspruch 26, wobei die schwere Kette oder das Fragment eine Aminosäuresequenz aufweist, die die Signalpeptidsequenz, dargestellt in [Fig. 9](#) (SEQ ID NO: 15) und zumindest einen funktionellen Anteil der Aminosäuresequenz der variablen Region der schweren Kette, dargestellt in [Fig. 9](#) (SEQ ID NO: 15), umfasst.
28. Schwere Kette eines humanisierten Immunglobulins oder Fragment hiervon, wobei die schwere Kette des humanisierten Immunglobulins oder das Fragment hypervariable Regionen (CDR1, CDR2 und CDR3) der schweren Kette des monoklonalen murinen Act-1 Antikörpers, und eine Gerüst-Region der schweren Kette humanen Ursprungs umfasst, wobei die hypervariablen Regionen die Aminosäuresequenzen umfassen, die unten dargelegt sind, derart, dass ein Antikörper, der die schwere Kette oder ein Fragment hiervon umfasst, selektiv $\alpha 4\beta 7$ -Integrin bindet:
Schwere Kette:
CDR1 Aminosäuren 50-54 von SEQ ID NO: 15
CDR2 Aminosäuren 69-85 von SEQ ID NO: 15
CDR3 Aminosäuren 118-129 von SEQ ID NO: 15.
29. Schwere Kette des humanisierten Immunglobulins oder Fragment nach Anspruch 28, wobei die humane Gerüstregion von der variablen Region der schweren Kette des humanen 21/28'CL Antikörpers abgeleitet ist (SEQ ID NO: 10).
30. Schwere Kette des humanisierten Immunglobulins oder Fragment nach einem der Ansprüche 26-29, wobei die schwere Kette des humanisierten Immunglobulins oder das Fragment die variable Region von SEQ ID NO: 19 umfasst.
31. Isolierte Nukleinsäure, die eine Nukleotidsequenz umfasst, die die schwere Kette des humanisierten Immunglobulins oder das Fragment nach einem der Ansprüche 26-30 kodiert.
32. Isolierte Nukleinsäure nach Anspruch 31, wobei die Sequenz die die variable Region kodierende Sequenz nach SEQ ID NO: 18 umfasst.
33. Isolierte Nukleinsäure, die eine Nukleotidsequenz umfasst, die die schwere Kette des humanisierten Immunglobulins oder das Fragment nach Anspruch 26 oder Anspruch 27 kodiert, wobei die Sequenz die die variable Region kodierende Sequenz von SEQ ID NO: 14 umfasst.
34. Expressionsvektor, der ein fusioniertes Gen umfasst, das die schwere Kette des humanisierten Immun-

globulins oder ein Fragment hiervon nach einem der Ansprüche 26-30 umfasst.

35. Expressionsvektor nach Anspruch 34, wobei das fusionierte Gen die kodierende Sequenz der variablen Region nach SEQ ID NO: 18 umfasst.

36. Expressionsvektor, der ein fusioniertes Gen umfasst, das die schwere Kette des humanisierten Immunglobulins oder Fragments hiervon nach Anspruch 26 oder Anspruch 27 kodiert, wobei das fusionierte Gen die für die variable Region kodierende Sequenz nach SEQ ID NO: 14 umfasst.

37. Wirtszelle, die den Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 23-25 oder 34-36 umfasst.

38. Verfahren zur Herstellung der leichten Kette eines humanisierten Immunglobulins, eines Fragmentes der leichten Kette eines humanisierten Immunglobulins, einer schweren Kette eines humanisierten Immunglobulins oder eines Fragmentes der schweren Kette eines humanisierten Immunglobulins, das eine Aufrechterhaltung einer Wirtszelle nach Anspruch 37 unter Bedingungen, die zur Expression der leichten Kette oder schweren Kette eines humanisierten Immunglobulins geeignet sind, umfasst, wobei die leichte Kette eines humanisierten Immunglobulins, ein Fragment der leichten Kette eines humanisierten Immunglobulins, die schwere Kette eines humanisierten Immunglobulins oder ein Fragment der schweren Kette eines humanisierten Immunglobulins exprimiert und erzeugt wird und wahlweise isoliert wird.

39. Wirtszelle, die eine erste rekombinante Nukleinsäure umfasst, die die leichte Kette eines humanisierten Immunglobulins oder Fragment hiervon kodiert, und eine zweite rekombinante Nukleinsäure umfasst, die die schwere Kette eines humanisierten Immunglobulins oder ein Fragment hiervon kodiert, wobei ein Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment, das die leichte Kette oder ein Fragment hiervon und die schwere Kette oder ein Fragment hiervon umfasst, selektiv an $\alpha\beta\gamma$ -Integrin bindet, wobei die erste Nukleinsäure eine Nukleotidsequenz umfasst, die eine von der leichten Kette eines murinen monoklonalen Act-1 Antikörpers abgeleitete CDR und eine Gerüstregion kodiert, die von einer schweren Kette humanen Ursprungs abgeleitet ist.

40. Wirtszelle nach Anspruch 39, wobei die erste Nukleinsäure eine Nukleotidsequenz umfasst, die zumindest eine von drei hypervariablen Regionen (CDR1, CDR2 und CDR3) kodiert, die die unten dargelegten Aminosäuresequenzen aufweisen:

Leichte Kette:

CDR1 Aminosäuren 44-59 von SEQ ID NO: 12

CDR2 Aminosäuren 75-81 von SEQ ID NO: 12

CDR3 Aminosäuren 114-122 von SEQ ID NO: 12, und

eine Gerüstregion, die von der variablen Region einer leichten Kette humanen Ursprungs abgeleitet ist; und wobei die zweite Nukleinsäure eine Nukleotidsequenz umfasst, die zumindest eine von drei hypervariablen Regionen (CDR1, CDR2 und CDR3) kodiert, die die unten dargelegten Aminosäuresequenzen beinhalten:

Schwere Kette:

CDR1 Aminosäuren 50-54 von SEQ ID NO: 15

CDR2 Aminosäuren 69-85 von SEQ ID NO: 15

CDR3 Aminosäuren 118-129 von SEQ ID NO: 15; und

eine Gerüstregion, die von der variablen Region einer schweren Kette humanen Ursprungs abgeleitet ist.

41. Wirtszelle nach Anspruch 40, wobei: die erste Nukleinsäure eine Nukleotidsequenz umfasst, die drei hypervariablen Regionen (CDR1, CDR2 und CDR3) kodiert, die die unten dargelegten Aminosäuresequenzen aufweisen:

Leichte Kette:

CDR1 Aminosäuren 44-59 von SEQ ID NO: 12

CDR2 Aminosäuren 75-81 von SEQ ID NO: 12

CDR3 Aminosäuren 114-122 von SEQ ID NO: 12; und

eine Gerüstregion, die von der variablen Region einer leichten Kette humanen Ursprungs abgeleitet ist; und wobei die zweite Nukleinsäure eine Nukleotidsequenz umfasst, die drei hypervariablen Regionen (CDR1, CDR2 und CDR3) kodiert, die die unten dargelegten Aminosäuresequenzen aufweisen:

Schwere Kette:

CDR1 Aminosäuren 50-54 von SEQ ID NO: 15

CDR2 Aminosäuren 69-85 von SEQ ID NO: 15

CDR3 Aminosäuren 118-129 von SEQ ID NO: 15; und

eine Gerüstregion, die von der variablen Region einer Schwere Kette humanen Ursprungs abgeleitet ist.

42. Verfahren zur Herstellung eines humanisierten Immunglobulins oder Antigen-bindenden Fragmentes hiervon, das eine Aufrechterhaltung einer Wirtszelle nach einem der Ansprüche 39-41 unter Bedingungen umfasst, die zur Expression eines humanisierten Immunglobulins oder eines Antigen-bindenden Fragmentes hiervon geeignet sind, wobei humanisierte Immunglobulin-Ketten exprimiert werden und ein humanisiertes Immunglobulin oder ein Fragment hiervon erzeugt und wahlweise isoliert wird.

43. Humanisiertes Immunglobulin oder Antigen-bindendes Fragment nach einem der Ansprüche 1-14 zur Verwendung in Therapie oder Diagnose.

44. Pharmazeutische Zusammensetzung, die ein humanisiertes Immunglobulin oder ein Antigen-bindendes Fragment nach einem der Ansprüche 1-14 und einen geeigneten Träger umfasst, zur Verwendung als Medikament.

45. Verwendung eines humanisierten Immunglobulins oder Antigen-bindenden Fragmentes nach einem der Ansprüche 1-14 zur Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung einer entzündlichen Erkrankung oder einer Erkrankung, die mit einer Leukozyteninfiltration von Geweben assoziiert ist, wobei die Erkrankung eine Cholecystitis, Cholangitis, Pericholangitis, Mastitis, chronische Sinusitis, Pankreatitis oder Insulin-abhängige Diabetes Mellitus ist.

46. Verwendung eines humanisierten Immunglobulins oder Antigen-bindenden Fragmentes nach einem der Ansprüche 1-14 zur Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung einer entzündlichen Darmkrankheit.

47. Verwendung nach Anspruch 46, wobei die entzündliche Darmkrankheit aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einer ulzerativen Colitis und Morbus Crohn ausgewählt ist.

48. Verwendung nach Anspruch 46 oder Anspruch 47, wobei das humanisierte Immunglobulin oder Antigen-bindende Fragment eine schwere Kette und eine leichte Kette umfasst, und wobei die schwere Kette die variable Region nach SEQ ID NO: 19 umfasst und wobei die leichte Kette die variable Region von SEQ ID NO: 21 umfasst.

49. Verwendung eines humanisierten Immunglobulins oder Antigen-bindenden Fragments nach Anspruch 9 zur Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung einer entzündlichen Darmkrankheit.

50. Verwendung eines humanisierten Immunglobulins oder Antigen-bindenden Fragmentes nach einem der Ansprüche 1-14 zur Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung einer entzündlichen Erkrankung, die mit Schleimhaut-Geweben assoziiert ist, wobei die Krankheit die Graftversus-host-Krankheit ist.

Es folgen 19 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

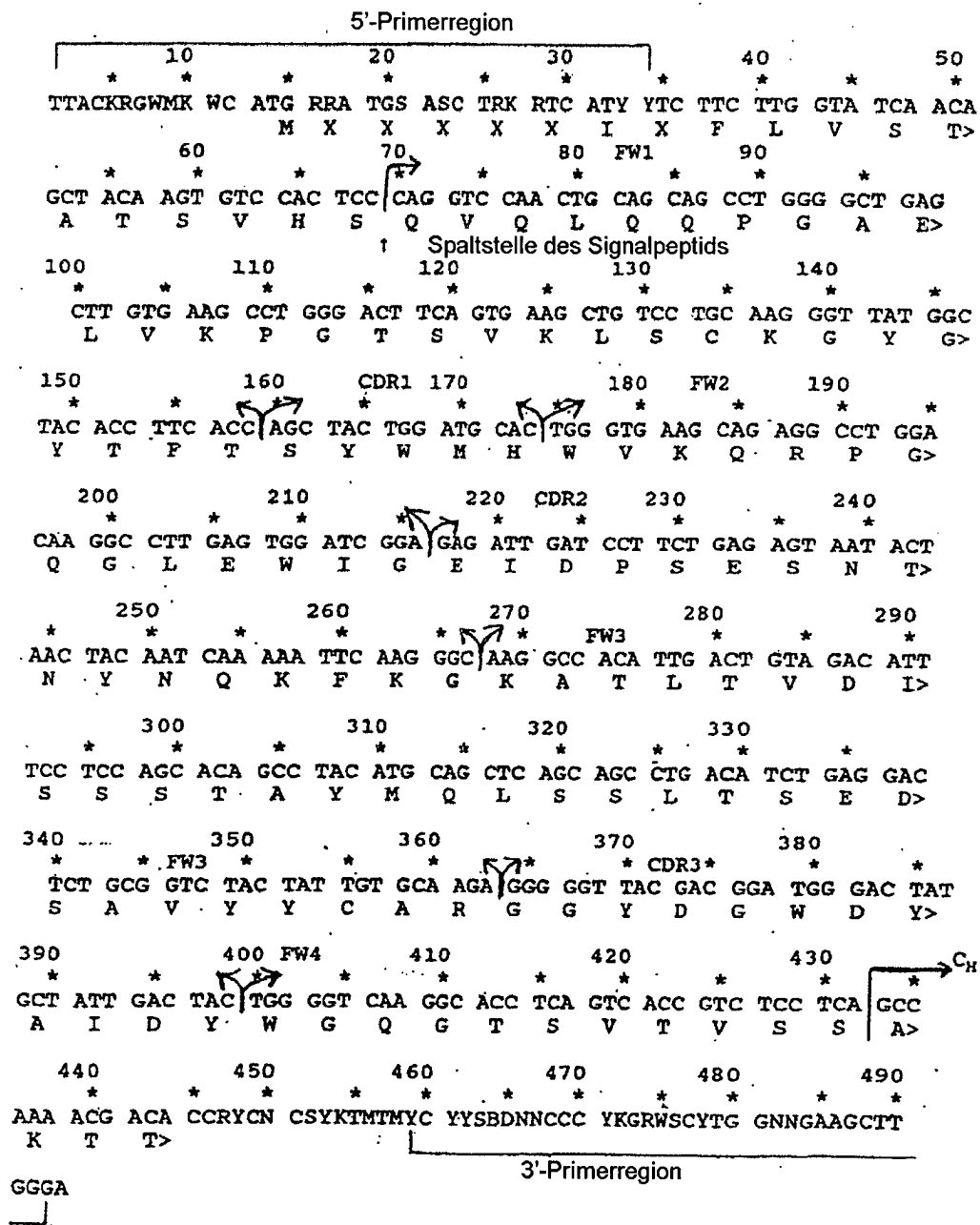


FIG. 1

```

      10      20      30      40      50
      *      *      *      *      *
TTACTTGACG ACTCGGG ATG GGA TGG AGC TAT ATC ATC TTC TTC TTG GTA TCA
      M G W S Y I I F F L V S>

      60      70      80      90      100
      *      *      *      *      *
ACA GCT ACA AGT GTC CAC TCC CAG GTC CAA CTG CAG CAG CCT GGG GCT
      T A T S V H S Q V Q L Q Q P G A>

      110      120      130      140
      *      *      *      *
GAG CTT GTG AAG CCT GGG ACT TCA GTG AAG CTG TCC TGC AAG GGT TAT
      E L V K P G T S V K L S C K G Y>

150      160      170      180      190
      *      *      *      *      *
GGC TAC ACC TTC ACC AGC TAC TGG ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT
      G Y T F T S Y W M H W V K Q R P>

200      210      220      230      240
      *      *      *      *      *
GGA CAA GGC CTT GAG TGG ATC GGA GAG ATT GAT CCT TCT GAG AGT AAT
      G Q G L E W I G E I D P S E S N>

250      260      270      280      290
      *      *      *      *      *
ACT AAC TAC AAT CAA AAA TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA GAC
      T N Y N Q K F K G K A T L T V D>

      300      310      320      330      340
      *      *      *      *      *
ATT TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG
      I S S S T A Y M Q L S S L T S E>

      350      360      370      380
      *      *      *      *
GAC TCT GCG GTC TAC TAT TGT GCA AGA GGG GGT TAC GAC GGA TGG GAC
      D S A V Y Y C A R G G Y D G W D>

390      400      410      420
      *      *      *      *
TAT GCT ATT GAC TAC TGG GGT CAA GGC ACA TCA GTC ACC
      Y A I D Y W G Q G T S V T>

```

FIGUR 2

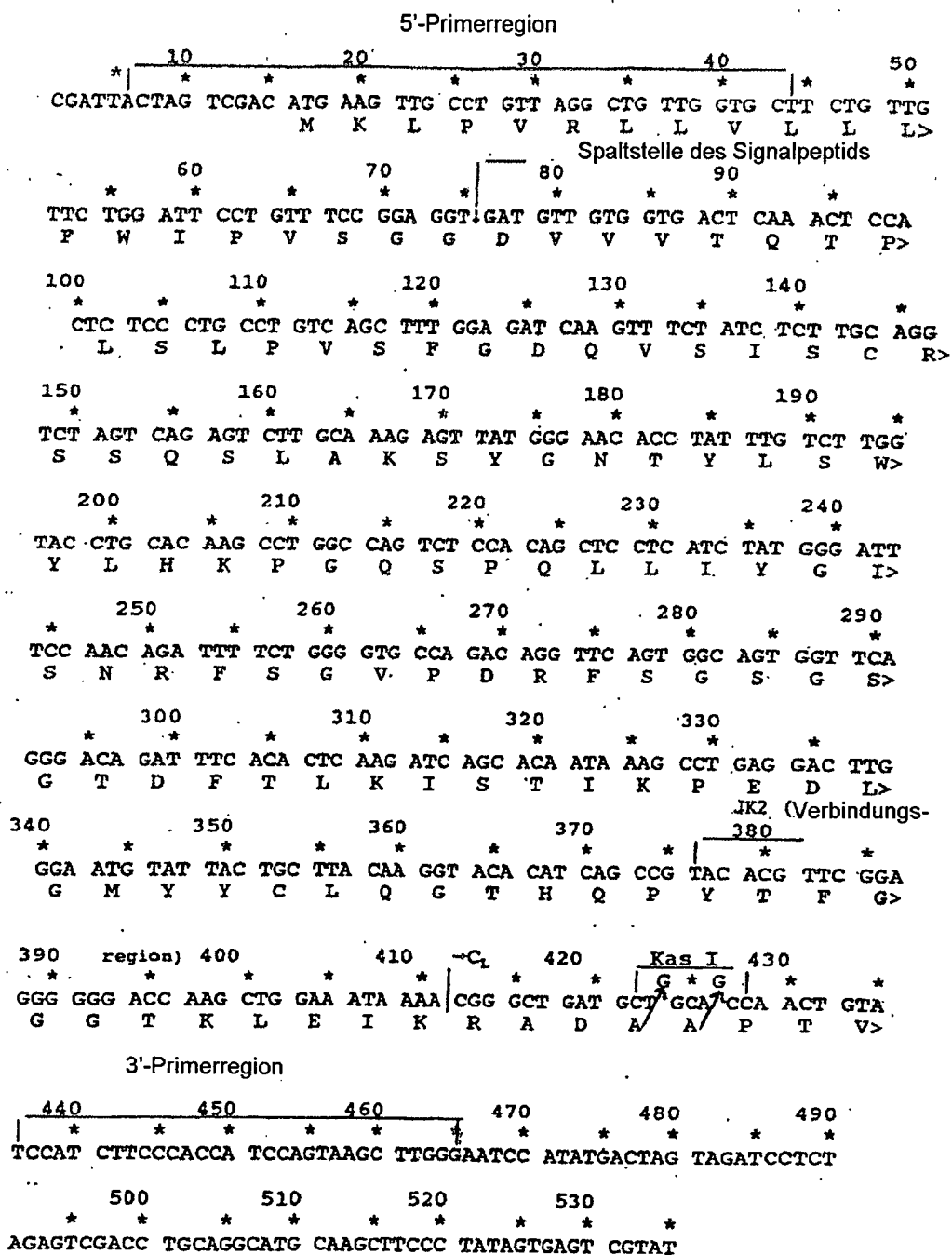


FIG. 3

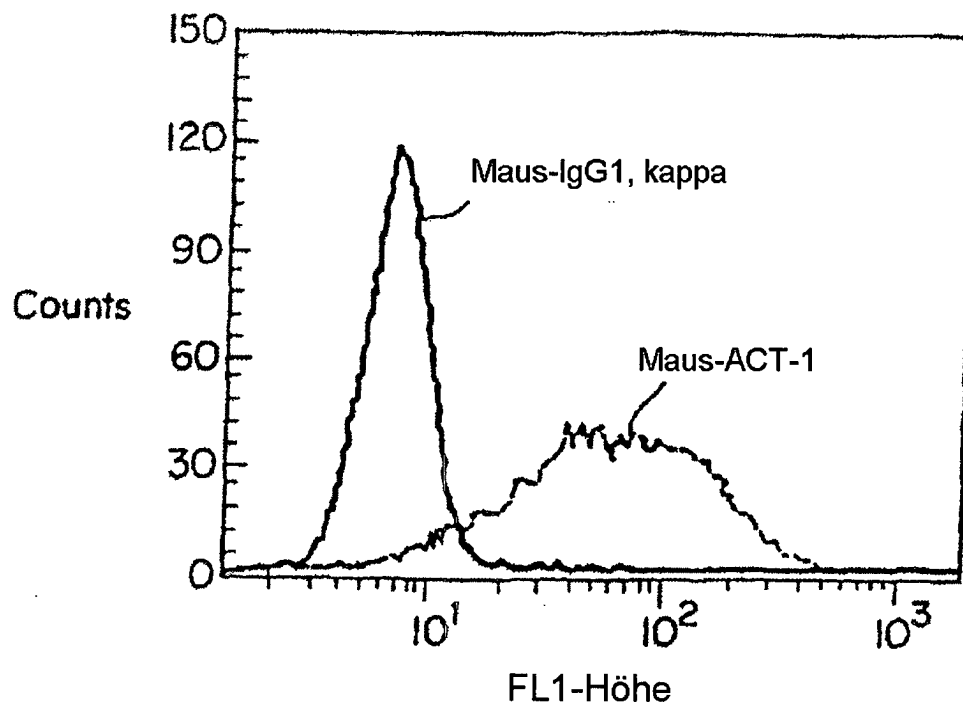


FIG. 4A

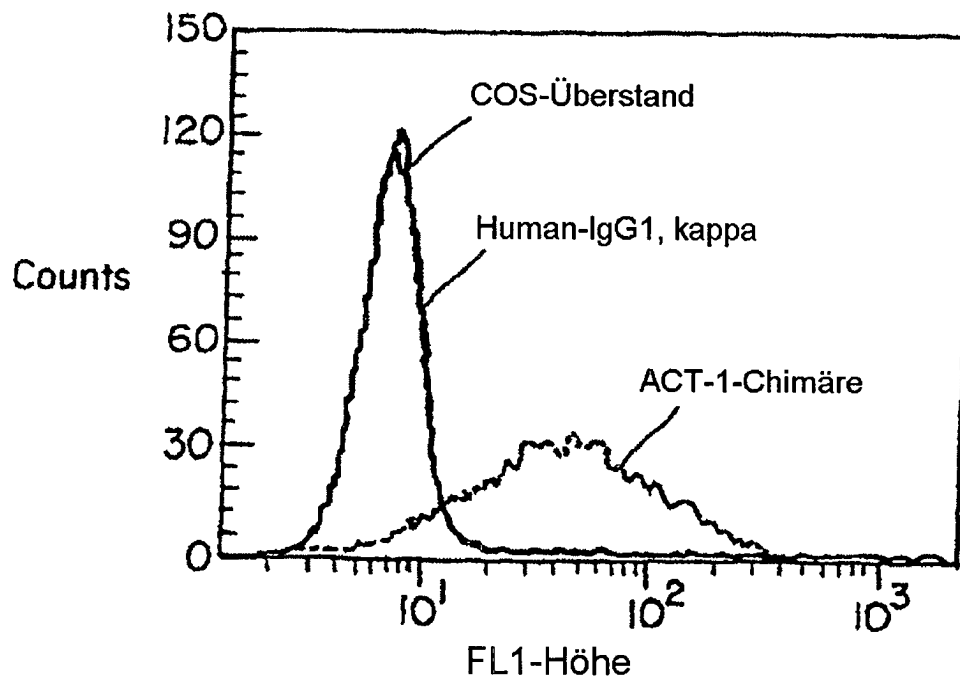
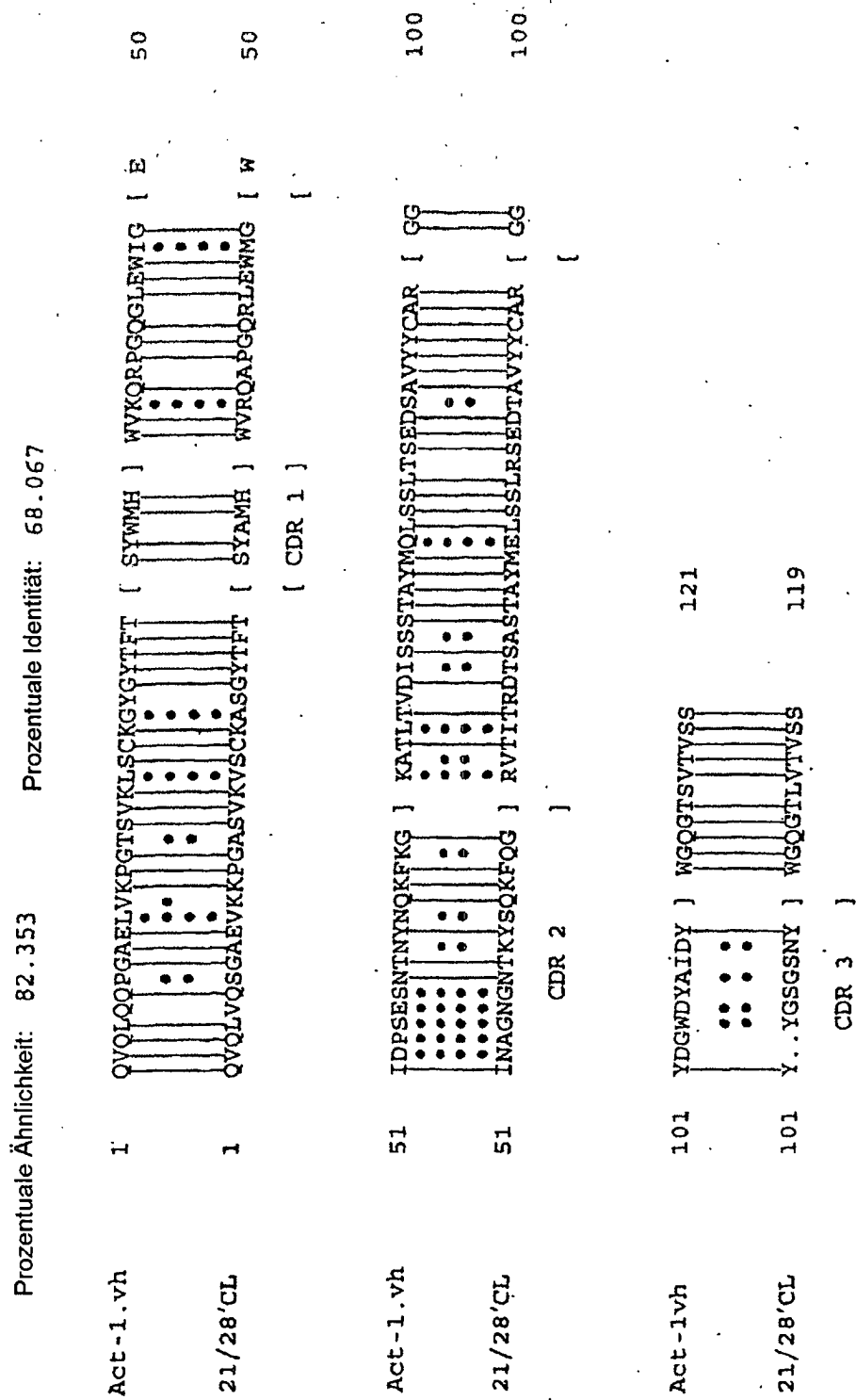
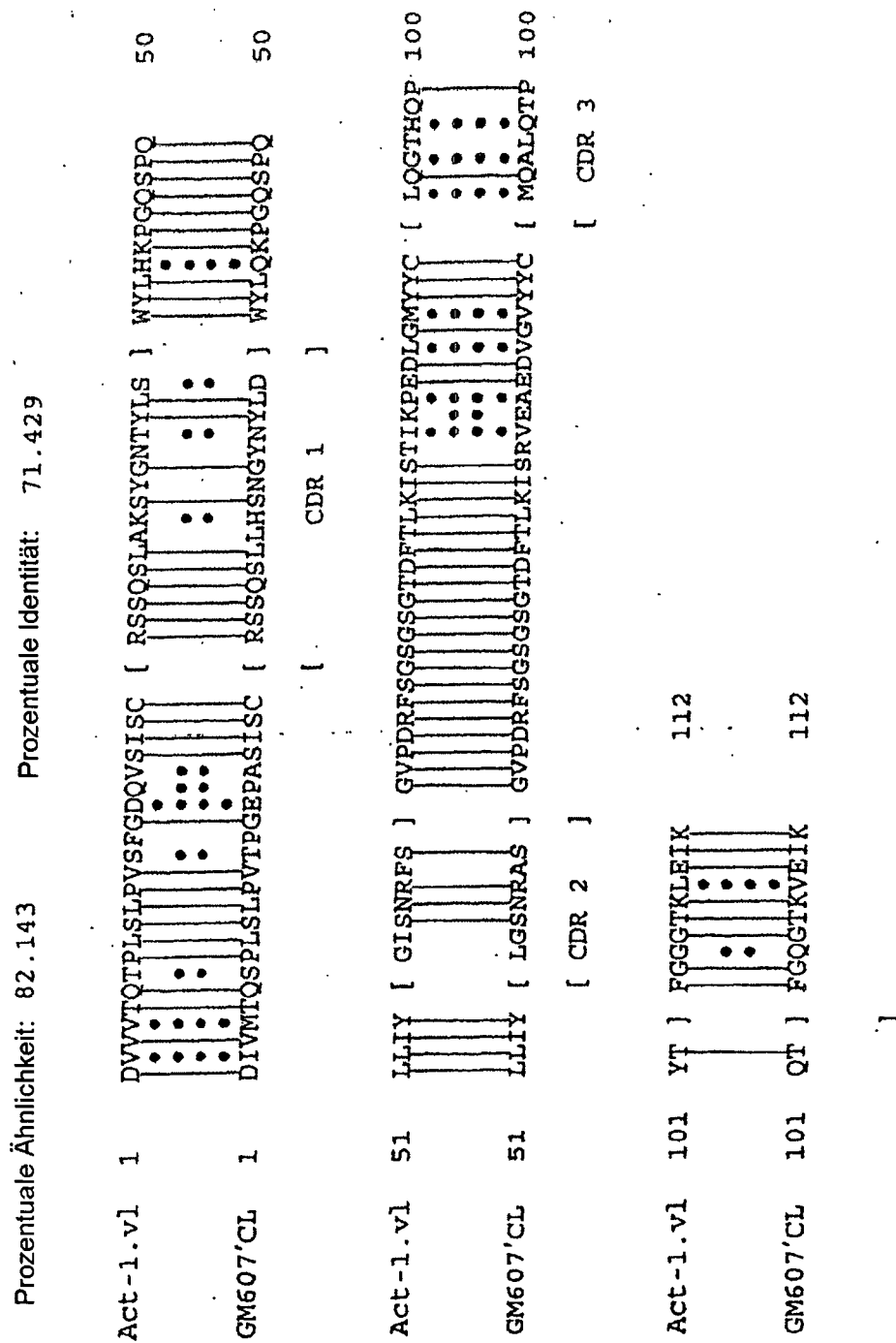


FIG. 4B



FIGUR 6



FIGUR 5

1 ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTTCTGTTGTTCTGGATTCCCTGTTTCCGGAGGT 60
 TACTTCAACGGACAATCCGACAACCACGAAGACAACAAGACCTAAGGACAAAGGCCTCCA
 [M K L P V R L L V L L L F W I P V S G G]
 Signalpeptid

61 GATGTTGTGGTGACTCAAACCTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGCTTTGGAGATCAAGTTTCT 120
 CTACAACACCACTGAGTTTGAGGTGAGAGGGACGGACAGTCGAAACCTCTAGTTCAAAGA
 [D V V V T Q T P L S L P V S F G D Q V S
 Gerüst 1

121 ATCTCTTGCCAGGTCTAGTCAGAGTCTTGCAAAGAGTTATGGGAACACCTATTTGTCCTGG 180
 TAGAGAACGTCAGATCAGTCTCAGAACGTTTCTCAATACCCCTGTGGATAAACAGAACC
 I S C][R S S Q S L A K S Y G N T Y L S][W
 CDR 1

181 TACCTGCACAAGCCTGGCCAGTCTCCACAGCTCCTCATCTATGGGATTTCCAACAGATTT 240
 ATGGACGTGTTCCGACCGGTGTCAGAGGTGTCGAGGAGTAGATACCCCTAAAGGTTGTCTAAA
 Y L H K P G Q S P Q L L I Y][G I S N R F
 Gerüst 2 CDR 2

241 TCTGGGGTGCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGTTCAGGGACAGATTTCACTCAAGATC 300
 AGACCCACGCTCTGTCCAAGTCACCGTCACCAAGTCCCTGTCTAAAGTGTGAGTTCTAG
 S][G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
 Gerüst 3

301 AGCACAATAAAGCCTGAGGACTTGGAATGTATTACTGCTTACAAGGTACACATCAGCCG 360
 TCGTGTATTTCGGACTCCTGAACCCCTACATAATGACGAATGTTCCATGTGTAGTCCGGC
 S T I K P E D L G M Y Y C][L Q G T H Q P
 CDR 3

361 TACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA 396
 ATGTGCAAGCCTCCCCCTGGTTCGACCTTTATTTT
 Y T][F G G G T K L E I K]
 Gerüst 4

FIG. 7

1 GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCC 60

 CTATAACACTACTGAGTCAGAGGTGAGAGGGACGGGCAGTGGGGACCTCTCGGCCGGAGG
 [D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S
 Gerüst 1
 61 ATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTCCATAGTAATGGATCAAACCTATTGGATTGG 120

 TAGAGGACGTCCAGATCAGTCTCGGAGGAGGTATCATTACCTAGTTTGATAAACCTAACCC
 I S C)[R S S Q S L L H S N G Y N Y L D][W
 CDR 1
 121 TACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCC 180

 ATGGACGTCTTCGGTCCCGTCAGAGGTGTCGAGGACTAGATAAACCCAGATTAGCCCGG
 Y L Q K P G Q S P Q L L I Y)[L G S N R A
 Gerüst 2 CDR 2
 181 TCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC 240

 AGGCCCCAGGGACTGTCCAAGTCACCGTCACCTAGTCCGTGTCTAAAATGTGTCTTTTAG
 S)[G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
 Gerüst 3
 241 AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACCAACTCCT 300

 TCGTCTCACCTCCGACTCCTACACCCCAAATAATGACGTACGTTGAGATGGTTGAGGA
 S R V E A E D V G V Y Y C)[M Q A L Q T P
 CDR 3
 301 CAGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA 336

 GTCTGCAAGCCGGTTCCCTGGTTCCACCTTTAGTTT
 Q T)[F G Q G T K V E I K
 Gerüst 4

FIGUR 8

1 ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTATCAACAGCTACAAGTGTCCACTCCCAG 60

 TACCTACCTCGACATAGTAGGAGAAGAACCATAGTTGTCGATGTTACAGGTGAGGGTC
 M G W S C I I L F L V S T A T S V H S][Q
 Signalpeptid
 61 GTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGACTTCAGTGAAGCTGTCC 120

 CAGGTTGACGTCGTCGGACCCCGACTCGAACACTTCGGACCCTGAAGTCACTTCGACAGG
 V Q L Q Q P G A E L V K P G T S V K L S
 Gerüst 1
 121 TGCAAGGGTTATGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCT 180

 ACGTTCCCAATACCGATGTGGAAGTGGTCGATGACCTACGTGACCCACTTCGTCTCCGGA
 C K G Y G Y T F T][S Y W M H][W V K Q R P
 CDR 1
 181 GGACAAGGCCTTGAGTGGATCGGAGAGATTGATCCTTCTGAGAGTAATACTAACTACAAT 240

 CCTGTTCCGGAATCACCTAGCCTCTCTAACTAGGAAGACTCTCATTATGATTGATGTTA
 G Q G L E W I G][E I D P S E S N T N Y N
 Gerüst 2 CDR 2
 241 CAAAAATTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACATTTCTCCAGCACAGCCTACATG 300

 GTTTTAAAGTTCCCGTCCGGTGTAAGTACATCTGTAAAGGAGGTCGTGTCGGATGTAC
 Q K F K G][K A T L T V D I S S S T A Y M
 Gerüst 3
 301 CAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTCGGTCTACTATTGTGCAAGAGGGGGTTAC 360

 GTCGAGTCGTCGGACTGTAGACTCCTGAGACGCCAGATGATAACACGTTCTCCCCCAATG
 Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R][G G Y
 361 GACGGATGGGACTATGCTATTGACTACTGGGGTCAAGGCACCTCAGTCACCGTCTCCTCA 420

 CTGCCTACCTGATACGATAACTGATGACCCAGTCCGTGGAGTCAGTGGCAGAGGAGT
 D G W D Y A I D Y][W G Q G T S V T V S S]
 CDR 3 Gerüst 4

FIGUR 9

```

1  ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAG  60
   -----
   TACCTCAAACCCGACTCGACCGAAAAAGAACACCGATAAAATTTTCCACAGGTCACAGTC
   [M E F G L S W L F L V A I L K G V Q C][Q

Signalpeptid

61  GTGCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCC  120
   -----
   CACGTGGAACACGTGACACCCGACTCCACTTCTTCGGACCCCGGAGTCACTTCCAAAGG
   V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S

Gerüst 1

121  TGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTAGCTATGCTATGCATTGGGTGCGCCAGGCCCCC  180
   -----
   ACGTTCCGAAGACCTATGTGGAAGTGCATACGATACGTAACCCACGCGGTCCGGGGG
   C K A S G Y T F T][S Y A M H][W V R Q A P

CDR 1

181  GGACAAAGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACGCTGGCAATGGTAACACAAAATATTCA  240
   -----
   CCTGTTTCCGAACCTACCTACCTACCTAGTTGCGACCGTTACCATTGTGTTTTATAAGT
   G Q R L E W M G][W I N A G N G N T K Y S

Gerüst 2 CDR 2

241  CAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATTAACAGGGACACATCCGCGAGCACAGCCTACATG  300
   -----
   GTCTTCAAGGTCCCGTCTCAGTGGTAATGGTCCCTGTGTAGGCGCTCGTGTGCGATGTAC
   Q K F Q G][R V T I T R D T S A S T A Y M

301  GAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGTTAC  360
   -----
   CTCGACTCGTCCGACTCTAGACTTCTGTGCCGACACATAATGACACGCTCTCCTCCAATG
   E L S S L R S E D T A V Y Y C A R][G G Y

Gerüst : 3

361  TATGGTTCGGGGAGCAACTACTGGGGCCAGGCAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA  414
   -----
   ATACCAAGCCCCTCGTTGATGACCCCGGTCCCTTGGGACCGAGTGGCAGAGGAGT
   Y G S G S N Y][W G Q G T L V T V S S]

CDR 3 Gerüst 4

```

FIGUR 10

```

      10      20      30      40
      *      *      *      *
ATG AAA TGC ACC TGG GTC ATT CTC TTC TTG GTA TCA ACA GCT ACA AGT
M   K   C   T   W   V   I   L   F   L   V   S   T   A   T   S>
      *      *      *      *
      Spaltstelle des Signalpeptids
50      60      70      80      90
      *      *      *      *      *
GTC CAC TCC CAG GTC CAA CTA GTG CAG TCT GCG GCT GAG GTT AAG AAG
V   H   S   Q   V   Q   L   V   Q   S   G   A   E   V   K   K>
      *      *      *      *      *
100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *
CCT GGG GCT TCA GTG AAG GTG TCC TGC AAG GGT TCT GGC TAC ACC TTC
P   G   A   S   V   K   V   S   C   K   G   S   G   Y   T   F>
      *      *      *      *      *
      Xba I
150     160     170     180     190
      *      *      *      *      *
ACC AGC TAC TGG ATG CAT TGG GTG AGG CAG GCG CCT GGC CAA CGT CTA
T   S   Y   W   M   H   W   V   R   Q   A   P   G   Q   R   L>
      *      *      *      *      *
200     210     220     230     240
      *      *      *      *      *
GAG TGG ATC GGA GAG ATT GAT CCT TCT GAG AGT AAT ACT AAC TAC AAT
E   W   I   G   E   I   D   P   S   E   S   N   T   N   Y   N>
      *      *      *      *      *
250     260     270     280
      *      *      *      *
CAA AAA TTC AAG GGA CGC GTC ACA TTG ACT GTA GAC ATT TCC GCT AGC
Q   K   F   K   G   R   V   T   L   T   V   D   I   S   A   S>
      *      *      *      *      *
290     300     310     320     330
      *      *      *      *      *
ACA GCC TAC ATG GAG CTC AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACT GCG GTC
T   A   Y   M   E   L   S   S   L   R   S   E   D   T   A   V>
      *      *      *      *      *
340     350     360     370     380
      *      *      *      *      *
TAC TAT TGT GCA AGA GGG GGT TAC GAC GGA TGG GAC TAT GCT ATT GAC
Y   Y   C   A   R   G   G   Y   D   G   W   D   Y   A   I   D>
      *      *      *      *      *
390     400     410     420     430
      *      *      *      *      *
TAC TGG GGT CAA GGC ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG
Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S   A   S   T   K>
      *      *      *      *      *
440     450     460     470     480
      *      *      *      *      *
GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG
G   P   S   V   F   P   L   A   P   S   S   K   S   T   S   G>
      *      *      *      *      *
490     500     510     520
      *      *      *      *
GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG
G   T   A   A   L   G   C   L   V   K   D   Y   F   P   E   P>
      *      *      *      *      *
530     540
      *      *      *      *
GTG ACG GTG TCG
V   T   V   S>

```

FIG. 11

```

      10      20      30      40
      *      *      *      *
ATG AAG TTG CCT GTT AGG CTG TTG GTG CTT CTG TTG TTC TGG ATT CCT
M  K  L  P  V  R  L  L  V  L  L  L  F  W  I  P>
      Spaltstelle des Signalpeptids
50  BspE I 60 70 80 90
      *      *      *      *      *
GTT TCC GGA GGT GAT GTT GTG ATG ACT CAA AGT CCA CTC TCC CTG CCT
V  S  G  G  D  V  V  M  T  Q  S  P  L  S  L  P>

100      110      120      130      140
      *      *      *      *      *
GTC ACC CCT GGA GAA CCA GCT TCT ATC TCT TGC AGG TCT AGT CAG AGT
V  T  P  G  E  P  A  S  I  S  C  R  S  S  Q  S>

150      160      170      180 Asp 718 190
      *      *      *      *      *
CTT GCA AAG AGT TAT GGG AAC ACC TAT TTG TCT TGG TAC CTG CAG AAG
L  A  K  S  Y  G  N  T  Y  L  S  W Y L  Q  K>

200      210      220      230      240
      *      *      *      *      *
*Msc I *
CCT GGC CAG TCT CCA CAG CTC CTC ATC TAT GGG ATT TCC AAC AGA TTT
P  G  Q  S  P  Q  L  L  I  Y  G  I  S  N  R  F>

250      260      270      280
      *      *      *      *
TCT GGG GTG CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGT TCA GGG ACA GAT TTC
S  G  V  P  D  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F>

290      300 NruI 310      320      330
      *      *      *      *      *
ACA CTC AAG ATC TCG CGA GTA GAG GCT GAG GAC GTG GGA GTG TAT TAC
T  L  K  I  S  R  V  E  A  E  D  V  G  V  Y  Y>

340      350      360      370      380
      *      *      *      *      *
TGC TTA CAA GGT ACA CAT CAG CCG TAC ACG TTC GGA CAG GGG ACC AAG
C  L  Q  G  T  H  Q  R  Y  T  P  G  Q  G  T  K>

390      400      410 Kas I
      *      *      *      *
GTG GAA ATA AAA CGG GCT GAT GCG GCG CC
V  E  I  K  R  A  D  A  A  P>

```

FIG. 12

Oligos der leichten Kette:	Doppelstrangfragmente
L1 5'- TTT CCG GAG GTG ATG TTG TGA TGA CTC AAA GTC CAC TCT CCC TGC CTG TCA CCC CTG GAG AAC CAG CTT CTA TCT CTT GCA GGT CTA GTC AGA G	LA
L2 5'- ACT GGC CAG GCT TCT GCA GGT ACC AAG ACA AAT AGG TGT TCC CAT AAC TCT TTG CAA GAC TCT GAC TAG AOC TGC AAG AGA TAG AAG CTG GTT C	
L3 5'- CCT GGC CAG TCT CCA CAG CTC CTC ATC TAT GGG ATT TCC AAC AGA TTT TCT GGG GTG OCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGT TC	LB
L4 5'- ACT CGC GAG ATC TTG AGT GTG AAA TCT GTC OCT GAA CCA CTG CCA CTG AAC CTG TCT GGC ACC CCA GAA AAT CTG TTG GAA ATC	
L5 5'- TCT CGC GAG TAG AGG CTG AGG ACG TGG GAG TGT ATT ACT GCT TAC AAG GTA CAC ATC AGC CGT ACA C	LC
L6 5'- ATG GCG CCG CAT CAG CCC GTT TTA TTT CCA OCT TGG TCC OCT GTC CGA ACG TGT ACG GCT GAT GTG TAC CTT GTA AGC AGT AAT AC	
Oligos der schweren Kette	Doppelstrangfragment
H1 5'- ATA AGC TTC GCC ATG AAA TGC ACC TGG GTC ATT CTC TTC TTG GTA TCA ACA GCT ACA AGT GTC CAC TCC CAG GTC CAA CTA GTG CAC CGG TTA	HA
H2 5'- TAA CCG GTG CAC TAG TTG GAC CTG GGA GTG GAC ACT TGT AGC TGT TGA TAC CAA GAA GAG AAT GAC CCA GGT GCA TTT CAT GGC GAA GCT TAT	
H3 5'- CAA CTA GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTT AAG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG GTG TOC TGC AAG GGT TCT GGC TAC ACC TTC ACC AGC	HB
H4 5'- TAA CCG GTA CTC TAG ACG TTG GCC AGG CGC CTG CCT CAC CCA ATG CAT CCA GTA GCT GGT GAA GGT GTA GCC AGA ACC CTT GCA GGA C	
H5 5'- CGT CTA GAG TGG ATC GGA GAG ATT GAT CCT TCT GAG AGT AAT ACT AAC TAC AAT CAA AAA TTC AAG GGA CGC GTC A	HC
H6 5'- TAA CCG GTG TGC TAG CGG AAA TGT CTA CAG TCA ATG TGA CGC GTC OCT TGA ATT TTT GAT TGT AGT TAG TAT TAC T	
H7 5'- CCG CTA GCA CAG CCT ACA TGG AGC TCA GCA GCC TGA GAT CTG AGG ACA CTG CGG TCT ACT ATT GTG CAA GAG GGG GTT ACG ACG GAT G	HD
H8 5'- TCA CCG GTG CGG TGA CCA GGG TGC CTT GAC CCC AGT AGT CAA TAG CAT AGT CCC ATC CGT CGT AAC CCC CTC TTG CAC AAT AGT AGA C	
H9 5'- CTG GTC ACC GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC AOC TCT GGG GGC ACA G	HE
..H10 5'- TCA CCG GTT CGG GGA AGT AGT OCT TGA CCA GGC AGC CCA GGG CCG CTG TGC CCC CAG AGG TGC TCT TGG AGG AGG GTG CCA GGG G	

FIGUR 13

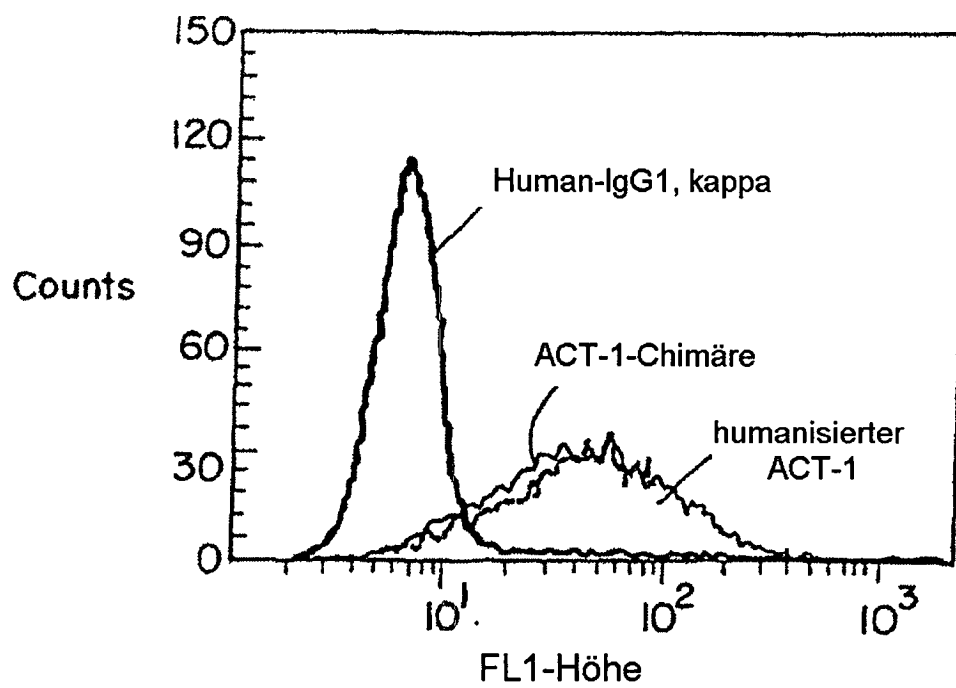


FIG. 14

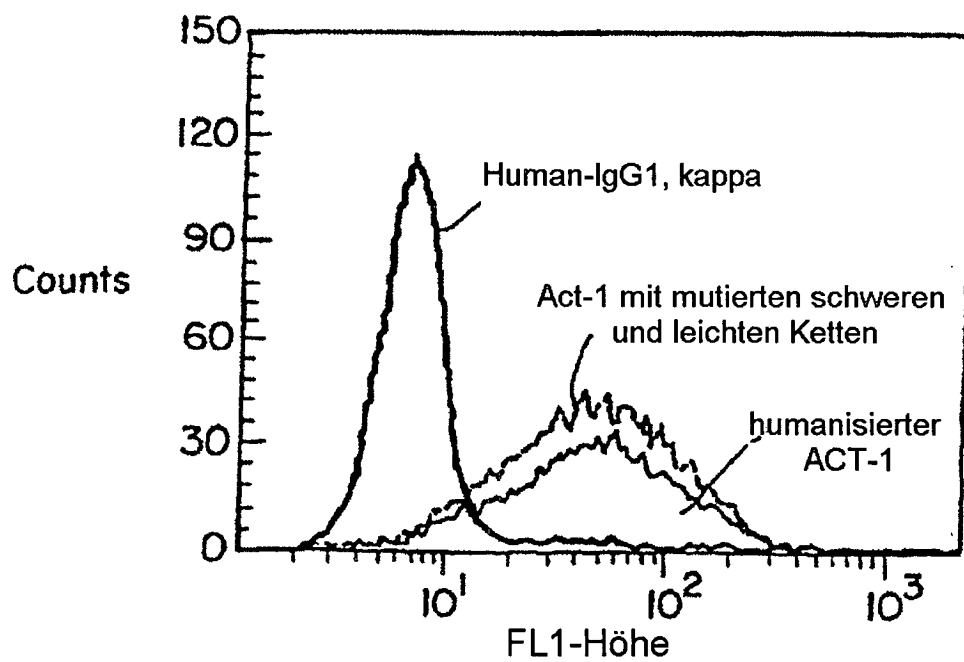


FIG. 19

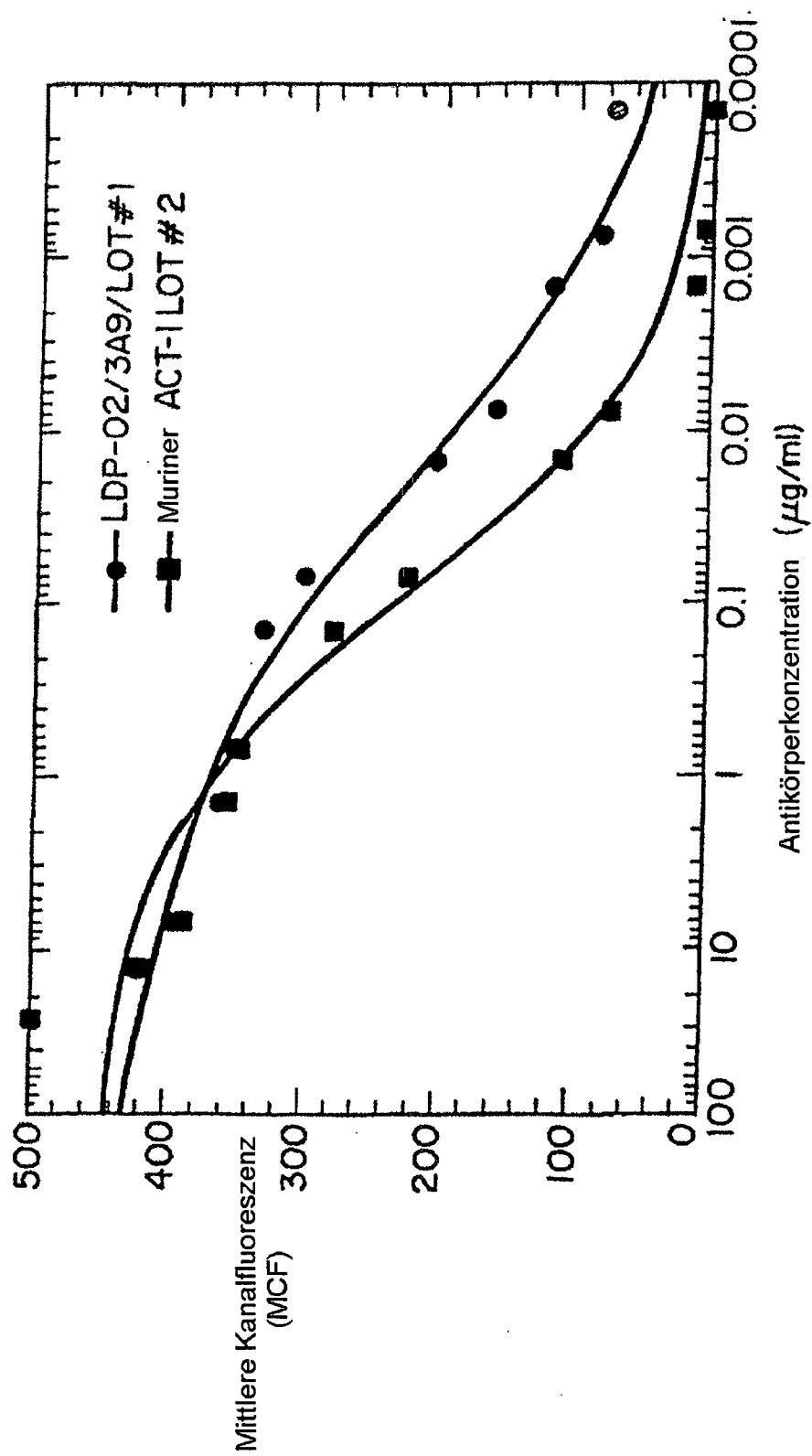


FIG. 15

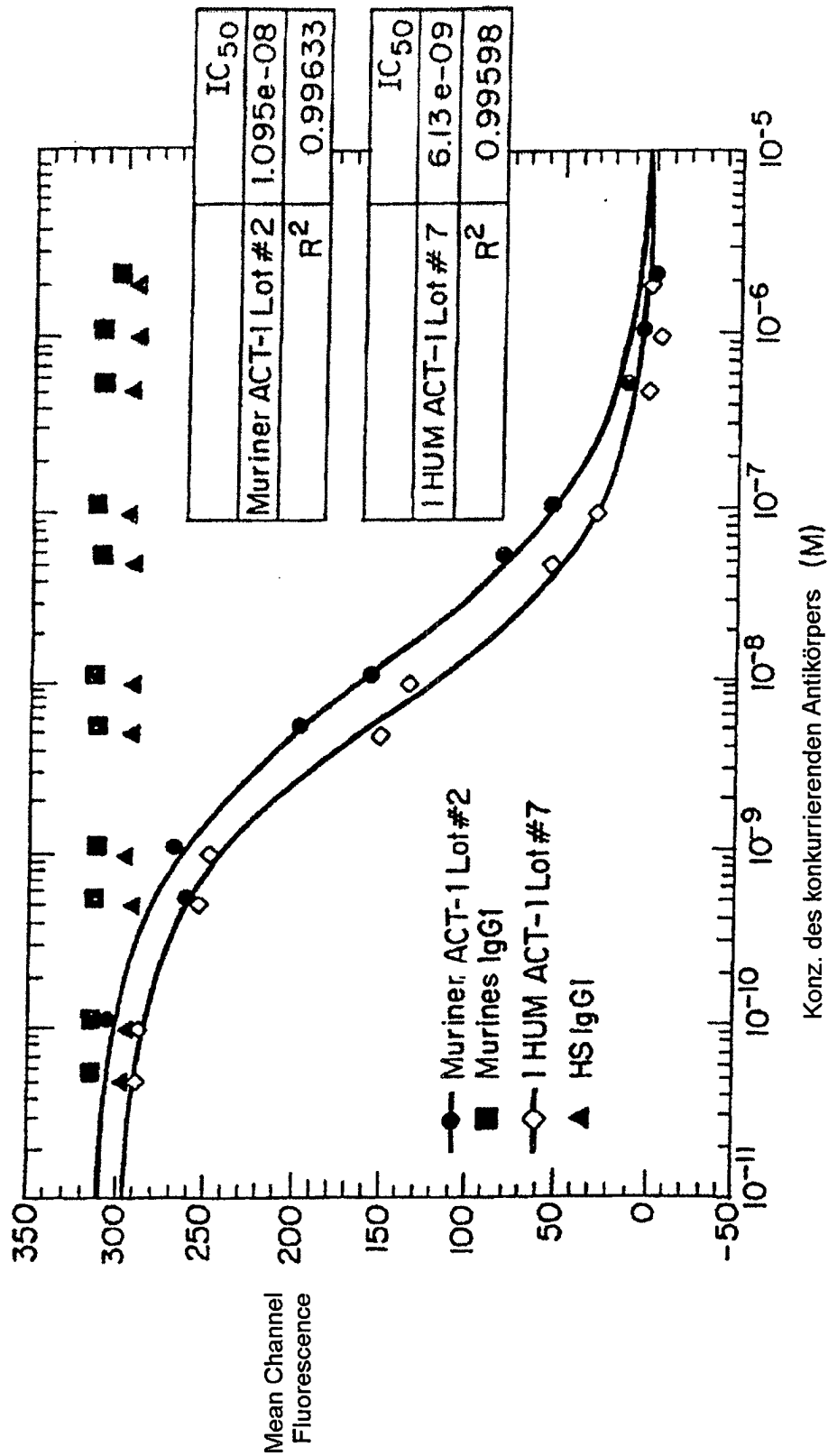


FIG. 16

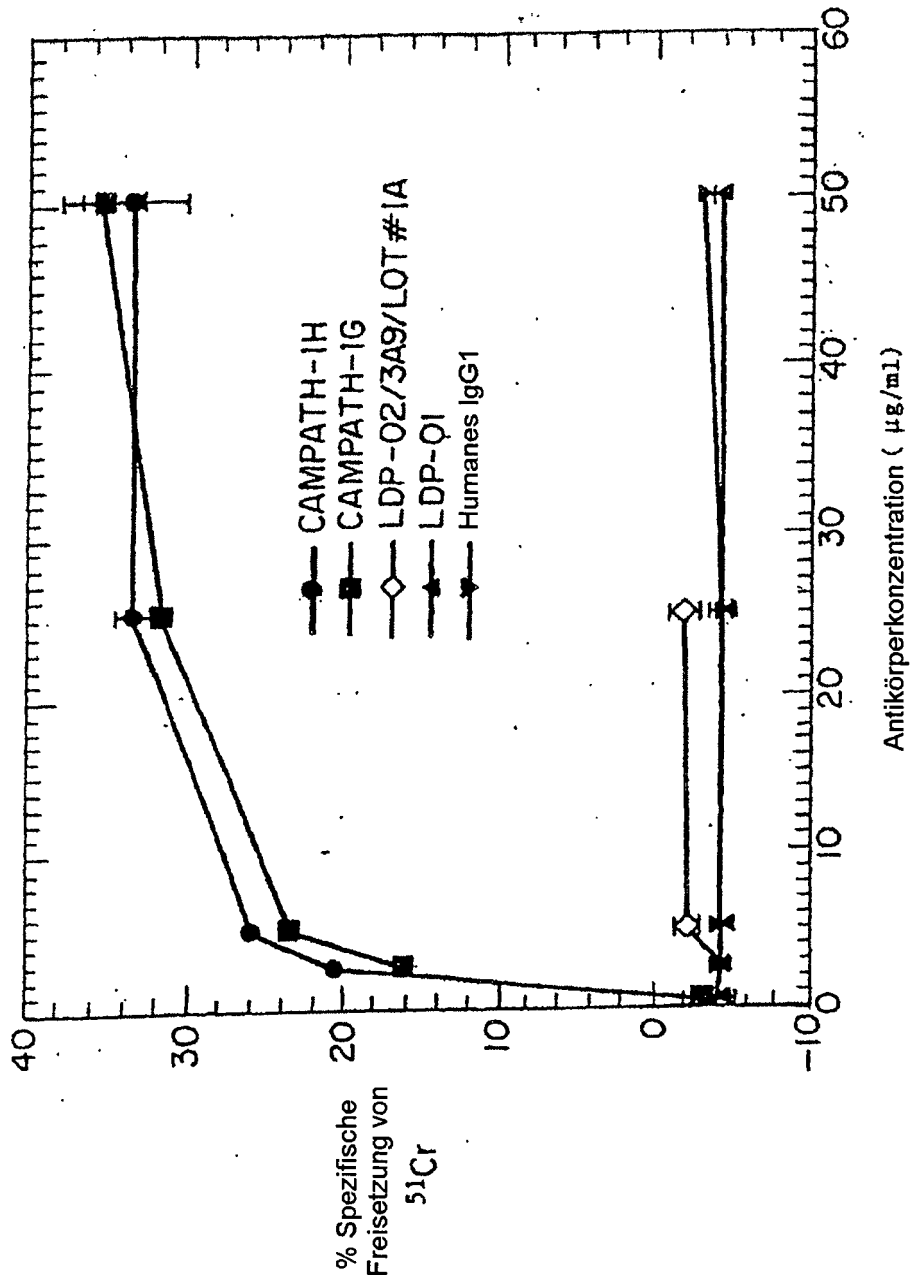


FIG. 17

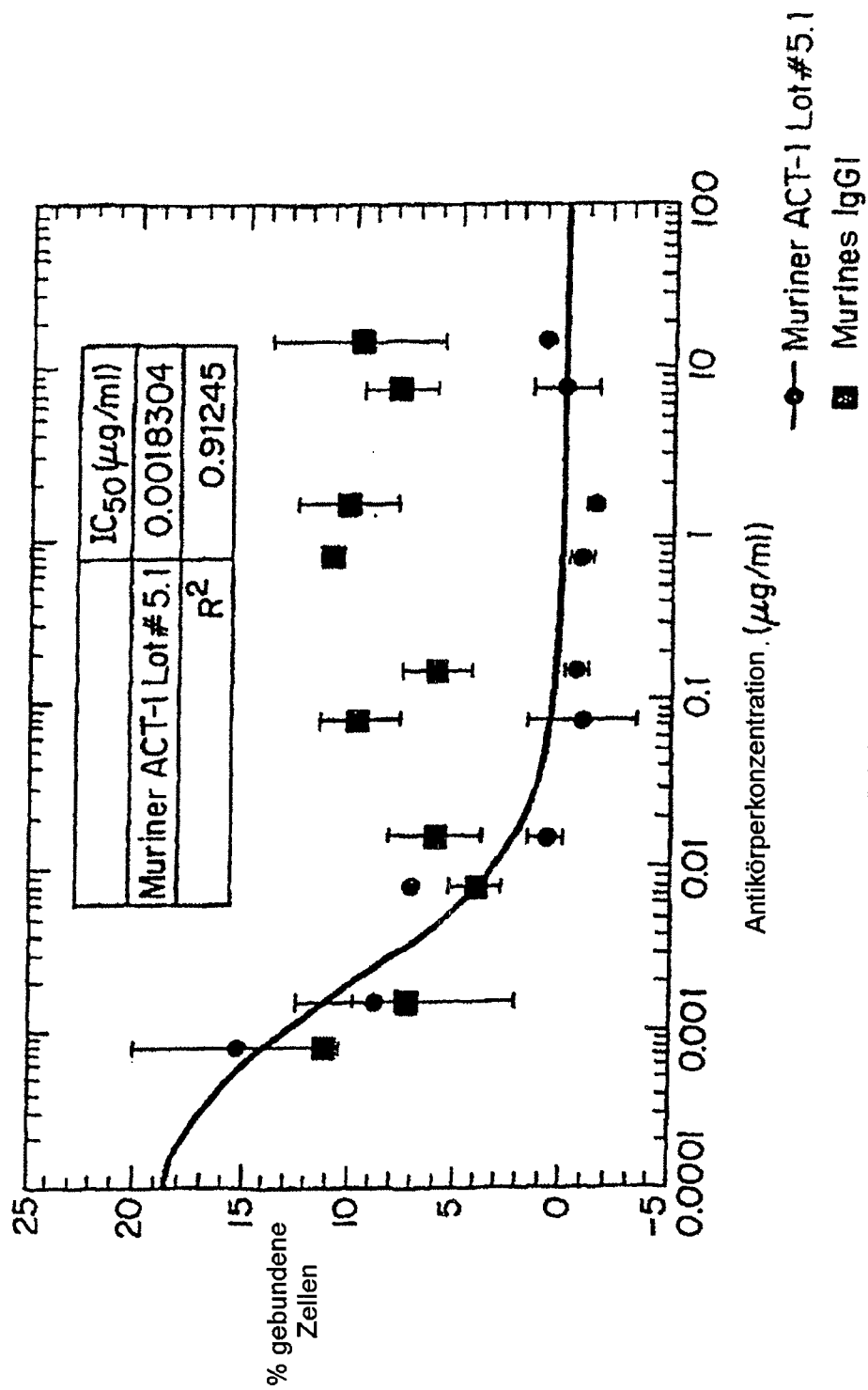


FIG. 18A

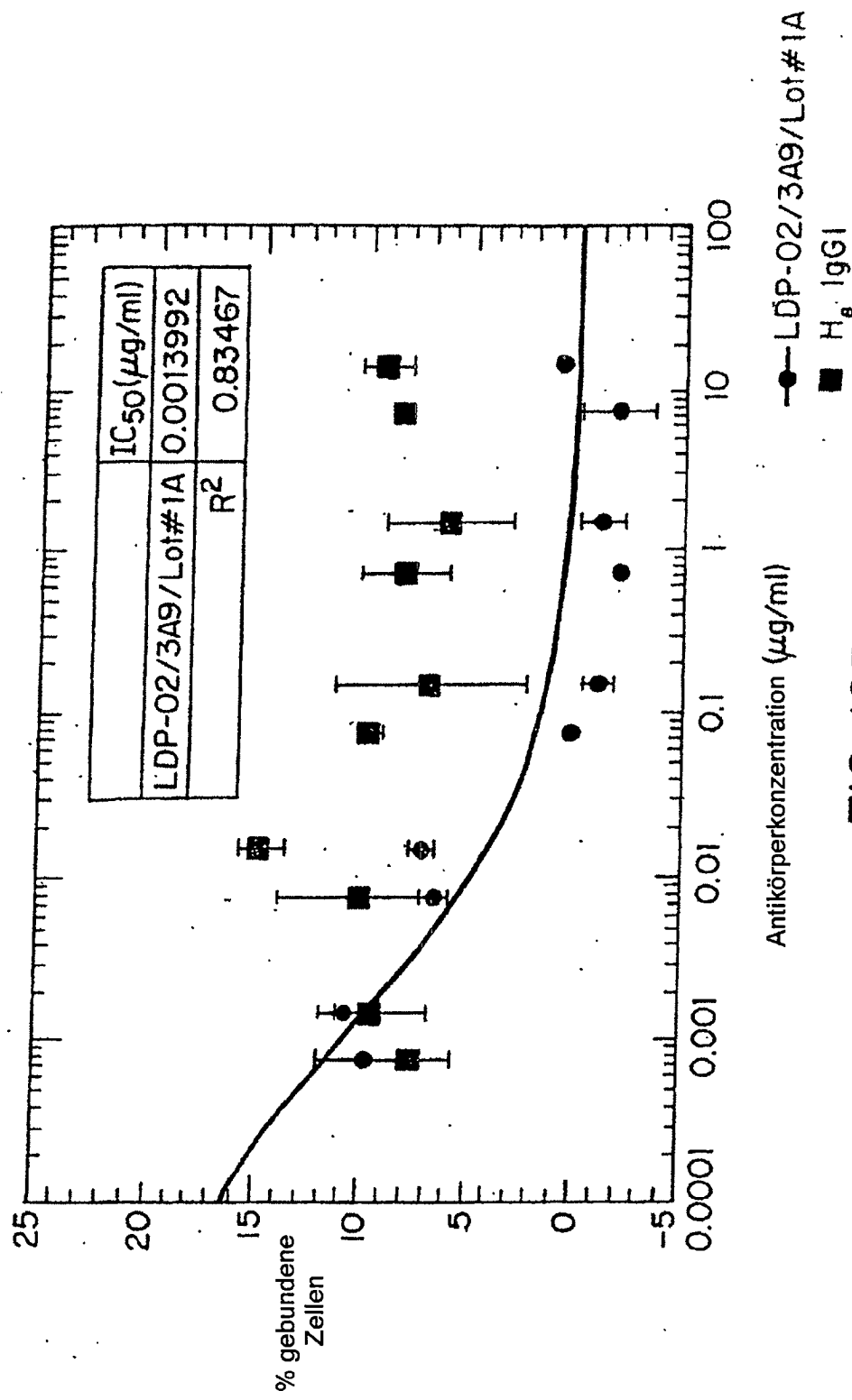


FIG. 18B