



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 14 575 T2 2005.10.13**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 120 464 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 14 575.1**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 204 725.6**

(96) Europäischer Anmeldetag: **21.12.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **01.08.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **06.10.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **13.10.2005**

(51) Int Cl.7: **C12N 15/12**

**C07K 16/00, C12N 15/62, A61K 39/395,**

**A61K 31/7088, G01N 33/577, C12Q 1/68**

(30) Unionspriorität:

**RM990803 30.12.1999 IT**

(73) Patentinhaber:

**Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e  
l'Ambiente (E.N.E.A.), Rom/Roma, IT**

(74) Vertreter:

**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &  
Schwanhäusser, 80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**Benvenuto, Eugenio, 00144 Roma, IT; Franconi,  
Rosella, 00061 Anguillara Sabazia RM, IT;  
Desiderio, Angiola, 00061 Anguillara Sabazia RM,  
IT; Tavladoraki, Paraskevi, 00197 Roma, IT**

(54) Bezeichnung: **Stabilisierende Peptide, und Polypeptide und Antikörper die diese beinhalten**

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**

## Gebiet der Erfindung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft Moleküle, die in der Lage sind, eine spezifische Wechselwirkung mit Zielmolekülen einzugehen.

## Stand der Technik

**[0002]** Moleküle, die zu einer spezifischen Wechselwirkung mit Zielmolekülen in der Lage sind, sind im Stand der Technik bekannt.

**[0003]** Insbesondere sind Antikörper lösliche und stabile Moleküle, von denen bekannt ist, dass sie die Fähigkeit einer Wechselwirkung mit Zielmolekülen aufweisen, die zur gleichen Zeit spezifisch und wirksam ist.

**[0004]** Solche Moleküle werden dementsprechend zur Modulierung der Akkumulierung und/oder Expression von Zielmolekülen in einer Vielzahl von Anwendungen in der Biologie, Medizin und Landwirtschaft verwendet.

**[0005]** Es ist im Allgemeinen in diesen Anwendungen wünschenswert, einen Antikörper mit einer hohen Stabilität zu haben.

**[0006]** Insbesondere gibt es Anwendungen, bei denen es notwendig ist, einen Antikörper zu haben, der besonders stabil ist, bei dem die Wechselwirkung in einer extrem reduzierenden Umgebung durchgeführt werden soll oder kann, wie dem Cytoplasma, zum Beispiel Anwendungen, die durchgeführt werden, um innerhalb einem intrazellulären Kompartiment:

- Wechselwirkungen zwischen Makromolekülen zu blockieren oder stabilisieren (z. B. Protein-Protein- oder Protein-DNA-artige);
- enzymatische Funktionen zu modulieren, die die aktive Stelle betreffen, das Substrat zurückzuhalten oder ein Enzym in seiner aktiven oder inaktiven Struktur blockieren;
- Proteine in ihr normales zelluläres Kompartiment zu entfernen, z. B. Transkriptionsfaktoren im Cytoplasma zurückzuhalten oder Membranrezeptoren in dem endoplasmatischen Reticulum zurückzuhalten;
- mit Pathogen-abgeleiteten Molekülen zu wechselwirken, um den relevanten infektiösen Prozess zu stören;
- cytoplasmatische Moleküle in vivo für diagnostische oder therapeutische Zwecke zu binden (z. B. Onco-Genprodukte).

**[0007]** Unter den Antikörpern, von denen auf dem Gebiet bekannt ist, dass sie diese Merkmale aufweisen, ist scFv(F8), ein im scFv („einkettiges Ketten-variables Fragment“) Format entwickelter Antikörper, einer der repräsentativsten (Tavladoraki et al. 1993).

**[0008]** scFv(F8) zeigt tatsächlich eine signifikante molekulare Stabilität, wie durch Messungen der freien Energie ( $\Delta G$ ) in Denaturierungs- und Renaturierungsexperimenten in vitro nachgewiesen wurde (Tavladoraki et al. 1999).

**[0009]** Dieses Molekül wird auch durch das Folgende charakterisiert:

- hohe Effizienz bei der Faltung (Tavladoraki et al. 1999);
- lange Halbwertszeit innerhalb des Cytoplasma (Tavladoraki et al. 1999);
- Funktionalität in dem Cytoplasma in Bezug auf die Fähigkeit zur Erkennung von Antigenen und Wechselwirkung mit der Replikation des AMCV Virus (Tavladoraki et al. 1993);
- große Expressionsmengen als lösliches Protein in Bakterien- und Pflanzencytoplasma (Tavladoraki et al. 1999);
- die Fähigkeit zur Wechselwirkung mit seinem Antigen in dem Cytoplasma eukaryontischer Zellen in vivo, wie durch Experimente gezeigt wurde, die in dem Hefe „zwei-Hybrid“-System durchgeführt wurden (Visintin et al. 1999).

**[0010]** Untersuchungen des Redoxzustandes des Proteins haben zudem gezeigt, dass keine Disulfidbindung in dem Protein innerhalb des Cytoplasmas ausgebildet wird (Tavladoraki et al. 1999).

**[0011]** ScFv(F8) ist ein sehr interessantes Molekül für biotechnologische Anwendungen, insbesondere für die oben aufgezeigten.

**[0012]** scFv(F8) als solches hat jedoch ein relativ eingeschränktes Anwendungsgebiet, da es nur in der Lage ist, mit AMCV Virus zu wechselwirken.

**[0013]** Im Gegensatz dazu wären „scFv(F9)- ähnliche“ Antikörper (vom funktionellen Gesichtspunkt her), die in der Lage sind, mit Zielmolekülen zu wechselwirken, die nicht AMCV sind, von großem Interesse. Sie würden eine Anzahl von Anwendungen mit spezifischen Zielmolekülen in dem Plasma ermöglichen, oder bei gegebener Stabilität in anderen verschiedenen Umgebungen.

#### Zusammenfassung der Erfindung

**[0014]** Die Aufgabe der Erfindung sind Peptide, die in der Lage sind, Stabilität und Löslichkeit in einem Antikörper zu vermitteln, einschließlich der Antikörper.

**[0015]** Gemäß der vorliegenden Erfindung wird diese Aufgabe durch ein Peptid gelöst, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es eine Sequenz aufweist, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus den Sequenzen besteht, die in der beigefügten Sequenzaufzählung von SEQ ID NO: 1 bis SEQ ID NO: 8 gezeigt werden, und das in einer variable Region eines scFv-Antikörpers mit umfasst ist und den besagten Antikörper in cytoplasmatischem Medium löslich und stabil macht.

**[0016]** Um besagten Antikörper stabil und löslich zu gestalten, sollen die Peptide mit den Sequenzen SEQ ID NO: 1 (H-FR1), SEQ ID NO: 2 (H-FR2), SEQ ID NO: 3 (H-FR3) und SEQ ID NO: 4 (H-FR4), die hierin auch als H-FR-Peptide bezeichnet werden, in der variablen Region der schweren Kette von besagtem Antikörper (VH-Region) mit umfasst sein, kovalent an Peptide mit den Sequenzen gebunden, die in der beigefügten Sequenzaufzählung von SEQ ID NO: 88 (H-CDR1), SEQ ID NO: 89 (H-CDR2) und SEQ ID NO: 90 (H-CDR3) gezeigt werden, die hierin auch als H-CDR-Peptide bezeichnet werden, in der Reihenfolge:  
SEQ ID NO: 1 (H-FR1) – SEQ ID NO: 88 – (H-CDR1) – SEQ ID NO: 2 (H-FR2) – SEQ ID NO: 89 (H-CDR2) – SEQ ID NO: 3 (H-FR3) – SEQ ID NO: 90 (H-CDR3) – SEQ ID NO: 4 (H-FR4).

**[0017]** Gemäß der Anordnung, die in [Fig. 4](#) gezeigt wird.

**[0018]** Die Peptide mit den Sequenzen SEQ ID NO: 5, (L-FR1), SEQ ID NO: 6, (L-FR2), SEQ ID NO: 7, (L-FR3) und SEQ ID NO: 8 (L-FR4), die im Allgemeinen als L-FR-Peptide bezeichnet werden, sollen stattdessen in der variablen Region der leichten Kette von besagtem Antikörper (VL-Region) mit umfasst sein, kovalent gebunden an Peptide mit den Sequenzen, die in der beigefügten Sequenzaufzählung von SEQ ID NO: 91 (L-CDR1), SEQ ID NO: 92 (L-CDR2) und SEQ ID NO: 93 (L-CDR3) gezeigt werden, die hierin auch als L-CDR-Peptide bezeichnet werden, in der Reihenfolge:  
SEQ ID NO: 5 (L-FR1) – SEQ ID NO: 91 – (L-CDR1) – SEQ ID NO: 6 (L-FR2) – SEQ ID NO: 92 (L-CDR2) – SEQ ID NO: 7 (L-FR3) – SEQ ID NO: 93 (L-CDR3) – SEQ ID NO: 8 (L-FR4).

**[0019]** Die H-FR- und L-FR-Peptide werden hiern im Allgemeinen auch FR(Gerüstregion)-Peptide genannt.

**[0020]** Ein Vorteil der FR-Peptide der Erfindung ist die Tatsache, dass sie überraschenderweise die Fähigkeit gezeigt haben, Löslichkeit und Stabilität auf jeglichen Antikörper zu übertragen, einschließlich derer in den oben genannten Reihenfolgen. Besagte stabilisierende Fähigkeit kann zu mindestens in dem Antikörper des scFv-Typs besagten Antikörper sogar in einem reduzierenden Medium, wie dem Cytoplasma, stabil und löslich machen.

**[0021]** Die durch einen scFv-Antikörper mit dieser Anordnung gemäß dem in Tavladoraki et al. 1999 beschriebenen Verfahren vermittelte thermodynamische Stabilität liegt tatsächlich in der gleichen Größenordnung wie bei dem scFv(F8) mit Werten an freier Energie ( $\Delta G$ ) zur Denaturierungs- und Renaturierungsreaktion in vitro in der gleichen Größenordnung wie bei den für scFv(F8) festgestellten (Tavladoraki et al. 1999).

**[0022]** Insbesondere bei pH 7,2 sind die  $\Delta G$ -Werte größer als oder gleich 7 kcal/Mol und insbesondere Werte im Bereich zwischen 7,8 und 10,5 kcal/Mol.

**[0023]** Eine analoge Stabilität kann für Fv- und Dab-Antikörper, die die FR-Peptide der Erfindung umfassen, erzielt werden.

**[0024]** In jedem Fall werden alle Antikörper, die die oben genannten Peptide umfassen, als eine Wirkung des relevanten Mitumfasstseins in der variablen Region der schweren Kette oder leichten Kette stabilisiert. Insbe-

sondere wird dieses bei Konstrukten gezeigt, die als ein Grundgerüst die konstanten Regionen des Immunglobulin-artigen IgG oder IgA verwenden oder auch bei Antikörpern wie Fab, bei denen die Stabilität dieses Konstrukts in jedem Fall verbessert ist.

**[0025]** In einer bevorzugten Ausführungsform der H-Fr-Peptide der Erfindung ist Xaa in Position 24 von H-FR1 (SEQ ID NO: 1) Ala; Xaa in Position 12 von H-FR2 (SEQ ID NO: 2) ist Leu; Xaa in Position 2 von H-FR3 (SEQ ID NO: 3) ist Pro; Xaa in Position 3 von H-FR3 (SEQ ID NO: 3) ist Asp; Xaa in Position 13 von H-FR3 (SEQ ID NO: 3) ist Arg; Xaa in Position 18 von H-FR3 (SEQ ID NO: 3) ist Asn; Xaa in Position 20 von H-FR3 (SEQ ID NO: 3) ist Leu; Xaa in Position 12 von H-FR7 (SEQ ID NO: 7) ist Arg; Xaa in Position 15 von H-FR7 (SEQ ID NO: 7) ist Phe.

**[0026]** Gemäß der Erfindung können alle diese Peptide durch die Mittel einer Reihe von konventionellen Techniken, die auf dem Gebiet bekannt sind, hergestellt werden, wie z. B. rekombinante DNA, aber auch Konstruktionen von synthetischen Polypeptiden.

**[0027]** Das relevante Verfahren zur Herstellung von Peptiden, die einen Antikörper stabilisieren, einschließlich derselben in einer variablen Region, umfassend die folgenden Schritte:

- die Herstellung eines Polypeptids aus einem monoklonalen Antikörper,
- die mutagene Veränderung besagten Polypeptids durch Techniken wie der hierarchischen Mutagenese, Fehler-bedingter PCR, DNA-Mischen oder Ribosomen-Display,

ist als Gegenstand der Erfindung mit umfasst.

**[0028]** Alternativ dazu können besagte Peptide durch chemische Synthese hergestellt werden, wie z. B. durch Translatieren eines Polynukleotids, das diese kodiert.

**[0029]** Die H-CDR- und L-CDR-Peptide der Erfindung werden hierin auch als CDR-(Komplementaritäts-bestimmende Regionen)-Peptide bezeichnet. CDR-Peptide gemäß der vorliegenden Erfindung korrespondieren mit den Teilen der Regionen VH und VL des Antikörpers, die die Bindungsspezifität des Antikörpers bestimmen. Insbesondere H-CDR-Peptide korrespondieren mit den Teilen von VH, und L-CDR-Peptide korrespondieren mit den Teilen von VL, die die Bindungsspezifität des Antikörpers bestimmen.

**[0030]** Die strukturellen Eigenschaften des CDR-Peptids sind derart, dass wenn es in den Polypeptiden VH und VL mit umfasst ist, kovalent an die FR's der Peptide gemäß der oben genannten Anordnung gebunden sind, dass diese Spezifität an einen Antikörper vermitteln, der sie umfasst, ohne seine Stabilität und Löslichkeit zu verändern.

**[0031]** Dem entsprechend hängen deren Sequenzen von dem Antigen ab, das der Antikörper, in dem sie umfasst sind, spezifisch bindet.

**[0032]** Um Peptide herzustellen, die als VH- oder VL-Region eines Antikörpers geeignet sind, kann ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids verwendet werden, das als eine variable Region eines Antikörpers geeignet ist, sowie spezifisch für ein vorbestimmtes Antigen ist, das die folgenden Schritte umfasst:

- die Herstellung eines Antikörpers, der als eine variable Region der schweren Kette das Polypeptid aufweist, das die Sequenz hat, die in der Sequenzauflistung als SEQ ID NO: 101 genannt wird, und als eine variable Region der leichten Kette, das Polypeptid mit der Sequenz, die in der beigefügten Sequenzauflistung als SEQ ID NO: 102 genannt wird;
- das in Kontakt bringen von besagtem Antikörper mit besagtem Antigen und
- das Auswählen des Antikörpers, der besagtes Antigen bindet,
- das Isolieren des Polypeptids der variablen Region der schweren Kette und/oder des Polypeptids der variablen Region der leichten Kette des Antikörpers, der besagtes Antigen bindet.

**[0033]** Dieses Verfahren, welches ein Gegenstand der Erfindung ist, umfasst in einer bevorzugten Ausführungsform zudem den Schritt:

- der Sequenzierung der variablen Regionen von besagtem Antikörper, der besagtes Antigen bindet.

**[0034]** Das zuvor bestimmte Antigen des Verfahrens der Erfindung kann jegliches Antigen von Interesse sein, insbesondere virale, und speziell die Antigene, die mit HIV, HCV und HPV assoziiert sind, wie Tat-, Rev-, E7- oder NS3-Protein, die als bevorzugt angesehen werden. Andere Antigene wie Rinderserumalbumin, Lysozym, AMCV-Virus, „gefleckter welker Tomatenvirus" oder „Gurkenmosaikvirus" werden in einer bevorzugten Ausführungsform

rungsform der Erfindung verwendet.

**[0035]** Gegenstand der Erfindung sind zusätzlich die Polypeptide, die durch das oben genannte Verfahren herstellbar sind, die zur Herstellung der variablen Region der schweren Kette (VH) oder der leichten Kette (VL) eines gegebenen Antikörpers geeignet sind.

**[0036]** Bezüglich der Polypeptide der Erfindung werden Polypeptide, die zur Herstellung der VH-Region eines Antikörpers geeignet sind, hierin auch als VH-Polypeptide bezeichnet, Polypeptide, die zur Herstellung der VL-Region eines Antikörpers geeignet sind, werden hierin auch als VL-Polypeptide bezeichnet.

**[0037]** Insbesondere sind diesbezüglich die folgenden VH- und VL-Polypeptide Gegenstand der vorliegenden Erfindung:

- VH-F8 (SEQ ID NO: 31) und VL-F8 (SEQ ID NO: 32), die jeweils die VH- und VL-Regionen von spezifischen AMCV-Antikörpern darstellen, und insbesondere von scFv(F8);
- VH-LYS/P5 (SEQ ID NO: 33) und VL-LYS/P5 (SEQ ID NO: 34), die jeweils die VH- und VL-Regionen von Antikörpern konstituieren, die spezifisch für das Lysozym sind;
- VH-LYS/11E (SEQ ID NO: 35) und VL-LYS/11E (SEQ ID NO: 36), die die VH- und VL-Regionen jeweils von spezifischer Antikörpern für das Lysozym konstituieren;
- VH-BSA/9F (SEQ ID NO: 37) und VL-BSA/9F (SEQ ID NO: 38), die jeweils die VH und VL-Regionen von Antikörpern konstituieren, die spezifisch für Rinderserumalbumin sind;
- VH-TSWV (BR01)/6H (SEQ ID NO: 39) und VL-TSWV (BR01)/6H (SEQ ID NO: 40), die jeweils die VH- und VL-Regionen von Antikörpern konstituieren, die spezifisch für den "gefleckten welken Tomatenvirus" sind;
- VH-TSWV (P105)/1C (SEQ ID NO: 41) und VL-TSWV (P105)/1C (SEQ ID NO: 42), die jeweils die VH- und VL-Regionen von Antikörpern konstituieren, die spezifisch für den „gefleckten welken Tomatenvirus“ sind;
- VH-CMV/4G (SEQ ID NO: 43) und VL-CMV/4G (SEQ ID NO: 44), die jeweils die VH und VL-Regionen von Antikörpern konstituieren, die spezifisch für den „Gurkenmosaikvirus“ sind;
- VH-CMV/4B (SEQ ID NO: 45) und VL-CMV/4B (SEQ ID NO: 46), die jeweils die VH und VL-Regionen von Antikörpern konstituieren, die spezifisch für den „Gurkenmosaikvirus“ sind; und
- VH-CMV/2G (SEQ ID NO: 47) und VL-CMV/2G (SEQ ID NO: 48), die jeweils die VH und VL-Regionen von Antikörpern konstituieren, die spezifisch für den „Gurkenmosaikvirus“ sind.

**[0038]** Auf der Basis der Polypeptide der Erfindung können spezifische CDR-Peptide hergestellt werden, die Bindungsspezifität den Antikörpern vermitteln, die diese umfassen.

**[0039]** Besagte CDR-Peptide können durch ein Verfahren zur Herstellung eines Peptids hergestellt werden, das einem Antikörper Bindungsspezifität für ein vorbestimmtes Antigen vermittelt, das die folgenden Schritte umfasst:

- die Herstellung eines Antikörpers, der als eine variable Region der schweren Kette das Polypeptid aufweist, das die Sequenz hat, die in der Sequenzaufstellung als SEQ ID NO: 101 gezeigt wird, und als eine variable Region der leichten Kette das Polypeptid mit der Sequenz, die in der Sequenzaufstellung als SEQ ID NO: 102 genannt wird;
- das in Kontakt bringen von besagtem Antikörper mit besagtem Antigen und
- das Auswählen des Antikörpers, der besagtes Antigen bindet,
- das Isolieren des Polypeptids der variablen Region der schweren Kette und/oder des Polypeptids der variablen Region der leichten Kette des Antikörpers, der besagtes Antigen bindet;
- das Isolieren des Teils von besagtem Antikörper, der die Bindungsspezifität des besagten Antikörpers vermittelt.

**[0040]** In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das oben genannte Verfahren zusätzlich den folgenden Schritt:

- des Sequenzierens der variablen Regionen von besagtem Antikörper, der besagtes Antigen bindet.

**[0041]** Das Antigen kann jegliches Antigen sein und ist vorzugsweise eines der oben beschriebenen.

**[0042]** Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch all diejenigen Peptide, die durch das oben beschriebene Verfahren herstellbar sind.

**[0043]** Insbesondere die Peptid-CDRs, die die folgende Bindungsspezifität für:

- ACMV (Artischocken – Flecken – Kräuselvirus) in dem Antikörper scFv (F8) mit jeweils den Sequenzen SEQ ID NO: 9 (H-CDR1-F8), SEQ ID NO: 10 (H-CDR2-F8), SEQ ID NO: 11 (H-CDR3-F8), SEQ ID NO: 12 (L-CDR1-F8), SEQ ID NO: 13 (L-CDR2-F8) und SEQ ID NO: 14 (L-CDR3-F8);
- Lysozym (insbesondere Lysozym aus Hühnereialbumin) mit den Sequenzen SEQ ID N: 97 (H-CDR1-LYS/P5), SEQ ID NO: 98 (H-CDR2-LYS/P5), SEQ ID NO:15 (H-CDR3-LYS/P5), SEQ ID NO: 99 (L-CDR1-LYS/P5), SEQ ID NO: 100 (L-CDR2-LYS/P5) und SEQ ID NO: 16 (L-CDR3-LYS/P5) ergeben,

sind weitere Gegenstände der Erfindung.

**[0044]** Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch all die Peptid- H-CDR3 und L-CDR3, wie sie oben definiert werden, die Bindungsspezifität an die Antikörper, die diese in den VH- und VL-Polypeptiden umfassen, für Antigene, die sich von ACMV unterscheiden, vermitteln, wobei das ursprüngliche H-CDR3-F8 und L-CDR3-F8 zusammen mit anderen Peptiden H-CDR1, H-CDR2 und L-CDR2 von F8 und mit den Peptiden L-CDR1-MUT (SEQ ID NO: 76) substituiert wird, die anstatt des Peptids L-CDR1-F8 mit umfasst sind, gemäß der Anordnung, die in [Fig. 7](#) gezeigt wird.

**[0045]** Unter diesen sind ein besonderer Gegenstand der Erfindung die Peptide H-CDR3 und L-CDR3, die die folgende Spezifität ergeben:

- Lysozym (H-CDR3-LYS/11 E, SEQ ID NO: 17 und L-CDR3-LYS/11 E, SEQ ID NO: 18),
- Rindersen.imalbumin (H-CDR3-BSA/9F, SEQ ID NO: 19 und L-CDR3-BSA/9F, SEQ ID NO: 20),
- „geflecktes welkes Tomatenvirus“- Nukleoprotein (H-CDR3-TSWV (BR01)/6H, SEQ ID NO: 21 und L-CDR3-TSWV (BR01)/6H, SEQ ID NO:22; H-CDR3-TSVW (P105/1C, SEQ ID NO: 23 und L-CDR3-TSWV (P105)/1C, SEQ ID NO: 24), und
- „Gurkenmosaikvirus“ (H-CDR3-CMV/4G, SEQ ID NO: 25 und L-CDR3-CMV/4G, SEQ ID NO: 26; jedoch auch H-CDR3-CMV/4B, SEQ ID NO: 27 und L-CDR3-CMV/4B, SEQ ID NO:28; und letztendlich H-CDR3-CMV/2G, SEQ ID NO:29 und L-CDR3-CMV/2G, SEQ ID NO:30).

**[0046]** Der Begriff „H-CDR3“ in [Fig. 7](#) zeigt die Position der Peptide H-CDR3-LYS/11E, H-CDR3-BSA/9F, H-CDR3-TSWV (BR01)/6H, H-CDR3-TSWV (P105)/1C, H-CDR3-CMV/4G, H-CDR3-CMV/4B in der VH-Region. Der Begriff „L-CDR3“ zeigt die Position der Peptide L-CDR3-LYS/11 E, L-CDR3-BSA/9F, L-CDR3-TSVW (BR01)/6H, L-CDR3-TSWV (P105)/1 C, L-CDR3-CMV/4G und L-CDR3-CMV/4B in der VH-Region.

**[0047]** Das L-CDR1-MUT-Peptid (SEQ ID NO: 94) stellt auch einen Gegenstand der vorliegenden Erfindung dar.

**[0048]** All die oben genannten CDR-Peptide können zum Nachweis von Molekülen von Interesse in einer Probe gemäß den auf dem Gebiet bekannten Techniken verwendet werden; besagte Verwendung wird als von dem Gegenstand der Erfindung mit umfasst angesehen.

**[0049]** Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung wird auch durch all diejenigen Antikörper gegeben, die mindestens eines der oben erwähnten VH- und VL-Polypeptide der vorliegenden Erfindung umfassen.

**[0050]** Diesbezüglich sind nicht nur hergestellte Antikörper des scFv-Typs, sondern auch hergestellte Antikörper des Fab-, Fv, dAb-Typs sowie alle Immunglobuline, insbesondere diejenigen des IgG- und IgA-Typs, Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

**[0051]** Insbesondere sind Gegenstand der vorliegenden Erfindung der hergestellte Antikörper scFv (F8) (SEQ ID NO: 49) und die scFv-Antikörper: scFv (P5) (SEQ ID NO: 50), scFv (LYS11E), scFv (BSA9F), scFv (BR01-6H), scFv (P105-1C), scFv (CMV-4G, scFv (CMV4B) und scFv (CMV-2G).

**[0052]** Solche scFv-Antikörper sind durch das Verbinden der jeweiligen VH- und VL-Polypeptide mit einem Linker herstellbar, der kovalent an das carboxyterminale Ende des VH-Polypeptids durch sein aminoterminal Ende und an das aminoterminal Ende des VL-Polypeptids durch sein carboxyterminales Ende gebunden ist (siehe das Diagramm in [Fig. 2](#)).

**[0053]** Dieser Linker kann einer von denjenigen Linkern sein, von denen auf dem Gebiet bekannt ist, dass sie für die Verbindung von VH- und VL-Polypeptiden geeignet sind. Insbesondere kann der Linker derjenige mit der Sequenz sein, die als SEQ ID NO: 51 in der Auflistung der Sequenzen in der Anlage gezeigt wird.

**[0054]** Alle Varianten der oben erwähnten Peptide und Polypeptide oder der Antikörper, die diese enthalten,

müssen auch

- ein Mutein der oben genannten FR- und CDR-Peptide, VH- und VL-Polypeptide und Antikörper, die diese umfassen,
- ein Molekül, das mindestens eines der oben genannten FR- und CDR-Peptide, VH- und VL-Polypeptide und Antikörper, die diese umfassen, oder zu mindestens eines der relevanten Muteine, umfasst
- ein Fragment oder ein Teil der oben genannten FR- und CDR-Peptide, VH- und VL-Polypeptide und Antikörper, die diese umfassen, oder mindestens eines der relevanten Muteine,
- ein Fragment oder ein Teil der Moleküle, das mindestens eines der oben genannten FR- und CDR-Peptide, VH- und VL-Polypeptide und Antikörper, die diese umfassen, oder mindestens eines der relevanten Muteine umfasst,

wobei alle im Wesentlichen aus mindestens einem der oben genannten FR- und CDR-Peptide, VH- und VL-Polypeptide und Antikörpern, die diese umfassen, bestehen.

**[0055]** Jedes Molekül, das direkt oder indirekt aus einem der Peptide, Polypeptide oder Antikörper der vorliegenden Erfindung abgeleitet ist und insbesondere diejenigen mit den Sequenzen, die in der beigefügten Sequenzaufzählung genannt werden, muss als im Wesentlichen aus einem der besagten Peptide, Polypeptide und Antikörper bestehend angesehen werden, wenn:

- Varianten der oben genannten Peptide/Polypeptide in Antikörpern enthalten sind, die zu mindestens in dem Cytoplasma einer Zelle funktionell und stabil sind;
- Varianten der oben genannten Antikörper selbst ein Antikörper sind, der zu mindestens in einem cytoplasmatischen Kompartiment funktionell und stabil ist.

**[0056]** Für die Zwecke der vorliegenden Anmeldung ist ein Mutein der oben genannten Peptide / Polypeptide / Antikörper ein zu dem ursprünglichen Peptid / Polypeptid / Antikörper ähnliches, so dass es als eine Ableitung des zweiten von dem ersten angesehen werden kann.

**[0057]** Ein Fragment von mindestens einem der oben genannten Peptide / Polypeptide / Antikörper oder einem seiner Muteine oder eines größeren Moleküls, das dieses umfasst, wird für die Zwecke der Erfindung durch ein Molekül wiedergegeben, bei dem eine oder mehrere Aminosäuren des ursprünglichen Peptids oder Muteins trunziert wurden.

**[0058]** In Bezug auf das größere Molekül, das mindestens eines dieser Peptide / Polypeptide / Antikörper und/oder Muteine umfasst, kann der Anteil des Moleküls, der sich von diesen Peptiden und/oder Muteinen unterscheidet, teilweise oder vollständig mit der Sequenz von scFv (F8) übereinstimmen.

**[0059]** Alle diese Moleküle können durch Mittel einer Reihe konventioneller Techniken, die auf dem Gebiet bekannt sind, hergestellt werden, wie z. B. durch rekombinante DNA, aber auch durch Konstruktionen von synthetischen Polypeptiden.

**[0060]** Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung wird durch Polynukleotide wiedergegeben (sowohl Polydeoxyribonukleotide wie auch Polyribonukleotide), die für die Peptide / Polypeptide der vorliegenden Erfindung oder deren Varianten kodieren. Insbesondere sind die Polynukleotide mit den folgenden genannten Sequenzen:

SEQ ID NO: 52 (H-FR3-F8), SEQ ID NO: 54 (H-FR2-F8), SEQ ID NO: 56 (H-FR3-F8), SEQ ID NO: 58 (H-FR4-F8), SEQ ID NO: 60 (L-FR1-F8), SEQ ID NO: 62 (L-FR2-F8), SEQ ID NO: 64 (L-FR3-F8), SEQ ID NO: 66 (L-FR4-F8), SEQ ID NO: 68 (H-CDR1-F8), SEQ ID NO: 70 (H-CDR2-F8), SEQ ID NO: 72 (H-CDR3-F8), SEQ ID NO: 74 (L-CDR1-F8), SEQ ID NO: 76 (L-CDR2-8) und SEQ ID NO: 78 (L-CDR3-F8), SEQ ID NO: 80 (VH-F8) und SEQ ID NO: 82 (VL-F8), SEQ ID NO: 95 (L-CDR1-MUT) in dem Gegenstand der vorliegenden Erfindung mit umfasst.

**[0061]** Von der vorliegenden Erfindung mit umfasst sind auch Polynukleotide, die für die hergestellten Antikörper kodieren, die unter Verwendung der Peptide / Polypeptide der vorliegenden Erfindung erhalten werden, und insbesondere diejenigen mit den Sequenzen SEQ ID NO: 84 (scFv (F8) und SEQ ID NO:8 6 (scFv (P5)).

**[0062]** Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung wird durch Peptide / Polypeptide, hergestellte Antikörper, insbesondere für die Therapie von allen pathologischen Zuständen wiedergegeben, die mit der Akkumulation von mindestens einem Molekül in einer intra- oder extrazellulären Umgebung assoziiert sind. Hier wird insbesondere auf infektiöse, Tumor-, metabolische und immunbedingte (insbesondere autoimmunbedingte) Pathologien hingewiesen. In Bezug auf die infektiösen Pathologien wird insbesondere auf solche aufmerk-

sam gemacht, die mit Viren assoziiert sind, entweder in Tieren (siehe z. B. Pathologien, die mit HIV, insbesondere HIV-1, HPV, Herpesvirus oder HCV-Virus im Menschen assoziiert sind) oder in Pflanzen (siehe z. B. die Pathologien, die mit CMV oder TSWV-Viren in Tomaten assoziiert sind).

**[0063]** Zudem auch die pharmazeutischen Zusammensetzungen, die eine therapeutisch wirksame Menge von mindestens einem der oben genannten Peptide, Polypeptide, Antikörper und/oder Varianten davon und/oder eine therapeutisch wirksame Menge von mindestens einem der oben genannten Polynukleotide und ein pharmazeutisch geeignetes Trägermittel umfassen.

**[0064]** Das pharmazeutisch verträgliche Trägermittel oder Hilfsmittel kann jegliches Trägermittel oder Hilfsmittel sein, von dem auf dem Gebiet bekannt ist, dass es zur Herstellung pharmazeutischer Zusammensetzungen geeignet ist, oder ein Material, das die oben genannten Moleküle enthält. Insbesondere kann gemäß der Erfindung solch ein Trägermittel ein flüssiges oder festes Trägermittel sein, die verwendet werden, oder von dem ein Fachmann auf dem Gebiet weiß, dass es für Protein und Antikörper geeignet ist.

**[0065]** Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren für die Behandlung von Pathologien, die mit der Akkumulierung eines Moleküls innerhalb oder außerhalb einer menschlichen, tierischen Zelle assoziiert sind, das den folgenden Schritt umfasst:

- die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge eines oben genannten Antikörpers oder einer Variante davon an ein Subjekt, das dessen bedarf.

**[0066]** Insbesondere kann besagte Verabreichung parenteral zur Behandlung von Krebs und Pathologien, die damit assoziiert sind, oder durch den oralen Weg als passive Immuntherapie gemäß den dem Fachmann auf dem Gebiet bekannten Verabreichungstechniken verabreicht werden.

**[0067]** Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren zur Behandlung von Pathologien, die mit der Akkumulierung eines Moleküls innerhalb oder außerhalb einer menschlichen, tierischen oder pflanzlichen Zelle assoziiert sind, das den folgenden Schritt umfasst:

- die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge der oben genannten Polynukleotide oder einer Variante davon, die für die Antikörper der vorliegenden Erfindung kodieren, an ein Subjekt, das deren bedarf.

**[0068]** Besagte Verabreichung soll durch das Einfügen besagter Polynukleotide in Vektoren durchgeführt werden, die zur Transfektion geeignet sind. Gemäß der vorliegenden Erfindung können jegliche Vektoren verwendet werden, insbesondere die viralen, die derzeit von einem Fachmann auf dem Gebiet zur Behandlung eines Subjekts, das dessen bedarf, für diesen Zweck adaptiert werden.

**[0069]** Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der oben genannten Antikörper und/oder Polynukleotide oder Varianten davon zur Behandlung von Pathologien, die mit der Akkumulierung eines Moleküls innerhalb oder außerhalb der menschlichen, tierischen oder pflanzlichen Zelle assoziiert sind.

**[0070]** Die Verwendung von diesen oben genannten Peptiden /Polypeptiden / Antikörpern oder einer Variante davon zur Diagnose dieser Pathologien ist auch von dem Gegenstand der vorliegenden Erfindung mit umfasst.

**[0071]** Insbesondere können solche Moleküle, die an Gene fusioniert sind, die für ein Protein, das eine enzymatische Aktivität (d. h. alkalische Phosphatase) aufweist, oder Reporterproteine, wie grünes fluoreszierendes Protein, kodieren, in diagnostischen Anwendungen verwendet werden. Andere Reportergene oder Proteine, die auf dem Gebiet bekannt sind, können genauso gut in der diagnostischen Anwendung verwendet werden.

**[0072]** Unter den diagnostischen Anwendungen, bei denen die Antikörper der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, ist das Bild-gebende Verfahren besonders bevorzugt.

**[0073]** Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein diagnostischer Kit, der die oben genannten Moleküle als Reagenzien umfasst, und insbesondere ein diagnostischer Kit für infektiöse Pathologien, der dahingehend charakterisiert ist, dass er mindestens eine Zusammensetzung umfasst, die mindestens eines der oben genannten Polynukleotide, Peptide, Polypeptide, Antikörper und/oder eine Variante davon umfasst.

**[0074]** Mit umfasst in dem Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung der oben genannten Antikörper zur Identifizierung neuer Moleküle und/oder deren relevanter Funktion.

**[0075]** Eine solche Identifizierung kann z. B. gemäß Techniken durchgeführt werden, die auf dem Gebiet bekannt sind, die als Genomstudien und Proteomstudien bezeichnet werden.

**[0076]** Insbesondere ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung die Verwendung der oben genannten Peptide / Polypeptide / Antikörper oder einer Variante davon zur Herstellung von Molekülen, die in der Therapie von infektiöser Pathologie verwendet werden sollen und der relevante Kit umfasst mindestens eines dieser Peptide / Polypeptide / Antikörper oder eine Variante davon als ein Reagenz.

**[0077]** Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch eine Zusammensetzung, die für experimentelle Anwendungen geeignet ist, die mindestens eines der oben genannten Moleküle und einen damit chemisch kompatiblen Träger umfasst.

**[0078]** Dieser chemisch kompatible Träger kann jeglicher Träger sein, der auf dem Gebiet dahingehend bekannt ist, dass er für pharmazeutische Zusammensetzungen geeignet ist, oder ein Material, das die oben genannten Moleküle enthält.

**[0079]** Insbesondere kann gemäß der Erfindung ein solcher Träger ein flüssiger oder fester Träger sein, der verwendet wird, von dem ein Fachmann auf dem Gebiet jedoch weiß, dass er für Protein und Antikörper geeignet ist.

**[0080]** Die Erfindung wird besser mit Hilfe der Figuren im Anhang beschrieben werden.

#### Beschreibung der Figuren

**[0081]** [Fig. 1](#) zeigt die Anordnung der Peptide der vorliegenden Erfindung in den VH- und VL-Polypeptiden eines Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung.

**[0082]** [Fig. 2](#) zeigt die Verbindung der VH- und VL-Polypeptide der vorliegenden Erfindung in Antikörpern des scFv-Typs.

**[0083]** [Fig. 3](#) zeigt das zusammenfassende Diagramm der Modifikationen der Sequenz von scFv(F8), die die tatsächlichen Eigenschaften der Stabilität des Antikörpers nicht verändern. Die Regionen (FR und CDR) sind gemäß AbM (Oxford Molecular Ltd) individualisiert und die Nummerierung entspricht Kabat (Kabat et al. 1991).

**[0084]** Die in grau gefärbten Quadraten gezeigten Reste sind die Reste, die unverändert verbleiben müssen, die Reste, die in schwarz gefärbten Quadraten gezeigt werden, sind die Reste, die mit jeglicher Aminosäure substituiert werden können, die Reste, die in weißen Quadraten gezeigt werden, sind wie folgt modifizierbar:

- der Rest VH 24 ist mit Resten von äquivalenter chemischer Natur substituierbar;
- der Rest VH 47 ist mit Resten von äquivalenter chemischer Natur substituierbar;
- der Rest VH 52 ist mit Resten von äquivalenter chemischer Natur oder unterschiedlicher chemischer Natur substituierbar oder kann durch Deletion eliminiert werden;
- der Rest VH 60 ist mit Resten von äquivalenter chemischer Natur oder unterschiedlicher chemischer Natur substituierbar;
- der Rest VH 61 ist mit Resten äquivalenter chemischer Natur oder unterschiedlicher chemischer Natur substituierbar;
- der Rest VH 71 ist mit Resten äquivalenter chemischer Natur substituierbar;
- der Rest VH 76 ist mit Resten äquivalenter chemischer Natur substituierbar;
- der Rest VH 78 ist mit Resten äquivalenter chemischer Natur substituierbar;
- die Reste VH 100 – 1000 sind mit Resten äquivalenter chemischer Natur oder unterschiedlicher Natur substituierbar oder können durch Deletion eliminiert werden;
- die Reste VL 27C – 29 sind mit Resten äquivalenter chemischer Natur oder unterschiedlicher chemischer Natur substituierbar oder können durch Deletion eliminiert werden;
- der Rest VL 68 ist mit Resten äquivalenter chemischer Natur oder unterschiedlicher chemischer Natur substituierbar;
- der Rest VL 71 ist mit Resten äquivalenter chemischer Natur oder unterschiedlicher chemischer Natur substituierbar.

**[0085]** [Fig. 4](#) zeigt ein zusammenfassendes Diagramm der Strategie der Mutagenese, die mittels rationaler Substitutionen der VH- und VL-Polypeptide des Antikörpers scFv(F8) verwendet wurde. Die tatsächlichen Aminosäurereste der Sequenz von scFv(F8) werden in normalen Buchstaben gezeigt, die Aminosäuren der Se-

quenz von scFv (D1.3) (Bhat et al. 1990) werden in unterstrichenen Buchstaben gezeigt. Die Sequenzen werden für alle Produkte der intermediären Mutagenese (P1, P2, P3 und P4) gezeigt und für das letzte Produkt der Mutagenese (P5), so dass die Änderungen (Substitutionen und Deletionen), die mit der ursprünglichen Sequenz von scFv(F8) durchgeführt worden sind, durch Unterstreichung markiert sind.

**[0086]** [Fig. 5](#) zeigt die Modifikation, die auf dem CDR1 des VL gemäß dem Ansatz zufälliger Mutationen für die Herstellung von Mutanten von scFv(F8) bewirkt wurde.

**[0087]** [Fig. 6](#) zeigt die Oligonukleotide, die als Primer für die Herstellung der „Monoscaffold“-Bibliothek, wie sie in den Beispielen beschrieben wird, verwendet wurde.

**[0088]** Der Begriff „N“ bedeutet jegliches Nukleotid, der Begriff „M“ zeigt das dATP- oder dCTP-Nukleotid an.

**[0089]** [Fig. 7](#) zeigt die Struktur der Peptide der vorliegenden Erfindung in den VH- und VL-Polypeptiden der Antikörper, in denen die Bindungsspezifität insbesondere durch die H-CDR3- und L-CDR3-Peptide vorgegeben wird.

#### Detaillierte Beschreibung der Erfindung

**[0090]** Wie oben erwähnt, sind die Peptide der vorliegenden Erfindung in der Lage, die Antikörper, die diese umfassen, sogar in einer reduzierenden Umgebung stabil zu gestalten.

**[0091]** Regionen, die die Komplementarität (CDR) mit dem Antigen bestimmen sowie Gerüstregionen (FR) des scFv(F8)-Antikörpers wurden durch Sequenzieren gemäß den auf dem Gebiet bekannten Kriterien identifiziert.

**[0092]** ScFv(F8) wurde als ein Gerüst verwendet, auf das neue Spezifitäten entweder durch „loop grafting“ („rationaler Ansatz“) oder durch Mutation und Selektion durch Repertoiregenerierung („molekulare Evolution“) hergestellt wurden. Antikörper, die durch positionsgerichtete Mutagenese hergestellt wurden, wurden analysiert, um die Beibehaltung der Stabilität und Löslichkeit in cytoplasmatischer Umgebung zu verifizieren sowie die Annahme einer Bindungsspezifität, die sich von AMCV unterscheidet.

**[0093]** In dem „rationalen Ansatz“ wurden Reste von sowohl CDR- wie auch FR-Regionen mit Resten von scFv (D1.3) substituiert, die Lysozym erkennen, wohingegen bei der „molekularen Evolution“ Reste der CDR3-Regionen zufällig substituiert wurden und die Bindungseigenschaften des resultierenden scFv überprüft wurden. Diese Experimente zeigten, dass das scFv(F8) Gerüst die Substitution definierter Reste in sowohl den CDR- wie auch FR-Regionen toleriert, die neu in Bezug auf die Beibehaltung der Stabilität des Antikörper scFv(F8) (siehe insbesondere [Fig. 3](#)) definiert werden können.

#### „Rationaler Substitutions“- Ansatz

**[0094]** Die Erfinder substituierten scFv(F8)-Aminosäuren mit Aminosäuren der CDRs und FRs von scFv(D1.3), die Lysozym erkennen. Diese Substitutionen wurden in einer rationalen Weise durchgeführt, wobei jeder Rest auf der Basis einer theoretischen Konstruktion, die mittels molekularer Modellierung entwickelt wurde, modifiziert wurde.

**[0095]** Gemäß diesem Ansatz wurden ausgiebige Aminosäurenmodifikationen durchgeführt, einschließlich aller CDRs von VH und VL. Diese Regionen wurden (mittels der auf dem Gebiet als „Pfropfen“ bekannten Technik) mit den korrespondierenden Regionen eines anderen Antikörpers von „normalem Typ“ substituiert (der nicht die jeweilige Stabilität oder cytoplasmatische Funktionalität aufzeigt), der ein anderes Zielmolekül bindet, das Lysozym, Rinderserumalbumin, das Nukleoprotein des „gefleckten welken Tomatenvirus“, „Gurkenmosaikvirus“ oder jegliches andere Zielmolekül von Interesse sein kann.

**[0096]** Das in [Fig. 4](#) gezeigte Diagramm fasst die Strategie der Mutagenese zusammen, die für ein scFv(F8) Antikörperpfropfen verwendet wurde.

**[0097]** Die Analyse der mutagenisierten Produkte in dem spezifischen Fall, der in der Figur gezeigt wird, der sich auf die direkte Mutagenese eines Antikörpers bezieht, der Lysozym bindet, zeigte den Erfolg der Pfropfenstrategie. Tatsächlich waren die resultierenden chimären Antikörper (P2, P3, P4 und P5 genannt) in der Lage, spezifisch Lysozym zu erkennen, wie durch die molekulare Entwicklung vorausgesagt worden war. Zur glei-

chen Zeit wurde die Kapazität des scFv(F8)-Gerüst zur Unterstützung ausgiebiger Mutationen nachgewiesen, insbesondere auf der Ebene der CDRs ohne die Beeinträchtigung molekularer Stabilität. Tatsächlich zeigten sich die neuen bindenden Moleküle, die durch diesen Ansatz erhalten wurden, als löslich und funktionell in der reduzierenden Umgebung des Zellzytoplasmas genau so wie der erkennende scFv(F8).

**[0098]** Als ein Ergebnis war außer einigen FR-Resten, die modifiziert wurden, um die korrekte Faltung der Regionen zu erlauben, die in der neuen Antigenerkennung involviert sind, die Gerüststruktur von scFv(F8) nicht wesentlich verändert. Es wurde die Struktur identifiziert, die in der Lage ist, als „zentraler Nukleus“ zu funktionieren, auf der es möglich ist, mittels Proteinentwicklung Sequenzen zu pflanzen, die in der Lage sind, eine Bindungsfähigkeit für neue Antigene zu vermitteln. Dieser zentrale Nukleus besteht aus den FR-Peptiden, die in der Zusammenfassung der Erfindung beschrieben wurden.

**[0099]** Die Eigenschaft dieser mutierten Moleküle wurde durch die Erfinder mittels Techniken der Analyse der Expression in sowohl Periplasma wie auch Cytoplasma von *Escherichia coli* verifiziert, was in den Beispielen besser erklärt und ausgeführt wird. Insbesondere hat die Analyse der Expression in dem bakteriellen Cytoplasma es möglich gemacht, die Fähigkeit der gepfropften Antikörper zu beurteilen, das neue Antigen zu erkennen. Die Expression in dem bakteriellen Cytoplasma hat es stattdessen ermöglicht, die Proteinlöslichkeit und Funktionalität in reduzierender Umgebung zu analysieren.

**[0100]** In dem Fall von Antikörpern, die auf Lysozymspezifität mutagenisiert wurden, zeigte der ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)- Test, der mit periplasmatischen Extrakten durchgeführt wurde, die auf Gesamtproteingehalt normalisiert wurden, dass alle Produkte der Mutagenese mit Ausnahme von P1 (Mutante mit der geringsten Anzahl von Substitutionen) in der Lage waren, Lysozym zu erkennen. Die P3-Mutante, die die CDRs von scFv (D1.3) und einige Substitutionen in den Gerüsten aufweist, zeigte die höchste Bindungsaktivität. Die für P3 beobachtete Lysozymerkennung war etwas geringer als die durch scFv (D1.3) gezeigte (ungefähr 15 % weniger). Diese Daten wurden mit der Western Blot-Analyse verbunden, die vergleichbare Expressionsmengen der verschiedenen Produkte der Mutagenese und zwischen Mutageneseprodukten und dem ursprünglichen scFv(F8) und scFv (D1.3) zeigte. Dieses zeigt, dass die Unterschiede des Signals, das in dem ELISA beobachtet wurde, ausschließlich auf die unterschiedliche Spezifität für das Antigen zurückzuführen sind, anstatt auf unterschiedliche Expressionsmengen.

**[0101]** Bezüglich der Expression in bakteriellem Cytoplasma ergab ein ELISA, der mit Extrakten durchgeführt wurde, die auf Gesamtproteinen normalisiert wurden, eine höhere Aktivität für die P5-Mutante, die durch die höchste Anzahl an Aminosäuresubstitutionen gekennzeichnet ist. Eine schwache Bindungsaktivität, in jedem Fall eine höhere als die für scFv(D1.3) gemessene, wurde auch für P3 und P4 festgestellt.

**[0102]** Sogar in diesem Fall zeigten Western Blot-Analysen eine gleichwertige Expression der scFv-Mutanten, die in dem Cytoplasma exprimiert wurden, was wiederum bestätigt, dass die Unterschiede des ELISA-Signals auf die unterschiedliche Fähigkeit zur Erkennung des Lysozyms zurückzuführen sind.

#### „Molekularer Evolutions“-Ansatz

**[0103]** Auf der Basis der in dem rationalen Substitutionsansatz erhaltenen Indikationen wurde eine Bibliothek neuer Moleküle, die aus scFv(F8) abgeleitet wurden, hergestellt.

**[0104]** Der Ausgangspunkt für die Herstellung der Bibliothek war scFv(MUT-VL1), ein Derivat des scFv(F8)-Antikörpers, das in den CDRs modifiziert worden war. Die CDR1 der VL-Domäne wurde gekürzt und teilweise gemäß einem Modell-unterstützten Konstruktionsdesign verändert. Zudem wurden 9 Aminosäuren aus dem ungewöhnlich langen CDR3 der VH-Domäne des ursprünglichen scFv (s. [Fig. 5](#)) entfernt.

**[0105]** Es wurde eine strukturelle Variabilität durch gezielte zufällige PCR-Mutagenese in 4 Aminosäurepositionen in der CDR3 von sowohl den VH- wie auch den VL-Domänen eingeführt. Es wurden degenerierte Oligonukleotide, die Reste zwischen und einschließlich 95 und 98 von VH und 91 und 94 von VL zufällig variieren, verwendet. Nach der Mutagenese wurde ein Repertoire mit einer geschätzten Diversität von  $5 \times 10^7$  unterschiedlichen Phagenklonen erhalten.

**[0106]** Der Pool an Molekülen, der so erhalten wurde, wurde auf einen Phagen in einer Bibliothek zur Selektion auf Antigene hin übertragen, die sich von AMCV unterscheiden, das ursprünglich von scFv(F8) erkannt wurde. Diese „Bibliothek“, die unter Verwendung eines einzelnen Ausgangsantikörpers („Monoscaffold Bibliothek“) als Basisstruktur konstruiert wurde, stellte Antikörper mit unterschiedlicher Spezifität zur Verfügung, die

zur gleichen Zeit die besonderen Eigenschaften der Stabilität des scFv(F8)-Moleküls beibehalten (cytoplasmatische Löslichkeit, Denaturierung und Renaturierung in vitro). Diese Schlussfolgerungen wurden durch Guanidiniumchlorid-Denaturierungs /Renaturierungs-Studien mit isolierten scFv-Molekülen erhalten. Die Expression der gleichen ScFv-Fragmente in dem Escherichia coli Cytoplasma als lösliche und funktionelle Moleküle bestätigte die Stabilität dieser Proteine auch in einem in vivo-System.

**[0107]** Zudem wurde für einige von diesen (scFv(CMV)4B und scFv(CMV)4G) gezeigt, dass sie als lösliche und funktionelle Moleküle auch in Pflanzencytosol exprimiert werden. Das Vorhandensein von scFv(CMV)4B- oder scFv(CMV)4G-Antikörpern in der löslichen Fraktion von Kartoffelvirus X (PVX)- infizierten Tabakpflanzen zeigt, dass diese Moleküle, anders als die meisten Antikörper, in Pflanzencytoplasma gefaltet und stabil sind. Identische Ergebnisse wurden in transgenen Tomatenpflanzen erhalten, die die Fähigkeit einer korrekten Faltung in einer reduzierenden Umgebung bestätigen. Diese Antikörper stören den CMV-Zusammenbau und/oder die Replikation und stellen eine konstruierte Resistenz gegen den Virus zur Verfügung („Pflanzenkörper-vermittelte Resistenz“).

**[0108]** Aus der Bibliothek isolierte und charakterisierte CDR3-Sequenzen der VH- und VL-Domänen der Antikörper (siehe Tabelle I infra) zeigten, dass die Substitution der Reste in den oben genannten Positionen vollständig zufällig ist. Zudem zeigte die Aminosäurezusammensetzung und Verteilung in den mutierten CDR3, dass Ladung und Hinderung von Aminosäuren die Faltung und Löslichkeit dieser scFv-Fragmente nicht wesentlich betrifft.

**[0109]** Die aus der Herstellung und aus der Analyse der „Monoscaffold“-Bibliothek erhaltenen Daten zeigten die Möglichkeit der Verwendung des Gerüsts von scFv(F8) zur Herstellung einer Sammlung von polyvalenten Antikörpern mit der gleichen intrinsischen Stabilität wie der ursprüngliche Antikörper scFv(F8). Diese Bibliothek ist für alle Anwendungen vorgesehen, bei denen die Expression von Antikörpern in dem Cytoplasma notwendig ist, oder bei denen besondere Eigenschaften der molekularen Stabilität essentiell sind.

**[0110]** Als ein Ergebnis dieser Experimente wurden die stabilen Antikörpermoleküle mit einer neuen Bindungsspezifität und insbesondere diejenigen, die in der Zusammenfassung der Erfindung beschrieben werden, erhalten.

#### Schlussfolgerung

**[0111]** Die Ergebnisse all dieser experimentellen Ansätze werden in dem in der folgenden Tabelle I gezeigten Diagramm zusammengefasst.

**[0112]** In dieser Tabelle werden die Ergebnisse und die Information, die als Ergebnis der Herstellung von Mutanten durch den Ansatz zufälliger Substitutionen erhalten wurden, berichtet. Die nicht polaren Reste werden mit doppelt unterstrichenen Buchstaben gezeigt. Die Reste mit polarer R-Gruppe ohne Ladung werden in normalen Buchstaben gezeigt; die sauren Reste (negative Ladung) werden mit gestrichelter Unterstreichung gezeigt und die basischen Reste (positive Ladung) werden mit einfachem Unterstreichen gezeigt.

Tabelle I

Klon	Spezifität	VH CDR3 <sup>a</sup>	VL CDR3 <sup>b</sup>
scFv(F8)	AMCV	<u>RRNYP</u> YYYG <u>SRGY</u>	<u>SNED</u>
scFv(LYS-11E)	Lysozym	<u>TRPY</u>	<u>VTYK</u>
scFv(BSA-9F)	BSA	<u>ERWD</u>	<u>ALSP</u>
scFv(BR01-6H)	Nukl. von TSWV aus BRO1	<u>NWRR</u>	<u>GASL</u>
scFv(P105-1C)	Nukl. von TSWV aus P105	<u>GRHK</u>	<u>YGRR</u>
scFv(CMV-4G)	CMV	<u>NNWS</u>	<u>GQRK</u>
scFv(CMV-4B)	CMV	NNYS	<u>GRRR</u>
scFv(CMV-2G)	CMV	<u>VTYN</u>	<u>SRRP</u>

<sup>a</sup> bedeutet: wenn auf scFv(F8) Bezug genommen wird, die Positionen von Rest 95 bis Rest 100 J; wenn auf Klone Bezug genommen wird, die aus der „Monoscaffold“-Bibliothek isoliert wurden, die Positionen der Reste 95 bis Rest 98 (Nummerierung gemäß Kabat et al., 1991).

<sup>b</sup> zeigt Positionen von Rest 91 bis Rest 94 (Nummerierung gemäß Kabat et al., 1991).

**[0113]** Auf der Basis der oben gezeigten Ergebnisse wurden die Peptide, Polypeptide, Antikörper, die in der Zusammenfassung der Erfindung genannt werden, nach dem auch hierin genannten Verfahren erhalten

**[0114]** Die dadurch erhaltenen besonderen Antikörper haben eine verbesserte Stabilität aufgezeigt und die Antikörper des Typ FAB, Fv, dAb, IgG oder IgA haben insbesondere bedingt durch die Gegenwart der Peptide der Erfindung in den VH- und VL-Regionen eine verbesserte Stabilität aufgezeigt.

**[0115]** Bis zu diesem Punkt wurde eine allgemeine Beschreibung der vorliegenden Erfindung gegeben. Mit Hilfe der folgenden Beispiele wird nun eine detaillierte Beschreibung zur Verfügung gestellt, um Umfang, Eigenschaften, Vorteile und Durchführungsverfahren zu erklären.

#### Beispiele

##### Beispiel 1: Bestimmung der Sequenz von scFv(F8)

**[0116]** Der einzelkettige Antikörper scFv(F8) leitet sich aus einem mAb (Sezernierung durch eine Hybridomzelle) der Klasse IgG2b ab, der gegen das Hüllprotein des Pflanzenvirus AMCV gerichtet ist (Artischocken Flecken Kräuselvirus). Um diesen Antikörper zu erhalten, wurden Balb/c-Mäuse mit dem aufgereinigten Virus immunisiert. Die Techniken zur Isolierung der Lymphozyten und Herstellung der Hybridomzelle waren Standardtechniken, die in der Literatur bekannt sind (Harlow und Lane 1988). Die Hybridomzelllinie, die diesen Antikörper exprimiert, wurde durch ELISA auf der Basis ihrer hohen Affinität für das Antigen ausgewählt. Zur Isolierung der Gene der schweren (H) und leichten (L)-Kette dieses Antikörpers wurde die vollständige cDNA gemäß einem veröffentlichten Protokoll ausgewählt (Tavladoraki et al. 1993). Die variablen Regionen (VH und VL) wurden mittels PCR (Polymerasekettenreaktion) unter Verwendung universeller Primer für die variablen Regionen amplifiziert und anschließend in unterschiedliche Arten von Vektoren kloniert (Tavladoraki et al. 1993). Diese Sequenz wurde gemäß dem Sanger-Verfahren (Sambrook et al. 1989) nach dem Protokoll des Sequanase Kits (USB) bestimmt.

##### Beispiel 2: Bestimmung der positionsspezifischen Mutagenese in dem rationalen Ansatz

**[0117]** Die Mutagenese wurde mit dem Plasmid pMUT-VL1, das das Gen enthält, das für einen Antikörper kodiert, der aus scFv(F8) abgeleitet wurde, durchgeführt, bei dem nur das CDR1 der VL teilweise in der Aminosäurezusammensetzung verändert wurde und um vier Aminosäuren verringert wurde.

**[0118]** Es wurde das Stratagene („Quick Change Site-directed Mutagenesis Kit“-)System zur Mutagenese nach den vom Hersteller zur Verfügung gestellten Instruktionen verwendet. Dieses System basiert auf der en-

zymatischen Verlängerung von zwei komplementären Primern, die mutierte Sequenzen enthalten, unter Verwendung von pMUT-VL1 als Template. Das Plasmid wurde denaturiert, was die Bindung der zwei Oligonukleotide an die gegenüberliegende DNA-Stränge ermöglicht, um die Verlängerungsreaktion der pFU-DNA-Polymerase vorzubereiten. Das Ergebnis ist ein Plasmid mit einer Doppelhelix, die die Oligonukleotide eingebaut wurde, was die gewünschte Mutation bewirkt.

**[0119]** Die bakterielle Stammlösung von E. Coli XL1-Blue, die für die Aufreinigung des plasmidischen Vektors verwendet wurde, hat Methyl-Transferaseaktivität, daher resultiert das aus Bakterien extrahierte DNA-Plasmid methyliert. Im Gegensatz dazu enthalten mutierte Plasmide, die durch Verlängerung der Pfu-DNA-Polymerase erhalten werden, keine Methylierungen. Dieses ermöglichte die Auswahl von mutierten Plasmiden durch Verdau der Reaktionsprodukte mit dem Endonukleaseenzym DpnI, das häufige spezifische Sequenzen methylierter DNA in dem Elternplasmid erkennt. Die Produkte der Reaktion wurden in E. Coli XL1-Blue transfiziert, bei dem die „Nick“-Stellen, die während der Synthese des mutierten Plasmids *in vitro* hergestellt werden, durch zelluläre Reparatursysteme phosphoryliert werden.

**[0120]** Die Mutagenesereaktion wurde in 25 µl durchgeführt, enthaltend: 2,5 µl Reaktionspuffer 10 x, 2,5 mM dNTP, 10 ng DNA-Template, 62,5 ng von jedem Primer, 1,25 U Pfu DNA-Polymerase (Stratagene).

**[0121]** Die verwendeten Bedingungen waren die folgenden: Denaturierung bei 95 °C für 30 " ; 18 Zyklen: Denaturierung bei 95 °C für 30 " , Bindung bei 55 °C für 1 ' und enzymatische Verlängerung bei 68 °C für 7 ' ; 5 ' bei 68 °C zur Vervollständigung der Verlängerung. Die Reaktion wurde unter Verwendung einer Perkin Elmer / Cetus-Vorrichtung durchgeführt.

**[0122]** Die Produkte der Reaktion wurden für eine Stunde bei 37 °C mit 5 U des Restriktionsenzyms DpnI (Stratagene) inkubiert und durch Elektrophorese auf Agarosegel analysiert.

**[0123]** Die Produkte der Mutagenese wurden in den pGEM-7Zf(+)- Vektor (Promega) kloniert und in E. Coli XL1-Blue gemäß den konventionellen Verfahren der Molekularbiologie transfiziert. Die Mutagenese wurde durch Sequenzierung verifiziert.

**[0124]** Die durch mutierte Sequenzen exprimierten Proteine wurden nach dem Klonieren in den Expressionsvektor pDN332 (Neri et al. 1996) und Induktion der Expression in Bakterien gemäß der in den folgenden Beispielen beschriebenen Technik analysiert.

**[0125]** Die Funktionalität der Antikörper und die Löslichkeit in cytoplasmatischer, reduzierender Umgebung wurde mittels eines Western Blots und ELISA, wie unten beschrieben wird, analysiert.

#### Beispiel 3: Extraktion des Proteins das in E Coli Periplasma exprimiert wird

**[0126]** Einzelne Kolonien von E. Coli HB2151, die scFv-Antikörper exprimieren, wurden in 50 ml SB-Kulturmedium, enthaltend 100 µg/ml Ampicillin und 2 % Glukose inokuliert und für 16 Stunden bei 37 °C wachsen gelassen. Diese Vorkultur wurde auf einen Liter mit frischem SB-Medium verdünnt und bei 37 °C für zwei zusätzliche Stunden geschüttelt (bis  $A_{600\text{ nm}} = 0,7 - 0,8$ ). Die Zellen wurden bei Raumtemperatur bei 3000 g für 15 ' zentrifugiert.

**[0127]** Die Induktion des lacZ-Promotors wurde durch Resuspendierung des bakteriellen Präzipitats in 1 Liter SB-Medium erreicht, das 100 µg/ml Ampicillin und 1 mM IPTG enthält und Schütteln bei 30 °C für 3 Stunden. Die Kultur wurde dann bei 3000 g für 15' bei 4 °C zentrifugiert, um die Zellen zu fällen.

**[0128]** Lösliche Proteine wurden aus bakteriellem Periplasma durch osmotischen „Schock“ extrahiert. Die pelletierten Zellen wurden in 15 ml TES-Pufferlösung (0,5 M Saccharose, 0,2 M Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, pH 8,0), die Proteasehemmer enthält („Complete Mini“, Boehringer) resuspendiert.

**[0129]** Dann wurden 22,5 ml der 1 : 5 verdünntes TES und Proteasehemmer hinzugefügt. Die bakterielle Suspension wurde einer langsamen Rotation für 15 ' bei Raumtemperatur ausgesetzt. Der Extrakt wurde dann bei 15.000 g bei 4 °C für 20 ' zentrifugiert, um periplasmatische Proteine, die in dem Überstand vorhanden sind, zu gewinnen.

## Beispiel 4: Expression von Proteinen in E Coli Cytoplasma

## a. Herstellung intrazellulärer Extrakte

**[0130]** Um die Expression von scFv-Fragmenten in dem bakteriellen Cytoplasma zu erhalten, wurden signalsequenzlose Konstrukte hergestellt. Die Sequenz, die scFv(F8) kodiert, die kein PelB-Sezernierungssignal enthält (Tavladoraki et al., 1993), wurde in HindIII – NotI-Stellen des pDN332 Phagemids inkliniert, was den pDN-F8 intra genannten Phagemid ergibt. Konstrukte von scFv-Genen, die zur intrazellulären Expression vorgesehen sind, wurden durch Substitution eines PstI – NotI – 744 Bp – Fragments von pDN-F8 intra, korrespondierend zu dem scFv(F8)-Gen mit den analogen PstI – NotI – Restriktionsfragmenten, die durch Verdau von mutierten scFv-Genen erhalten wurden, hergestellt. Plasmide, die die signalsequenzlose Version der scFv-Gene enthalten, wurden verwendet, um E. coli HB2151 zu transformieren.

## b. Expression von rekombinantem Protein in E. Coli

**[0131]** 50 ml 2 x TY-AG wurden in einer Über-Nacht-Kultur bei  $A_{600\text{ nm}} = 0,05$  inokuliert. Die Zellen wurden bei 37 °C bis  $A_{600\text{ nm}} = 0,6$  wachsen gelassen, dann wurden sie pelletiert und in 50 ml SB-Medium resuspendiert, das 100 µg/ml Ampicillin und 0,4 mM IPTG enthält. Nach 3 h Induktion bei 30 °C wurden Bakterien in 2,5 ml Extraktionspuffer (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 10 mM N-Jodacetamid, pH 8) gesammelt, bei –20 °C gefroren / aufgetaut und dann für 3 Min. bei 150 Watt Leistung (Soniprep 150, Sonyo) auf Eis Ultraschall-behandelt. Die lösliche Fraktion wurde durch Zentrifugation für 30 Min. bei 18.000 g gesammelt.

**[0132]** Das Pellet, das Inklusionskörper enthält, wurde in Elektrophoresepuffer (20 % Glycerin, 2 % SDS, 0,06 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,02 % Bromphenol blau, 5 % β-Mercaptoethanol) resuspendiert, für 5' gekocht und der erhaltene Überstand wurde nach einer kurzen Zentrifugation auf ein Polyacrylamidgel geladen.

## Beispiel 5: Analyse von rekombinanten Antikörpern

## a. Bestimmung der Proteinkonzentration

**[0133]** Die Konzentration des Gesamtproteins, das in den Extrakten vorhanden war, wurde unter Verwendung des BioRad-Reagenzes und Rinderserumalbumin als Standard bestimmt.

**[0134]** Die Konzentration des scFv nach Aufreinigung wurde auf der Basis der Absorption bei 280 nm berechnet. Nach elektrophoresischer Trennung wurden Proteinbanden mit Silbernitrat oder Coomassie Blau- Färbefarbstoffen sichtbar gemacht.

## b. Elektrophorese auf denaturierendem Polyacrylamid Gel (SDS – PAGE)

**[0135]** Die Analyse der Antikörperfragmente, die nach der Aufreinigung erhalten wurden, wurde mittels SDS – PAGE, gemäß dem auf dem Gebiet bekannten Protokoll, durchgeführt. Das Trenngel wurde unter Verwendung von Polyacrylamid (Acrylamid-Bisacrylamid 29 : 1) mit 12 % Endkonzentration in der Gegenwart von 2 % SDS hergestellt. Beladungspuffer (Endkonzentrationen: 10 % Glycerin, 0,06 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,025 % Bromphenol Blau, 2 % SDS und 5 % β-Mercaptoethanol) wurde auf die Proben vor dem Sieden für 5' hinzugefügt. Die Elektrophorese wurde unter Verwendung der MiniProtean (BioRad)- Vorrichtung bei 100 Volt durchgeführt.

## c. Western Blot-Analyse

**[0136]** Nach Trennung auf SDS – PAGE wurden die Proteine dann von dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Hybon-C Super, Amersham) bei 100 Volt für eine Stunde bei 4 °C elektrotransferiert.

**[0137]** Die Nitrozellulosemembran wurde dann in PBS-Puffer (0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,15 M NaCl), enthaltend 0,1 % Tween-20 (PBST) und 4 % entrahmte Milch bei 4 °C für 16 Stunden blockiert.

**[0138]** Nach drei Waschungen mit PBST, jeweils für 30", 5', 5' und einer Waschung von 5' in PBS, wurde die Membran in PBS, 2 % entrahmte Milch (PBSM), enthaltend 2,5 µg/ml monoklonale Antikörper anti-Flag M2 (Sigma) für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde gewaschen und der Immunnachweis wurde durch Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur in PBSM realisiert, das biotinylierten Anti-Maus IgG Antikörper (Amersham) enthält, gefolgt durch Inkubation in PBSM mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase-

konjugat (Amersham). Die Signalentwicklung wurde durch verstärkte Chemilumineszenz (ECL Plus, Amersham) erhalten.

#### d. ELISA-Test

**[0139]** Immunplatten (Maxisorp, Nunc) wurden mit Antigenen (100 µg/ml Lysozym (Sigma) und 3 µg/ml AM-CV) in 100 µl Carbonatpuffer (50 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6) bei 4 °C für 16 Stunden inkubiert.

**[0140]** Nach drei Waschungen mit PBST und einer Waschung mit PBS wurden die Platten mit PBSM für 2 Stunden bei 37 °C blockiert. Jedes Well wurde dann gewaschen und mit 80 µl Extrakt aus induzierten bakteriellen Kulturen und 20 µl PBSM, enthaltend 2,5 µg/ml Anti-FlagM2 (Sigma) gefüllt. Die Platten wurden für 16 Stunden bei 4 °C inkubiert und gewaschen. 100 µl PBSM wurde dann zu jedem Well hinzugefügt, das einen Ziegeanti-Maus Antikörper enthält, der an Peroxydase konjugiert ist (KPL). Die Platten wurden bei 37 °C für eine Stunde inkubiert und gewaschen. Zur Signalentwicklung wurden 100 µl einer 1 : 1 Lösung Peroxydase-substrat, ABTS [2'2'-Azinbi(3-ethylbenzthiazolin)sulphonsäure] : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (KPL) verwendet. Die Signale wurden bei 405 nm Absorption mittels eines ELISA-Lesegerätes (Labsystem Multiscan Plus) gemessen.

#### Beispiel 6: Herstellung und Klonierung der „Monoscaffold“-Bibliothek

**[0141]** Als ein Template für die Herstellung der Phagenbibliothek wurde das in Beispiel 2 beschriebene Plasmid pMUT-VL1 verwendet. Die Bibliothek wurde durch das Einführen einer Variabilität in der CDR3 des VH und VL durch die zufällige Modifikation der Sequenz hergestellt, die für die 4 Aminosäurereste in den in Tabelle 1 angezeigten Positionen kodiert. Für diesen Zweck wurden teilweise degenerierte Oligonukleotide synthetisiert, die entwickelt wurden, um die Einführung von Transkriptionsstopcodons zu vermeiden und die Länge des CDR3 des VH von 13 auf 4 Aminosäuren zu verringern. Die Mutagenese wurde mittels einer PCR durchgeführt, wobei die kodierenden Sequenzen für die VH- und VL-Domänen unabhängig voneinander jeweils unter Verwendung der Primer VHa und VHf und VLa und VLf ([Fig. 6](#)) amplifiziert wurden. Die PCR-Reaktion wurde wie folgt vorbereitet: 300 ng pMUT-VL1, 0,4 mM Senseprimer (VHa oder VLa), 0,8 µM degenerierter Antisenseprimer (VHf oder VLf), 250 µM von jedem dNTP in 50 µl Inkubationspuffer 1 × Appligene (Oncor); 2,5 U Taq DNA Appligene Polymerase (Oncor), wurden bei 94 °C (Heißstart) hinzugefügt. Die Amplifikationsreaktion wurde gemäß dem folgenden Programm durchgeführt: 94 °C für 3 Minuten; 25 Zyklen: 94 °C für 1 Minute, 60 °C für 1 Minute, 72 °C für 1 Minute; 72 °C für 2 Minuten. Die Amplifikationsprodukte wurden aus Agarosegel unter Verwendung des QIAquick-Gel-Extraktionskits (QIAGEN) unter Eluieren in 30 ml 3 mM Tris/HCl, pH 8,0 aufgereinigt. Der Zusammenbau der scFv-Antikörper wurde mittels PCR unter den gleichen, wie den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt, unter Verwendung von 10 µg der aufgereinigten VH- und VL-Fragmente, 0,8 µM Senseprimer (VHa) und 0,8 µM Antisenseprimer (VLg) in einem Endvolumen von 500 µl, das in 10 Reaktionen von 50 µl unterteilt wurde. Die zusammengesetzten scFvs wurden unter Verwendung des QIAquick PCR-Aufreinigungskits (QIAGEN) aufgereinigt. Nach NcoI-NotI-Verdau wurde das gesamte Produkt des Zusammenbaus in Vektor pDN332 kloniert.

**[0142]** Ligationsprodukte wurden durch Elektroporation in den E. Coli TG1-Stamm unter Verwendung der folgenden Bedingungen transfiziert: 200 Ohm, 25 mF, 2,5 kV. Die Transformanten wurden auf 2 × YT + 2 % Glucose + Ampicillin 100 g/ml ausgewählt. Die Phagen wurden gemäß dem durch Nissim et al. (1994) beschriebenen Verfahren hergestellt.

#### Beispiel 7: Selektion der Mutanten aus der Monoscaffold“-Bibliothek und Analyse von deren Eigenschaften

##### a. Selektion der Bibliothek

**[0143]** Eine Antigenimmobilisierung wurde auf Immunröhrchen (Maxisorp, NUNC) in PBS (8 mM NaHPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O + 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O + 0,15 M NaCl) oder in Carbonatpuffer 50 mM (CB) unter Inkubation für 16 Stunden bei Raumtemperatur oder bei 4 °C bei einer Konzentration durchgeführt, die zwischen 10 und 100 µg/ml, abhängig von dem Antigen, variiert.

**[0144]** 10<sup>12</sup>-10<sup>13</sup> Phagen in 4 ml PBS + 2 % Milch (PBS-M) wurden für jeden Selektionszyklus bei Inkubation für 2 Stunden verwendet, wobei die ersten 30 Minuten leicht gerührt wurde. Nach 10 – 15 Waschungen mit PBS + 0,1 % Tween20 und 10–15 Waschungen mit PBS wurde die Elution mit 1 ml 100 mM Triethylamin durchgeführt, das sofort mit 0,5 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,0 neutralisiert wurde. Die Phagensuspension wurde dann verwendet, um 10 ml exponentiell wachsenden E. Coli TG1-Stamm (37 °C für 30 Minuten) zu infizieren. Nach Zentrifugation wurden die Bakterien resuspendiert und auf Platten ausplattiert, die Agarmedium enthalten: 2 × YT

+ 100 µg/ml Ampicillin + 1 % Glukose (2 × YT – AG).

**[0145]** Die Charakterisierung der einzelnen Klone auf Bindungsfähigkeit, die aus den letzten Selektionsdurchgängen abgeleitet wurden, wurde in einigen Fällen mit Klonen durchgeführt, die in der Form eines Phagen exprimiert wurden, und mit anderen, die als lösliche scFv exprimiert wurden.

**[0146]** In dem Fall der Phagenklone wurden 96 einzelne Kolonien, die aus dem letzten Selektionszyklus erhalten wurden, in 150 ml 2 × YT – AG inokuliert und bei 30 °C unter Rühren für 16 Stunden wachsen gelassen. Dann wurde eine Probe von 10 ml von jeder Vorkultur verwendet, um 150 ml 2 × YT – AG zu inokulieren, bis exponentielles Wachstum erreicht wurde. Die Herstellung von Phagen wurde durch Infizieren mit ungefähr  $10^{11}$  t.u. (transformierende Einheiten) des ‚Helfer‘-Phagen VCSM13 (Stratagene) und Inkubieren bei 37 °C für 30 Minuten erhalten. Die infizierten Bakterien wurden zentrifugiert, in 150 ml 2 × YT + 100 µg/ml Ampicillin + 25 µg/ml Kanamicin resuspendiert und für 16 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Kulturüberstände wurden durch ELISA analysiert, wobei die Antigene unter den gleichen Bedingungen, die für die Immunröhrchen verwendet wurden, immobilisiert wurden. Nach Inkubieren für 2 Std. bei 37 °C wurde ein Peroxidase-konjugierter monoklonaler Antikörper anti-M13 (Pharmacia) 1 :5000 in PBS-M für 1 Stunde bei 37 °C verwendet. Die colorimetrische Reaktion wurde unter Verwendung des „ABTS Peroxidasesubstratsystems“ (KPL) entwickelt. Positive Klone, die aus dieser ersten Selektion erhalten wurden, wurden weiter analysiert, um die Funktionalität als lösliche scFvs zu verifizieren. Für diesen Zweck wurden Plasmide aus positiven Klonen mittels des QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) Systems extrahiert, sequenziert und in den E. Coli NB2151-Stamm transfiziert. Kompetente Bakterien wurden durch Resuspendierung bei 0 °C in TSS hergestellt (für 100 ml : 1 g Bacto-Trypton, 0,5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 10 g PEG 3350, 5 ml DMSO, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6,5). DNA-Plasmid (1 – 5 ng) wurde zu 1 ml kompetenter Zellen hinzugefügt und auf Eis für 45 Minuten inkubiert. Nach einem kurzen Schock bei 42 °C für 2 Minuten wurde 1 ml LB hinzugefügt, dann wurden die Zellen für 1 Stunde bei 37 °C gerührt und auf LB + 100 µg/ml Ampicillin plattiert. Die Analyse der Expression der einzelnen Kolonien aus der Transformation wurden durch ELISA gemäß dem unten beschriebenen Verfahren durchgeführt.

**[0147]** Zur Auswahl als lösliche scFvs wurden 10–100 µl Phagen, die aus dem letzten Auswahlsschritt mit Antigenen eluiert wurden, verwendet, um Zellen des E. Coli NB2151-Stammes in exponentielles Wachstum zu infizieren. 96 einzelne Kolonien wurden mit 150 µl 2 × YT – AG für 16 Stunden unter Rühren inokuliert. 10 µl von jeder Vorkultur wurden in 150 µl 2 × YT + 100 µg/ml Ampicillin + 0,1 % Glukose verdünnt und bei 37 °C für eine Stunde wachsen gelassen. Die Proteinexpression wurde durch die Zugabe von 1 mM IPTG und 16 Stunden Inkubation induziert. Einzelkulturüberstände (enthaltend 2,5 µg/ml eines anti-FLAG M2 monoklonalen Antikörper, Sigma, in PBS-M) wurden zwei Std. bei 37 °C inkubiert und durch ELISA analysiert. Ein 1 : 10.000 in PBS-M verdünnter Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (KPL), der an die Peroxydase konjugiert war, wurde dann für 1 Stunde bei 37 °C hinzugefügt.

#### b. Analyse der Kreuzreaktivität

**[0148]** Positive Klone, die aus der ELISA-Untersuchung abgeleitet wurden, wurden weiterhin auf deren Bindungsspezifität für Antigene analysiert, die nicht der Auswahl entsprach.

**[0149]** 50 ml E. Coli HB2151-Stamm in exponentiellem Wachstum in SB-A (35 g/l Trypton + 20 g/l Hefeextrakt + 5 g/l Natriumchlorid + 100 µg/ml Ampicillin, pH 7,5) wurden bei 30 °C für 3 Stunden durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 500 µl TES (0,2 M Tris-HCl, pH 8 + 0,5 mM EDTA + 0,5 M Saccharose) resuspendiert, das Protease-Hemmer (Complete<sup>®</sup>, EDTA-frei, Boehringer) enthält. Dann wurden 750 µl 1 : 5 verdünntes TES hinzugefügt und die Probe wurde unter orbitaler Agitation für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Proteinextrakte, die als Überstand nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 18.000 g bei 4 °C erhalten wurden, wurden in einem ELISA-Test mit unterschiedlichen Antigenen verwendet. In jedes ELISA-Well wurden 80 µl periplasmatischer Extrakt geladen, anschließend 20 µl PBS + 10 % Milch. Der Nachweis wurde wie bereits beschrieben durch Verwendung des Antikörpers anti-FLAG M2 durchgeführt.

#### c. Sequenzierung

**[0150]** Plasmide aus ausgewählten positiven Klonen wurden an beiden DNA-Strängen durch Verwendung einer 373 DNA-Sequenziervorrichtung (Applied Biosystems) sequenziert.

#### d. Aufreinigung des scFv

**[0151]** Um große Mengen an scFv herzustellen, wurde eine Einzelkolonie von E. Coli HB2151 in 100 µg/ml

SB inokuliert, der 100 µg/ml Ampicillin und 2 % Glukose (SB-AG) enthält. Nach 16 Stunden Inkubation bei 30 °C wurde die Kultur mit 900 ml SB-AG verdünnt und für eine weitere Stunde rühren gelassen (bis zu einer  $O.D._{600} = 0,9$ ). Nach Zentrifugation wurden die Pellets in SB-A + 1 mM IPTG resuspendiert und für 3 Stunden bei 30 °C induziert. Nach Zentrifugation wurden die Bakterien in 10 ml TES + Proteasehemmer resuspendiert, anschließend wurden 1 : 5 verdünnte 15 ml TES + Proteasehemmer hinzugefügt und die Probe wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (20 Minuten bei 18.000 g bei 4 °C) wurde der Überstand zurück gewonnen (Fraktion 1A) und das Pellet wurde in 15 ml  $MgSO_4$  + Proteasehemmer für eine weitere Proteinextraktion resuspendiert. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde ein zweiter Zentrifugationsschritt durchgeführt und der Überstand wurde als Fraktion 2A getrennt gesammelt. Die Fraktionen 1A und 2A wurden unabhängig voneinander durch Ultrafiltration auf einer Diaflo YM10-Membran (Amicon) aufkonzentriert und durch Affinitätschromatographie auf Protein-L Sepharose (Actigen) oder auf Ni-NTA (QIAGEN) gemäß den von den Herstellern vorgeschlagenen Protokollen aufgereinigt. Eine Quantifizierung wurde durch Ablesen der Absorption bei 280 nm durchgeführt und die Proteinreinheit wurde auf SDS-PAGE, gefolgt von  $AgNO_3$ -Färbung, verifiziert.

#### e. Analyse der thermodynamischen Stabilität

##### i) Entfaltungs- und Faltungsstudien mit scFv-Mutanten.

**[0152]** Gleichgewichtsentfaltungsexperimente wurden bei 20 °C durch Inkubation von jeder scFv-Mutante (35 µg/ml) bei sich erhöhenden Guanidiniumchlorid (GdmCl)-Konzentrationen (0 – 4 M) in PBS durchgeführt. Nach 3 h wurden intrinsische Fluoreszenzemissionsspektren bei 20 °C aufgenommen. Zur Überprüfung der Umkehrbarkeit der Entfaltung wurden Mutanten (0,70 mg/ml) bei 20 °C in 4 M GdmCl in PBS für 3 Std. entfaltet. Die erneute Faltung wurde durch 20-fache Verdünnung bei 20 °C in Lösungen des gleichen Puffers, der für die Entfaltung verwendet wurde, der sich verringernde GdmCl-Konzentrationen enthält, gestartet. Nach 3 h wurden intrinsische Fluoreszenzemissionsspektren bei 20 °C aufgenommen. Gleichgewichtsentfaltungsexperimente unter reduzierenden Bedingungen wurden durch Inkubation von 35 µg/ml scFv(HEL-11E) in 20 mM Tris-HCl, pH 9,0, 0,15 M NaCl, 2 mM DTT und 0,1 mM EDTA bei sich erhöhenden GdmCl-Konzentrationen (0 – 4 M) für 3 h bei 20 °C vor der Aufnahme der Fluoreszenzemissionsspektren durchgeführt. Für Entfaltungsexperimente wurde die Mutante (0,70 mg/ml) 3 hin 4 M GdmCl, 18 mM DTT und 1,0 mM EDTA bei pH 9,0 entfaltet, die Lösung wurde dann 25-fach in abfallenden GdmCl-Konzentrationen verdünnt und Fluoreszenzemissionsspektren wurden 3 h danach aufgenommen. Die Funktionalität aller Mutanten, die unter reduzierenden Bedingungen rückgefaltet wurden, wurde durch ELISA (s. oben) untersucht.

##### ii) Datenanalyse

**[0153]** Die Änderungen in den intrinsischen Fluoreszenzemissionsspektren bei sich erhöhenden GdmCl-Konzentrationen wurden bei der intensitätsdurchschnittlichen Emissionswellenlänge  $\bar{\lambda}$  (Roger et al., 1993) quantifiziert, die gemäß der folgenden Gleichung berechnet wird:

$$\bar{\lambda} = \frac{\sum (I_i \lambda_i)}{\sum I_i} \quad \text{Gl. 1}$$

worin  $\lambda_i$  und  $I_i$  die Emissionswellenlänge und deren korrespondierende Fluoreszenzintensität bei besagter Wellenlänge ist. Basislinien- und Übergangsregionsdaten für scFv(F8) GdmCl-Denaturierung wurden an ein Zwei-Zustands- (Santoro et al., 1988) lineares Extrapolationsmodell (LEM) gemäß der folgenden Gleichung angepasst:

$$\Delta G_{\text{entfalten}} = \Delta G_{2}^{\text{H}_2\text{O}} + m_g [\text{GdmCl}] = RT \ln K_{\text{entfalten}} \quad \text{Gl. 2}$$

worin  $\Delta G_{\text{entfalten}}$  die freie Energieänderung zur Entfaltung für eine gegebene denaturierende Konzentration ist,  $\Delta G_{2}^{\text{H}_2\text{O}}$  ist die freie Energieänderung zur Entfaltung in der Abwesenheit des Denaturierungsmittels und  $m$  ist die Steigung, die die Änderung in  $\Delta G_{\text{entfalten}}$  pro Konzentrationseinheit des Denaturierungsmittels wiedergibt,  $R$  ist die Gaskonstante,  $T$  ist die Temperatur und  $K_{\text{entfalten}}$  ist die Gleichgewichtskonstante zur Entfaltung. Das Modell drückt das Signal als eine Funktion der Konzentration des Denaturierungsmittels aus:

$$Y_i = \frac{Y_N + m_N [X]_i + (Y_D + m_D [X]_i) \cdot \exp [(-\Delta G_2^{H_2O} - m_g [X]_i) / RT]}{1 + \exp [(-\Delta G_2^{H_2O} - m_g [X]_i) / RT]}$$

**[0154]** Worin  $Y_i$  das beobachtete Signal ist,  $Y_N$  und  $Y_D$  sind die Basislinienschnittpunkte, die jeweils mit den nativen und denaturierten Proteinen korrespondieren,  $m_N$  und  $m_D$  sind die korrespondierenden Basisliniensteigungen,  $[X]_i$  ist die Konzentration des Denaturierungsmittels nach der  $i$ -ten Zugabe,  $\Delta G_2^{H_2O}$  ist die extrapolierte freie Energie der Entfaltung in der Abwesenheit von Denaturierungsmittel,  $m_g$  ist die Steigung einer  $\Delta G_{\text{Entfalten}}$  gegen  $[X]$  Graphik,  $R$  ist die Gaskonstante,  $T$  ist die Temperatur. Die  $[GdmCl]_{0,5}$  ist die denaturierende Konzentration am Mittelpunkt des Übergangs und wird gemäß Gl. 2 wie folgt berechnet:

$$[GdmCl]_{0,5} = \Delta G_2^{H_2O} / m_g \quad \text{Gl. 4}$$

#### f. Affinitätsmessungen

**[0155]** Affinitäts-aufgereinigte scFvG4- und scFvB4-Antikörper gegen den Gurkenmosaikvirus (CMV) wurden auf 100 mg/ml unter Annahme einer  $OD_{280\text{nm}}$  von 1,0 aufkonzentriert, von der angenommen wird, dass sie mit einer scFv-Konzentration von 0,7 mg/ml korrespondiert. Die Bindungseigenschaften wurden unter Verwendung von Oberflächenplasmonresonanz (SPR) bewertet. Eine Echtzeitwechselwirkungsanalyse wurde in dem BIAcoreX Biosensorsystem (Pharmacia Biosensor AB) durchgeführt.

**[0156]** Ungefähr 5.400 Resonanzeinheiten (RU) von aufgereinigtem CMV (200 ng/ $\mu$ l in 7 mM Acetatpuffer, pH 4,0) wurden an einen CM5-Sensorchip unter Verwendung des Aminkopplungskits (Biacore AB) verbunden, um das Antigen zu immobilisieren. Die kinetische Analyse wurde unter kontinuierlichem Fluss von 20  $\mu$ l/Min. durchgeführt. Nach jeder Bindungsmessung wurde die Oberfläche mit 10 mM HCl regeneriert. Die Geschwindigkeitskonstanten wurden auf der Basis eines Einzelpositionsmodells unter Verwendung der BIAevaluation 2.1 Software (Biacore AB) gemessen. Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten ( $k_{on}$ ) wurden aus einer Grafik aus  $\ln(dR/dt) / t$  gegen die Konzentration über einen Bereich von sechs Konzentrationen (120, 150, 250, 300, 400 und 450 nM) für beide scFvs bestimmt. Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante ( $k_{off}$ ) wurde aus der Dissoziationsphase in dem Sensorgramm unter Verwendung der folgenden Gleichung bestimmt:

$$\ln R_{t_0} / R_t = k_{off} (t - t_0)$$

worin  $R_{t_0}$  die Reaktion 30 s nach Beendigung der Antikörperinjektion ist. Eine lineare Graphik von  $\ln R_t / R_{t_0}$  gegen  $(t - t_0)$  ergibt  $k_{off}$  direkt als Messung der Steigung. Die Gesamtaffinitätskonstanten ( $k_D$ ) wurden aus den Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten als  $k_D = k_{off} / k_{on}$  berechnet. Affinitätswerte waren 60 nM für scFvG4 und 10 nM für scFvB4.

#### Beispiel 8: Expression von Proteinen in dem Pflanzencytoplasma

##### a. Klonierung in PVX-abgeleitetem Vektor und Expression in *N. benthamiana*- Pflanzen

**[0157]** Wir brachten die scFvs-Konstrukte durch einen Kartoffelvirus X (PVX)-abgeleiteten Vektor (Chapman et al., 1992) in Pflanzen ein, um die höchsten Expressionsmengen zu erhalten. Sequenzen, die die scFvs kodieren, wurden unter Verwendung von Oligonukleotiden amplifiziert, die entwickelt wurden, um die Erkennungsstellen ClaI, SphI und XbaI stromaufwärts (PVX CSC back = TTC ATC GAT TTG CAT GCT CTA GAC ATG CAG GTG CAG CTG CAG) und die Erkennungsstelle Sall stromabwärts (PVX flap = TCC GTC GAC CTA CTT GTC GTC GTC GTC TCC GTA GTC) der scFv-Gene einzufügen. Die scFv-Gene wurden dann als ClaI – Sall – Fragmente in den Polylinker des Vektors pPVX201 (Baulcombe et al., 1995) eingefügt, einem Derivat des pGC3-Vektors (Chapman et al., 1992), der einzelne Klonierungsstellen enthält, die stromabwärts des PVX-Hüllprotein doppelsubgenomischen Promotors und einem CaMV (Blumenkohl Mosaik Virus) 35S-Promotors liegen. Somit wurden PVXscFv(G4)- und PVXscFv(B4)-Konstrukte erhalten. Diese Plasmide könnten direkt als Inokulum verwendet werden. DNA von jedem Konstrukt (40  $\mu$ g) wurde verwendet, um mechanisch zwei Blätter pro Pflanze von *N. benthamiana*-Pflanzen im 3- bis 4-Blattstadium zu inokulieren. Es wurden vier getrennte Experimente durchgeführt, bei denen mindestens 10 Pflanzen mit jedem Konstrukt infiziert wurden.

**[0158]** Symptome erschienen an den oberen Blättern üblicherweise 7 – 9 Tage nach Inokulierung. Sympto-

matische Blätter wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend in PBS-Puffer homogenisiert, der einen Cocktail aus Proteasehemmern enthielt (Complete®, EDTA-frei, Boehringer). Nach Zentrifugation bei  $20.000 \times g$  für 30 Min. bei  $4^\circ\text{C}$  wurden die Überstände verwendet, um die gesamte lösliche Protein (TSP)-Konzentration unter Verwendung des Bio-Rad Proteinassays und BSA als Standard zu bestimmen. Western Blots wurden unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers anti-FLAG M2 (Sigma) durchgeführt. Immunblots bestätigten das Vorhandensein eines 30 K-Moleküls, das mit scFvB4 oder scFvG4 in der löslichen Fraktion korrespondiert.

#### b. Tomatentransformation

**[0159]** Die scFvB4- und scFvG4-Gene wurden anschließend aus den PVXscFv(G4)- und PVXscFv(B4)-Konstrukten als XbaI-SalI-Fragmente in einen pBI-abgeleiteten Vektor unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors subkloniert. Die Plasmide wurden dann in den *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm EHA105 durch Elektroporation transferiert und für Blattdisktransformation auf dem Miniatur *Lycopersicon esculentum* cultivar, Micro-Tom (microtomato) (Meissner et al., 1997) verwendet. Transgene Microtomatenpflanzen wurden, im Wesentlichen wie beschrieben, (van Roekel et al., 1993) regeneriert.

**[0160]** Die Transformation der Pflanzen umfasste drei unabhängige Experimente für beide Konstrukte und primäre Transformanten wurden auf funktionelle Expression hin ausgewählt. Signale, die zu den scFvB4- und scFvG4-Antikörpern korrespondieren, wurden sowohl durch ELISA wie auch durch Immunblotten nachgewiesen. Insbesondere wurde der ELISA-Test gemäß dem folgenden Verfahren durchgeführt:  $5 \mu\text{g/ml}$  des aufgereinigten CMV-Antigens in PBS wurden O/N bei  $4^\circ\text{C}$  auf eine Mikrotiterplatte beschichtet. Nach dem Blockieren mit 5 % Milch in PBS wurden lösliche Pflanzenextrakte (wie oben beschrieben erhalten) O/N bei  $4^\circ\text{C}$  hinzugefügt. Die funktionelle Bindung wurde durch Verwendung des monoklonalen Antikörpers anti-FLAG M2 ( $2,5 \mu\text{g/ml}$ ) und eines Kaninchen-anti-Maus-Peroxidase-konjugierten Antikörpers (KPL) bewertet. Zur Signalentwicklung wurde ABTS Peroxidase-substrat (KPL) verwendet. Verschiedene transgene Pflanzen, die den rekombinanten Antikörper exprimieren, wurden hergestellt und mit dem Virus herausgefordert.

#### Bibliografie

- Harlow E., & Lane D. (1988) in *Antibodies: a Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).
- Kabat E. A., Wu T. T., Perry H. M., Gottesmann K. S., & Foeller C. (1991) 'Sequences of Proteins of Immunological Interest'. 5<sup>th</sup> ed. US Department of Health and Human Services, US Government Printing Office.
- Neri D., Petrucci H., Winter G., Light Y., Marais R., Britton K. E., & Creighton A. M. (1996) in *Nature Biotechnology* 14 : 485 – 490
- Nissim A., Hoogenboom H. R., Tomlison I. M., Flynn G., Midgley C., Lane D. & Winter G. (1994) in *The Embo Journal*, 13 : 692 – 698.
- Sambrook J., Fritsch E. F., & Maniatis T. (1989) in *Molecular Cloning* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).
- Tavladoraki P., Benvenuto E., Trinca S., De Martinis D., Cattaneo A., & Galeffi, P. (1993) in *Nature* 366 : 469 – 472.
- Tavladoraki P., Girotti A., Donini M., Arias F. J., Mancini C., Morea V., Chiaraluce R., Consalvi V., & Benvenuto E. (1999) in *European Journal of Biochemistry* 262 : 617 – 624.
- Visintin M., Tse E., Axelson H., Rabbitts T. H., & Cattaneo A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96 : 11723 – 11728.
- Bhat T. N. Bentley G. A., Fischman T. O., Boulot G., and Poljak R. G. (1990) in *Nature* 347 : 483 – 485.
- Jung. S. Honegger A. & Plücthun A. (1997). Improving in vivo folding and stability of a single chain Fv antibody fragment by loop grafting *Protein Eng.* 10, 959 – 966
- Baulcombe D. C., Chapman S. & Santa Cruz S. S. (1995). in *Plant Journal* 7 1045 – 1053.
- Chapman S., Kavanagh T. & Baulcombe D. C. (1992). in *Plant Journal* 2, 549 – 557.
- Meissner R., Jacobson Y., Melamed S., Levyatuv S., Shalev G., Ashri A., Elkind Y & Levy A. (1997). in *Plant Journal* 12, 1465 – 1472.
- Santoro, M. M. & Bolen, D. W. (1998). Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry*, 27, 8063 – 8068.
- Van Roekel J. S. C., Damm B., Melchers L. S. & Hoekema A. (1993). in *Plant Cell Reports* 12, 644 – 647.

## Sequenzauflistung

<110> Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente (ENEA)

<120> Stabilisierung von Peptiden, Polypeptiden und Antikörpern, die diese umfassen

<130> RM/X89713/EP-EBR

<140> EP 00204725.6

<141> 2000-12-21

<150> IT RM99A000803

<151> 1999-12-30

<160> 102

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> Artifiizielle Sequenz

<220> Diverses Merkmal

<222> (24) .. (24)

<223> Xaa ist Ala oder eine nicht polare Aminosäure

<400> 1

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Xaa Ser  
20 25

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Artifiizielle Sequenz

<220> Diverses Merkmal

<222> (12) .. (12)

<223> Xaa ist Leu oder eine nicht polare Aminosäure

<400> 2

Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Xaa Val Ala  
1 5 10

<210> 3

<211> 39

<212> PRT

<213> Artifiizielle Sequenz

<220> Diverses Merkmal

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa ist Pro, eine nicht polare Aminosäure oder eine Aminosäure ohne Ladung no

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (3) .. (3)  
 <223> Xaa ist Asp, eine Aminosäure oder polare Aminosäure ohne Ladung

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (13) .. (13)  
 <223> Xaa ist Arg oder eine basische Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (18) .. (18)  
 <223> Xaa ist Asn oder polare Aminosäure ohne Ladung

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (20) .. (20)  
 <223> Xaa ist Leu oder eine nicht polare Aminosäure

<400> 3

Tyr Xaa Xaa Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Xaa Asp Asn Ala  
 1 5 10 15

Lys Xaa Thr Xaa Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr  
 20 25 30

Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 35

<210> 4  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificielle Sequenz

<400> 4

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 5  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Artificielle Sequenz

<400> 5

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys  
 20

<210> 6  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificielle Sequenz

&lt;400&gt; 6

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificielle Sequenz

&lt;220&gt; Diverses Merkmal

&lt;221&gt;

&lt;222&gt; (12) .. (12)

&lt;223&gt; Xaa ist Arg, eine basische Aminosäure oder eine polare Aminosäure ohne Ladung

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Diverses Merkmal

&lt;222&gt; (15) .. (15)

&lt;223&gt; Xaa ist Phe, eine nicht polare Aminosäure oder eine polare Aminosäure ohne Ladung

&lt;400&gt; 7

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Xaa Thr Asp Xaa Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificielle Sequenz

&lt;400&gt; 8

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 1 5 10

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificielle Sequenz

&lt;400&gt; 9

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser  
 1 5 10

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificielle Sequenz

&lt;400&gt; 10

Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Phe  
 1 5 10

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 16

<212> PRT  
 <213> Artifielle Sequenz

<400> 11

Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10 15

<210> 12  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artifielle Sequenz

<400> 12

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His  
 1 5 10 15

<210> 13  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artifielle Sequenz

<400> 13

Arg Ala Leu Asn Leu Glu Ser  
 1 5

<210> 14  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artifielle Sequenz

<400> 14

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Trp Thr  
 1 5

<210> 15  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artifielle Sequenz

<400> 15

Glu Arg Asp Tyr Arg Leu Asp Tyr  
 1 5

<210> 16  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artifielle Sequenz

<400> 16

Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Arg Thr  
 1 5

<210> 17  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artifielle Sequenz

<400> 17

Thr Arg Pro Tyr Phe Asp Tyr

1

5

<210> 18  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artifiizielle Sequenz

&lt;400&gt; 18

Gln Gln Val Thr Tyr Lys Pro Trp Thr  
 1 5

<210> 19  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artifiizielle Sequenz

&lt;400&gt; 19

Glu Arg Trp Asp Phe Asp Tyr  
 1 5

<210> 20  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artifiizielle Sequenz

&lt;400&gt; 20

Gln Gln Ala Leu Ser Pro Pro Trp Thr  
 1 5

<210> 21  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artifiizielle Sequenz

&lt;400&gt; 21

Asn Trp Arg Arg Phe Asp Tyr  
 1 5

<210> 22  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artifiizielle Sequenz

&lt;400&gt; 22

Gln Gln Gly Ala Ser Ile Pro Trp Thr  
 1 5

<210> 23  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artifiizielle Sequenz

&lt;400&gt; 23

Gly Arg His Lys Phe Asp Tyr  
 1 5

<210> 24  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artifiizielle Sequenz

&lt;400&gt; 24

Gln Gln Tyr Gly Arg Arg Pro Trp Thr  
1 5

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificielle Sequenz

&lt;400&gt; 25

Asn Asn Trp Ser Phe Asp Tyr  
1 5

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificielle Sequenz

&lt;400&gt; 26

Gln Gln Gly Gln Arg Lys Pro Trp Thr  
1 5

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificielle Sequenz

&lt;400&gt; 27

Asn Asn Tyr Ser Phe Asp Tyr  
1 5

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificielle Sequenz

&lt;400&gt; 28

Gln Gln Gly Arg Arg Ala Pro Trp Thr  
1 5

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificielle Sequenz

&lt;400&gt; 29

Val Thr Tyr Asn Phe Asp Tyr  
1 5

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificielle Sequenz

&lt;400&gt; 30

Gln Gln Ser Arg Arg Pro Pro Trp Thr  
1 5

<210> 31  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Artifiizielle Sequenz e

<400> 31

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val  
 35 40 45  
 Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Gly Tyr Phe  
 100 105 110  
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 32  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Artifiizielle Sequenz

<400> 32

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr  
 20 25 30  
 Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Leu Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn  
 65 70 75 80  
 Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn  
 85 90 95  
 Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105 110

<210> 33  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Artifiizielle Sequenz

<400> 33

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

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

Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val  
35 40 45

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

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

Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Glu Arg Asp Tyr Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 34

<211> 108

<212> PRT

<213> Artifiizielle Sequenz

<400> 34

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

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

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

Tyr Tyr Thr Thr Thr Leu Ala Asp Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala  
65 70 75 80

Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Arg  
85 90 95

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

<210> 35

<211> 116

<212> PRT

<213> Artifiizielle Sequenz

<400> 35

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val

35

40

45

Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Thr Arg Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artifizielle Sequenz

&lt;400&gt; 36

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val His Asn Tyr  
20 25 30

Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Ala Leu Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Thr Tyr Lys Pro Trp  
85 90 95

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

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artifizielle Sequenz

&lt;400&gt; 37

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Glu Arg Trp Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 38

<211> 108

<212> PRT

<213> Artifielle Sequenz

<400> 38

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val His Asn Tyr  
20 25 30

Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Ala Leu Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Leu Ser Pro Pro Trp  
85 90 95

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

<210> 39

<211> 116

<212> PRT

<213> Artifielle Sequenz

<400> 39

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asn Trp Arg Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 40  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Artifielle Sequenz  
<400> 40

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val His Asn Tyr  
20 25 30

Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Ala Leu Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Ser Ile Pro Trp  
85 90 95

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

<210> 41  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Artifielle Sequenz  
<400> 41

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Arg His Lys Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 42  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Artifielle Sequenz

&lt;400&gt; 42

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val His Asn Tyr  
 20 25 30  
 Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Arg Ala Leu Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala  
 65 70 75 80  
 Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Arg Arg Pro Trp  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artifiizielle Sequenz

&lt;400&gt; 43

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val  
 35 40 45  
 Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Asn Trp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artifiizielle Sequenz

&lt;400&gt; 44

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val His Asn Tyr

20

25

30

Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Arg Ala Leu Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Arg Lys Pro Trp  
 85 90 95

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

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artifiizielle Sequenz

&lt;400&gt; 45

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val  
 35 40 45

Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

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

Thr Val Ser Ser  
 115

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artifiizielle Sequenz

&lt;400&gt; 46

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val His Asn Tyr  
 20 25 30

Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Arg Ala Leu Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Arg Arg Ala Pro Trp  
85 90 95

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

<210> 47

<211> 116

<212> PRT

<213> Artifiizielle Sequenz

<400> 47

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Val Thr Tyr Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 48

<211> 108

<212> PRT

<213> Artifiizielle Sequenz

<400> 48

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val His Asn Tyr  
20 25 30

Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Ala Leu Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg Arg Pro Pro Trp  
85 90 95

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

<210> 49  
<211> 252  
<212> PRT  
<213> Artifiizielle Sequenz

<400> 49

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Gly Tyr Phe  
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu  
130 135 140

Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr  
145 150 155 160

Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe  
165 170 175

Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
180 185 190

Tyr Arg Ala Leu Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
195 200 205

Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala  
210 215 220

Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Trp  
225 230 235 240

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
245 250

<210> 50  
<211> 239  
<212> PRT  
<213> Artifiizielle Sequenz

<400> 50

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly



cag gtg cag ctg cag gag tct ggg gga gac tta gtg cag cct gga ggg  
 48  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct  
 75  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
 20 25

<210> 53  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Artifielle Sequenz  
 <400> 53

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
 20 25

<210> 54  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artifielle Sequenz

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1) .. (42)  
 <223> Kodierend für H-FR2-F8

<400> 54  
 tgg gtt cgc cag act cca gac aag agg ctg gag ttg gtc gca  
 42  
 Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val Ala  
 1 5 10

<210> 55  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artifielle Sequenz  
 <400> 55

Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val Ala  
 1 5 10

<210> 56  
 <211> 117  
 <212> DNA  
 <213> Artifielle Sequenz

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1) .. (117)  
 <223> Kodierend für H-FR3-F8

<400> 56  
 tat cca gac agt gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc  
 48  
 Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala  
 1 5 10 15  
 aag aac acc ctg tac ctg caa atg agc agt ctg aag tct gag gac aca  
 96  
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr  
 20 25 30  
 gcc atg tat tac tgt gca aga  
 117  
 Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 35

<210> 57  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Artifielle Sequenz

<400> 57  
 Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala  
 1 5 10 15  
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr  
 20 25 30  
 Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 35

<210> 58  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artifielle Sequenz  
 <220>  
 <221> CBS  
 <222> (1) .. (33)  
 <223> Kodierend für H-FR4-F8

<400> 58  
 tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca  
 33  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 59  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artifielle Sequenz  
 <400> 59

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 60

<211> 69  
 <212> DNA  
 <213> Artificielle Sequenz

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(69)  
 <223> Kodierend für L-FR1-F8

<400> 60  
 gac atc gag ctc act cag tct cca gct tct ttg gct gtg tct cta ggg  
 48  
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

cag agg gcc acc ata tcc tgc  
 69  
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys  
 20

<210> 61  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Artificielle Sequenz

<400> 61

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys  
 20

<210> 62  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artificielle Sequenz

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(45)  
 <223> Kodierend für L-FR2-F8

<400> 62  
 tgg tac cag cag aaa cca gga cag cca ccc aaa ctc ctc atc tat  
 45  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

<210> 63  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificielle Sequenz

<400> 63

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

<210> 64  
 <211> 96  
 <212> DNA  
 <213> Artifielle Sequenz

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1) .. (96)  
 <223> Kodierend für L-FR3-F8

<400> 64  
 ggg atc cct gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct agg aca gac ttc acc  
 48  
 Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15  
 ctc acc att aat cct gtg gag gct gat gat gtt gca acc tat tac tgt  
 96  
 Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 65  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artifielle Sequenz

<400> 65  
 Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15  
 Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 66  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artifielle Sequenz

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1) .. (33)  
 <223> Kodierend für L-FR4-F8

<400> 66  
 ttc ggt gga ggc acc aag ctc gag atc aaa cgg  
 33  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 1 5 10

<210> 67  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artifielle Sequenz

<400> 67  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 1 5 10

<210> 68  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artifiizielle Sequenz

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(30)  
 <223> Kodierend für H-CDR-1-F8

<400> 68  
 gga ttc act ttc agt agc tat ggc atg tct  
 30  
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser  
 1 5 10

<210> 69  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artifiizielle Sequenz

<400> 69  
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser  
 1 5 10

<210> 70  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artifiizielle Sequenz

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(30)  
 <400> 70  
 acc att aat agt aat ggt ggt agc acc ttt  
 30  
 Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Phe  
 1 5 10

<210> 71  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artifiizielle Sequenz

<400> 71  
 Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Phe  
 1 5 10

<210> 72  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> Artifiizielle Sequenz

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(48)

<400> 72  
 aga agg aat tac ccc tat tac tac ggt agt aga ggc tac ttt gac tac  
 48  
 Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10 15

<210> 73  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artifielle Sequenz  
 <400> 73

Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10 15

<210> 74  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artifielle Sequenz

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(45)

<400> 74  
 aga gcc agt gaa agt gtt gat agt tat ggc aat agt ttt atg cac  
 45  
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His  
 1 5 10 15

<210> 75  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artifielle Sequenz

<400> 75  
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His  
 1 5 10 15

<210> 76  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artifielle Sequenz

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(21)

<400> 76  
 cgt gca tta aat cta gaa tct  
 21  
 Arg Ala Leu Asn Leu Glu Ser  
 1 5

<210> 77  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artifielle Sequenz

&lt;400&gt; 77

Arg Ala Leu Asn Leu Glu Ser  
1 5

&lt;210&gt; 78

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artifiizielle Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(27)

&lt;400&gt; 78

cag caa agt aat gag gat ccg tgg acg  
27  
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Trp Thr  
1 5

&lt;210&gt; 79

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artifiizielle Sequenz

&lt;400&gt; 79

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Trp Thr  
1 5

&lt;210&gt; 80

&lt;211&gt; 375

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artifiizielle Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(375)

&lt;223&gt; Kodierende DNA für VH-F8

&lt;400&gt; 80

cag gtg cag ctg cag gag tct ggg gga gac tta gtg cag cct gga ggg  
48  
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt agc tat  
96  
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

ggc atg tct tgg gtt cgc cag act cca gac aag agg ctg gag ttg gtc  
144  
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val  
35 40 45

gca acc att aat agt aat ggt ggt agc acc ttt tat cca gac agt gtg  
192  
Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac acc ctg tac

240

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

ctg caa atg agc agt ctg aag tct gag gac aca gcc atg tat tac tgt  
 288

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

gca aga aga agg aat tac ccc tat tac tac ggt agt aga ggc tac ttt  
 336

Ala Arg Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Gly Tyr Phe  
 100 105 110

gac tac tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca  
 375

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

&lt;210&gt; 81

&lt;211&gt; 125

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artifielle Sequenz se

&lt;400&gt; 81

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val  
 35 40 45

Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Gly Tyr Phe  
 100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

&lt;210&gt; 82

&lt;211&gt; 336

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artifielle Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(336)

&lt;400&gt; 82

gac atc gag ctc act cag tct cca gct tct ttg gct gtg tct cta ggg  
48Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gcc agt gaa agt gtt gat agt tat  
96Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr  
20 25 30ggc aat agt ttt atg cac tgg tac cag cag aaa cca gga cag cca ccc  
144Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45aaa ctc ctc atc tat cgt gca tta aat cta gaa tct ggg atc cct gcc  
192Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Leu Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala  
50 55 60agg ttc agt ggc agt ggg tct agg aca gac ttc acc ctc acc att aat  
240Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn  
65 70 75 80cct gtg gag gct gat gat gtt gca acc tat tac tgt cag caa agt aat  
288Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn  
85 90 95gag gat ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctc gag atc aaa cgg  
336Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105 110

&lt;210&gt; 83

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artifiizielle Sequenz

&lt;400&gt; 83

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr  
20 25 30Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Leu Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala  
50 55 60Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn  
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105 110

- <210> 84
- <211> 756
- <212> DNA
- <213> Artifiizielle Sequenz
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(756)

<400> 84  
 cag gtg cag ctg cag gag tct ggg gga gac tta gtg cag cct gga ggg  
 48  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt agc tat  
 96  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 ggc atg tct tgg gtt cgc cag act cca gac aag agg ctg gag ttg gtc  
 144  
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val  
 35 40 45  
 gca acc att aat agt aat ggt ggt agc acc ttt tat cca gac agt gtg  
 192  
 Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60  
 aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac acc ctg tac  
 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 ctg caa atg agc agt ctg aag tct gag gac aca gcc atg tat tac tgt  
 288  
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 gca aga aga agg aat tac ccc tat tac tac ggt agt aga ggc tac ttt  
 336  
 Ala Arg Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Gly Tyr Phe  
 100 105 110  
 gac tac tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggt gga ggc  
 384  
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
 115 120 125  
 ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg gac atc gag ctc  
 432  
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu  
 130 135 140  
 act cag tct cca gct tct ttg gct gtg tct cta ggg cag agg gcc acc  
 480  
 Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr



Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu  
 130 135 140

Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr  
 145 150 155 160

Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe  
 165 170 175

Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
 180 185 190

Tyr Arg Ala Leu Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 195 200 205

Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala  
 210 215 220

Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Trp  
 225 230 235 240

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 245 250

<210> 86  
 <211> 717  
 <212> DNA  
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(717)  
 <223> Kodierende DNA für scFv (P5)

<400> 86  
 cag gtg cag ctg cag gag tct ggg gga gac tta gtg cag cct gga ggg  
 48  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gtc tct gga ttc agt ttg act ggc tat  
 96  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr  
 20 25 30

ggc gtg aat tgg gtt cgc cag act cca gac aag agg ctg gag tgg gtc  
 144  
 Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

gca atg att tgg ggt gat ggt aac acc gat tat aat tcc agt gtg aag

192  
Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ser Val Lys  
50 55 60

ggc cga ttc acc atc tcc aaa gac aat gcc aag agc acc gtg tac ctg  
240  
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

caa atg agc agt ctg aag tct gag gac aca gcc atg tat tac tgt gca  
288  
Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

aga gaa agg gat tac cgc ctt gac tac tgg ggc caa ggg acc acg gtc  
336  
Arg Glu Arg Asp Tyr Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
100 105 110

acc gtc tcc tca ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt  
384  
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
115 120 125

ggc gga tcg gac atc gag ctc act cag tct cca gct tct ttg gct gtg  
432  
Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val  
130 135 140

tct cta ggg cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gcc agt gga aat att  
480  
Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile  
145 150 155 160

cat aat tat ttg gcc tgg tac cag cag aaa cca gga cag cca ccc aar  
528  
His Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys  
165 170 175

ctc ctc atc tat tat aca aca act cta gca gat ggg atc cct gcc agg  
576  
Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Thr Thr Leu Ala Asp Gly Ile Pro Ala Arg  
180 185 190

ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac tac acc ctc acc att aat cct  
624  
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Asn Pro  
195 200 205

gtg gag gct gat gat gtt gca acc tat tac tgt cag cac ttt tgg tcg  
672  
Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser  
210 215 220

act ccg agg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctc gag atc aaa cgg  
717  
Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
225 230 235

<210> 87  
<211> 239  
<212> PRT  
<213> Artificielle Sequenz  
<400> 87

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr  
 20 25 30  
 Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ser Val Lys  
 50 55 60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Arg Glu Arg Asp Tyr Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 115 120 125  
 Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val  
 130 135 140  
 Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile  
 145 150 155 160  
 His Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys  
 165 170 175  
 Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Thr Thr Leu Ala Asp Gly Ile Pro Ala Arg  
 180 185 190  
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Asn Pro  
 195 200 205  
 Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser  
 210 215 220  
 Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 225 230 235

<210> 88  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificielle Sequenz

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (2) .. (2)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (3) .. (3)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (4) .. (4)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (5) .. (5)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (6) .. (6)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (7) .. (7)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (9) .. (9)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (10) .. (10)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<400> 88

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

10

<210> 89  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artifiizielle Sequenz

<220>  
<221> Diverses Merkmal  
<222> (1) .. (1)  
<223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
<221> Diverses Merkmal  
<222> (2) .. (2)  
<223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3) .. (3)  
<223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
<221> Diverses Merkmal  
<222> (4) .. (4)  
<223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
<221> Diverses Merkmal  
<222> (5) .. (5)  
<223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
<221> Diverses Merkmal  
<222> (6) .. (6)  
<223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
<221> Diverses Merkmal  
<222> (7) .. (7)  
<223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
<221> Diverses Merkmal  
<222> (8) .. (8)  
<223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
<221> Diverses Merkmal  
<222> (9) .. (9)  
<223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
<221> Diverses Merkmal  
<222> (10) .. (10)  
<223> Xaa ist jegliche Aminosäure

&lt;400&gt; 89

Xaa  
 1 5 10

&lt;210&gt; 90

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificielle Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Diverses Merkmal

&lt;222&gt; (1) .. (1)

&lt;223&gt; Xaa ist jegliche Aminosäure

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Diverses Merkmal

&lt;222&gt; (2) .. (2)

&lt;223&gt; Xaa ist jegliche Aminosäure

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Diverses Merkmal

&lt;222&gt; (3) .. (3)

&lt;223&gt; Xaa ist jegliche Aminosäure

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Diverses Merkmal

&lt;222&gt; (4) .. (4)

&lt;223&gt; Xaa ist jegliche Aminosäure

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Diverses Merkmal

&lt;222&gt; (5) .. (5)

&lt;223&gt; Xaa ist jegliche Aminosäure

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Diverses Merkmal

&lt;222&gt; (6) .. (6)

&lt;223&gt; Xaa ist jegliche Aminosäure und kann durch Deletion entfernt werden

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Diverses Merkmal

&lt;222&gt; (7) .. (7)

&lt;223&gt; Xaa ist jegliche Aminosäure und kann durch Deletion entfernt werden

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Diverses Merkmal

&lt;222&gt; (8) .. (8)

&lt;223&gt; Xaa ist jegliche Aminosäure und kann durch Deletion entfernt werden

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Diverses Merkmal

&lt;222&gt; (9) .. (9)

&lt;223&gt; Xaa ist jegliche Aminosäure und kann durch Deletion entfernt werden

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (10) .. (10)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure und kann durch Deletion entfernt werden

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (11) .. (11)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure und kann durch Deletion entfernt werden

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (12) .. (12)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure und kann durch Deletion entfernt werden

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (13) .. (13)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure und kann durch Deletion entfernt werden

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (14) .. (14)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (15) .. (15)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (16) .. (16)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<400> 90

Xaa  
 1 5 10 15

<210> 91  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artifielle Sequenz

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (2) .. (2)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal

- <222> (3) .. (3)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure
- <220> Diverses Merkmal  
 <221> (4) .. (4)  
 <222> Xaa ist jegliche Aminosäure
- <220> Diverses Merkmal  
 <221> (5) .. (5)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure
- <220> Diverses Merkmal  
 <221> (6) .. (6)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure
- <220> Diverses Merkmal  
 <221> (7) .. (7)  
 <222> Xaa ist jegliche Aminosäure und kann durch Deletion entfernt werden  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure und kann durch Deletion entfernt werden
- <220> Diverses Merkmal  
 <221> (8) .. (8)  
 <222> Xaa ist jegliche Aminosäure und kann durch Deletion entfernt werden  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure und kann durch Deletion entfernt werden
- <220> Diverses Merkmal  
 <221> (9) .. (9)  
 <222> Xaa ist jegliche Aminosäure und kann durch Deletion entfernt werden  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure und kann durch Deletion entfernt werden
- <220> Diverses Merkmal  
 <221> (10) .. (10)  
 <222> Xaa ist jegliche Aminosäure und kann durch Deletion entfernt werden  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure und kann durch Deletion entfernt werden
- <220> Diverses Merkmal  
 <221> (11) .. (11)  
 <222> Xaa ist jegliche Aminosäure  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure
- <220> Diverses Merkmal  
 <221> (12) .. (12)  
 <222> Xaa ist jegliche Aminosäure  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure
- <220> Diverses Merkmal  
 <221> (13) .. (13)  
 <222> Xaa ist jegliche Aminosäure  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure
- <220> Diverses Merkmal  
 <221> (14) .. (14)

<222> (14) .. (14)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure d

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (15) .. (15)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<400> 91

Xaa  
 1 5 10 15

<210> 92  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificielle Sequenz e

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (2) .. (2)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (3) .. (3)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (4) .. (4)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (5) .. (5)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (6) .. (6)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (7) .. (7)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<400> 92

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 93  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artifizielle Sequenz

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (2) .. (2)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (3) .. (3)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (4) .. (4)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (5) .. (5)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (6) .. (6)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (7) .. (7)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (9) .. (9)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<400> 93

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 94

<211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artifielle Sequenz  
 <400> 94

Arg Ala Ser Glu Ser Val His Asn Tyr Met His  
 1 5 10

<210> 95  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artifielle Sequenz  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(33)  
 <223> Kodierende DNA für L-CDR1-Mut

<400> 95  
 aga gcc agt gaa agt gtt cat aat tat atg cac  
 33  
 Arg Ala Ser Glu Ser Val His Asn Tyr Met His  
 1 5 10

<210> 96  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artifielle Sequenz  
 <400> 96

Arg Ala Ser Glu Ser Val His Asn Tyr Met His  
 1 5 10

<210> 97  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artifiell: Peptid peptide  
 <400> 97

Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly Val Asn  
 1 5 10

<210> 98  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artifielle Sequenz  
 <400> 98

Met Ile Trp Gly Asp Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ser Val Lys Gly  
 1 5 10 15

<210> 99  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artifielle Sequenz  
 <400> 99

Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu Ala



<220>  
<221> Diverses Merkmal  
<222> (34) .. (34)  
<223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
<221> Diverses Merkmal  
<222> (35) .. (35)  
<223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
<221> Diverses Merkmal  
<222> (36) .. (36)  
<223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
<221> Diverses Merkmal  
<222> (48) .. (48)  
<223> Xaa ist Leu oder eine nicht polare Aminosäure

<220>  
<221> Diverses Merkmal  
<222> (51) .. (51)  
<223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (52) .. (52)  
<223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
<221> Diverses Merkmal  
<222> (53) .. (53)  
<223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
<221> Diverses Merkmal  
<222> (54) .. (54)  
<223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
<221> Diverses Merkmal  
<222> (55) .. (55)  
<223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
<221> Diverses Merkmal  
<222> (56) .. (56)  
<223> Xaa is any amino acid

<220>  
<221> Diverses Merkmal  
<222> (57) .. (57)  
<223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (58) .. (58)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (59) .. (59)  
 <223> Xaa is any amino acid

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (60) .. (60)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (62) .. (62)  
 <223> Xaa ist Pro, eine nicht polare Aminosäure oder eine Aminosäure  
 charg ohne Ladung

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (63) .. (63)  
 <223> Xaa ist Asp, eine nicht polare Aminosäure oder eine Aminosäure  
 charg ohne Ladung

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (73) .. (73)  
 <223> Xaa ist Arg oder eine basische Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (78) .. (78)  
 <223> Xaa ist Asn oder eine polare Aminosäure ohne Ladung

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (80) .. (80)  
 <223> Xaa ist Leu oder eine nicht polare Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (99) .. (99)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (100) .. (100)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal

<222> (101) .. (101)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (102) .. (102)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (103) .. (103)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (104) .. (104)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure oder kann durch Deletion entfernt werden

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (105) .. (105)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure oder kann durch Deletion entfernt werden

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (106) .. (106)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure oder kann durch Deletion entfernt werden

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (107) .. (107)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure oder kann durch Deletion entfernt werden

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (108) .. (108)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure oder kann durch Deletion entfernt werden

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (109) .. (109)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure oder kann durch Deletion entfernt werden

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (110) .. (110)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure oder kann durch Deletion entfernt werden

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (111) .. (111)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure oder kann durch Deletion entfernt werden

<220>  
 <221> Diverses Merkmal

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (58) .. (58)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (59) .. (59)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (60) .. (60)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (62) .. (62)  
 <223> Xaa ist Pro, eine nicht polare Aminosäure oder eine Aminosäure ohne Ladung

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (63) .. (63)  
 <223> Xaa ist Asp, eine nicht polare Aminosäure oder eine Aminosäure ohne Ladung  
 charg

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (73) .. (73)  
 <223> Xaa ist Arg oder eine basische Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (78) .. (78)  
 <223> Xaa ist Asn, eine polare Aminosäure ohne Ladung

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (80) .. (80)  
 <223> Xaa ist Leu, eine nicht polare Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (99) .. (99)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (100) .. (100)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal

<222> (101) .. (101)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (102) .. (102)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (103) .. (103)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (104) .. (104)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure oder kann durch Deletion entfernt werden

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (105) .. (105)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure oder kann durch Deletion entfernt werden

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (106) .. (106)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure oder kann durch Deletion entfernt werden

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (107) .. (107)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure oder kann durch Deletion entfernt werden

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (108) .. (108)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure oder kann durch Deletion entfernt werden

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (109) .. (109)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure oder kann durch Deletion entfernt werden

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (110) .. (110)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure oder kann durch Deletion entfernt werden

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (111) .. (111)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure oder kann durch Deletion entfernt werden

<220>  
 <221> Diverses Merkmal

<222> (112) .. (112)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (113) .. (113)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (114) .. (114)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<400> 101

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Gly	Asp	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Xaa	Ser	Xaa						
			20					25					30		
Xaa	Xaa	Xaa	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Asp	Lys	Arg	Leu	Glu	Xaa	Val
		35					40					45			
Ala	Xaa	Tyr	Xaa	Xaa	Ser	Val									
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Xaa	Asp	Asn	Ala	Lys	Xaa	Thr	Xaa	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Xaa													
			100						105					110	
Xaa	Xaa	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
		115					120					125			

<210> 102  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Artificielle Sequenz

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (24) .. (24)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (25) .. (25)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (26) .. (26)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>

<221> Diverses Merkmal  
 <222> (27) .. (27)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (28) .. (28)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (29) .. (29)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (30) .. (30)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure oder kann durch Deletion entfernt werden

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (31) .. (31)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure oder kann durch Deletion entfernt werden

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (32) .. (32)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure oder kann durch Deletion entfernt werden

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (33) .. (33)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure oder kann durch Deletion entfernt werden

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (34) .. (34)  
 <223> Xaa is any amino acid

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (35) .. (35)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (36) .. (36)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (37) .. (37)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>

<221> Diverses Merkmal  
 <222> (38) . . (38)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (54) . . (54)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (55) . . (55)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (56) . . (56)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (57) . . (57)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (58) . . (58)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (59) . . (59)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (60) . . (60)  
 <223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (72) . . (72)  
 <223> Xaa ist Arg, eine nicht polare Aminosäure oder eine Aminosäure  
 charg ohne Ladung

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (75) . . (75)  
 <223> Xaa ist Phe, eine nicht polare Aminosäure oder eine Aminosäure  
 charg ohne Ladung

<220>  
 <221> Diverses Merkmal  
 <222> (93) . . (93)

<223> : Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>

<221> Diverses Merkmal

<222> (94) .. (94)

<223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>

<221> , Diverses Merkmal

<222> (95) .. (95)

<223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>

<221> Diverses Merkmal

<222> (96) .. (96)

<223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>

<221> Diverses Merkmal

<222> (97) .. (97)

<223> } Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>

<221> Diverses Merkmal

<222> (98) .. (98)

<223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>

<221> Diverses Merkmal

<222> (99) .. (99)

<223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>

<221> Diverses Merkmal

<222> (100) .. (100)

<223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<220>

<221> , Diverses Merkmal

<222> (101) .. (101)

<223> Xaa ist jegliche Aminosäure

<400> 102

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Ile Pro Ala  
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Xaa Thr Asp Xaa Thr Leu Thr Ile Asn



ist.

8. Ein Verfahren zur Herstellung von Peptiden, die einem Antikörper entweder Bindungsspezifität gegenüber einem vorbestimmten Antigen oder Löslichkeit und Stabilität im Zytoplasma vermitteln, das den folgenden Schritt umfasst:

- die Herstellung eines Antikörpers, der als eine variable Region der schweren Kette das Polypeptid aufweist, das Gerüstpeptide der schweren Kette (H-FR) und Peptide der komplementaritätsbestimmenden Regionen der schweren Kette (H-CDR) gemäß den Ansprüchen 1 – 3 umfasst, und als eine variable Region der leichten Kette das Polypeptid, das die Gerüstpeptide der leichten Kette (L-FR) und die Peptide der komplementaritätsbestimmenden Regionen der leichten Kette (L-CDR) gemäß den Ansprüchen 1 – 3 umfasst;
- das in Kontakt bringen von besagtem Antikörper mit besagtem Antigen und
- das Auswählen des Antikörpers, der besagtes Antigen bindet,
- das Isolieren des Polypeptids der variablen Region der schweren Kette und/oder des Polypeptids der variablen Region der leichten Kette des Antikörpers, der besagtes Antigen bindet,
- das Isolieren entweder des Teils von besagtem Antikörper, der die Bindungsspezifität des besagtem Antikörper vermittelt oder des Teils, der die Stabilität und Löslichkeit im Zytoplasma von besagtem Antikörper vermittelt.

9. Ein Peptid, das Bindungsspezifität für ein vorbestimmtes Antigen vermittelt, das durch das Verfahren gemäß Anspruch 8 herstellbar ist.

10. Das Peptid gemäß Anspruch 9, das durch die Tatsache gekennzeichnet ist, dass es eine Sequenz umfasst, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus den Sequenzen besteht, die in der beigefügten Sequenzaufzählung von SEQ ID NO: 9 – SEQ ID NO: 30 und als SEQ ID NO: 94 gezeigt werden.

11. Ein Antikörper, der eine schwere Kette umfasst, wobei die variable Region von besagter schweren Kette Gerüstpeptide der schweren Kette (H-FR) und Peptide der komplementaritätsbestimmenden Regionen der schweren Kette (H-CDR) umfasst, wobei H-FR1, H-CD1, H-FR2, H-CDR2, H-FR3, H-CDR3, H-FR4 kovalent miteinander in der genannten Reihenfolge verbunden sind, und eine leichte Kette umfasst, wobei die variable Region von besagter leichten Kette Gerüstpeptide der leichten Kette (L-FR) und Peptide der komplementaritätsbestimmenden Regionen der leichten Kette (L-CDR) umfasst, wobei L-FR1, L-CDR1, L-FR2, L-CDR2, L-FR3, L-CDR3, L-FR4 kovalent miteinander in der genannten Reihenfolge verbunden sind, worin H-FR-1 SEQ ID NO: 1 ist, H-FR-2 ist SEQ ID NO: 2, H-FR-3 ist SEQ ID NO: 3, H-FR-4 ist SEQ ID NO: 4, L-FR-1 ist SEQ ID NO: 5, L-FR-2 ist SEQ ID NO: 6, L-FR-3 ist SEQ ID NO: 7 und L-FR-4 ist SEQ ID NO: 8.

12. Ein Antikörper gemäß Anspruch 11, der durch die Tatsache gekennzeichnet ist, dass er als variable Region der schweren Kette ein Polypeptid umfasst, das die Sequenz umfasst, die in der beigefügten Sequenzaufzählung als SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45 oder SEQ ID NO: 47 aufgelistet ist, und respektive als variable Region der leichten Kette ein Polypeptid, das die Sequenzen umfasst, die in der beigefügten Sequenzaufzählung als SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46 oder SEQ ID NO: 48 aufgelistet sind.

13. Ein Antikörper gemäß Anspruch 11, worin besagter Antikörper ein scFv, FAB, Fv, dAb, IgG oder IgA ist.

14. Ein Antikörper gemäß Anspruch 12, worin besagter Antikörper ein scFv, FAB, IgG oder IgA ist.

15. Ein Antikörper gemäß Anspruch 13 oder 14, worin besagter Antikörper ein scFV ist und die Polypeptide, die als variable Region der schweren Kette und der leichten Kette mit umfasst sind, durch einen Linker verbunden sind.

16. Ein Antikörper gemäß Anspruch 15, worin besagter Linker die Sequenz umfasst, die in der beigefügten Sequenzaufzählung in SEQ ID NO: 51 aufgezeigt wird.

17. Ein Verfahren zur Gewinnung eines Antikörpers gemäß einem der Ansprüche 11–16 mit einer Bindungsspezifität für ein vorbestimmtes Antigen, das die folgenden Schritte umfasst:

- die Herstellung eines Antikörpers, der als eine variable Region der schweren Kette das Polypeptid aufweist, das Gerüstpeptide der schweren Kette (H-FR) und Peptide der komplementaritätsbestimmenden Regionen der schweren Kette (H-CDR) gemäß den Ansprüchen 1 – 3 umfasst, und als eine variable Region der leichten Kette das Polypeptid, das die Gerüstpeptide der leichten Kette (L-FR) und die Peptide der komplementaritäts-

bestimmenden Regionen der leichten Kette (L-CDR) gemäß den Ansprüchen 1 – 3 umfasst;  
– das in Kontakt bringen von besagtem Antikörper mit besagtem Antigen und  
– das Auswählen des Antikörpers, der besagtes Antigen bindet.

18. Ein Polypeptid, das durch die Tatsache gekennzeichnet ist, dass es für ein Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1 – 4 kodiert.

19. Ein Polypeptid, das durch die Tatsache gekennzeichnet ist, dass es für ein Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 9 und 10 kodiert.

20. Ein Polynukleotid gemäß Anspruch 18, das eine Sequenz umfasst, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus den Sequenzen besteht, die in der beigefügten Sequenzaufzählung als SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93 und SEQ ID NO: 95 gezeigt werden.

21. Ein Polypeptid, das durch die Tatsache gekennzeichnet ist, dass es für einen Antikörper gemäß einem der Ansprüche 11–16 kodiert.

22. Ein Polynukleotid gemäß Anspruch 21, das eine Sequenz umfasst, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus den Sequenzen besteht, die in der beigefügten Sequenzaufzählung als SEQ ID NO: 84 bis SEQ ID NO: 86 gezeigt werden.

23. Eine pharmazeutische Zusammensetzung, die durch die Tatsache gekennzeichnet ist, dass sie als ein aktives Mittel eine therapeutisch wirksame Menge eines Antikörpers gemäß einem der Ansprüche 11–16 zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Trägermittel oder Hilfsstoff umfasst.

24. Eine pharmazeutische Zusammensetzung, die durch die Tatsache gekennzeichnet ist, dass sie als ein aktives Mittel eine therapeutisch wirksame Menge der Polynukleotide gemäß einem der Ansprüche 18 – 22 zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Trägermittel oder Hilfsstoff umfasst.

25. Der Antikörper gemäß einem der Ansprüche 11–16 zur Verwendung als ein Medikament.

26. Verwendung des Antikörpers gemäß einem der Ansprüche 11–16 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Pathologien, die mit der Anhäufung eines Moleküls innerhalb oder außerhalb einer menschlichen oder tierischen Zelle assoziiert sind.

27. Ein Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 18 – 22 zur Verwendung als ein Medikament.

28. Verwendung des Polynukleotids gemäß einem der Ansprüche 18 – 22 zur Herstellung eines Medikaments zur Gentherapie von Pathologien, die mit der Anhäufung eines Moleküls innerhalb oder außerhalb einer menschlichen oder tierischen Zelle assoziiert sind.

29. Verwendung der Antikörper gemäß einem der Ansprüche 11–16 und/oder der Polynukleotide gemäß einem der Ansprüche 18 – 22 zur in-vitro-Diagnose von Pathologien, die mit der Anhäufung eines Moleküls innerhalb oder außerhalb einer menschlichen, tierischen oder pflanzlichen Zelle assoziiert sind.

30. Ein diagnostisches Kit, das als ein Reagenz einen Antikörper gemäß einem der Ansprüche 11–16 und/oder die Polynukleotide gemäß einem der Ansprüche 18 – 22 umfasst.

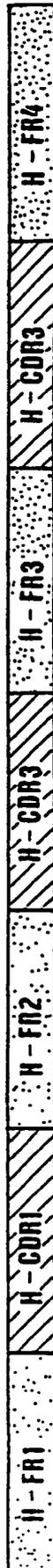
31. Ein diagnostisches Kit, das als ein Reagenz ein Peptid gemäß Anspruch 9 oder 10 umfasst.

32. Verwendung eines Antikörpers gemäß einem der Ansprüche 11–16 und/oder eines Polynukleotid gemäß Anspruch 18 – 22 zur Behandlung von Pathologien, die mit der Anhäufung eines Moleküls innerhalb oder außerhalb einer pflanzlichen Zelle assoziiert sind.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

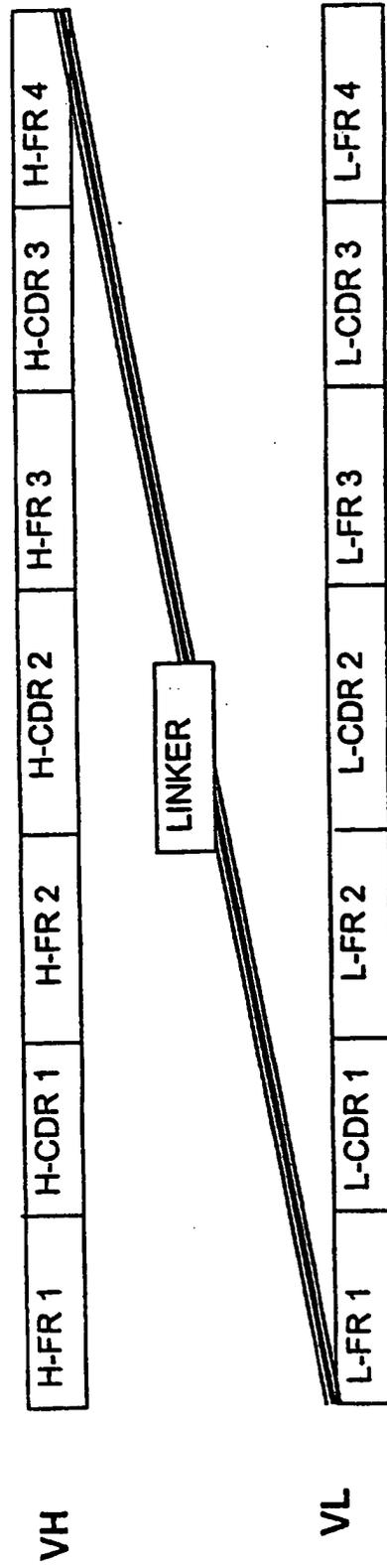
**VH**



**VL**

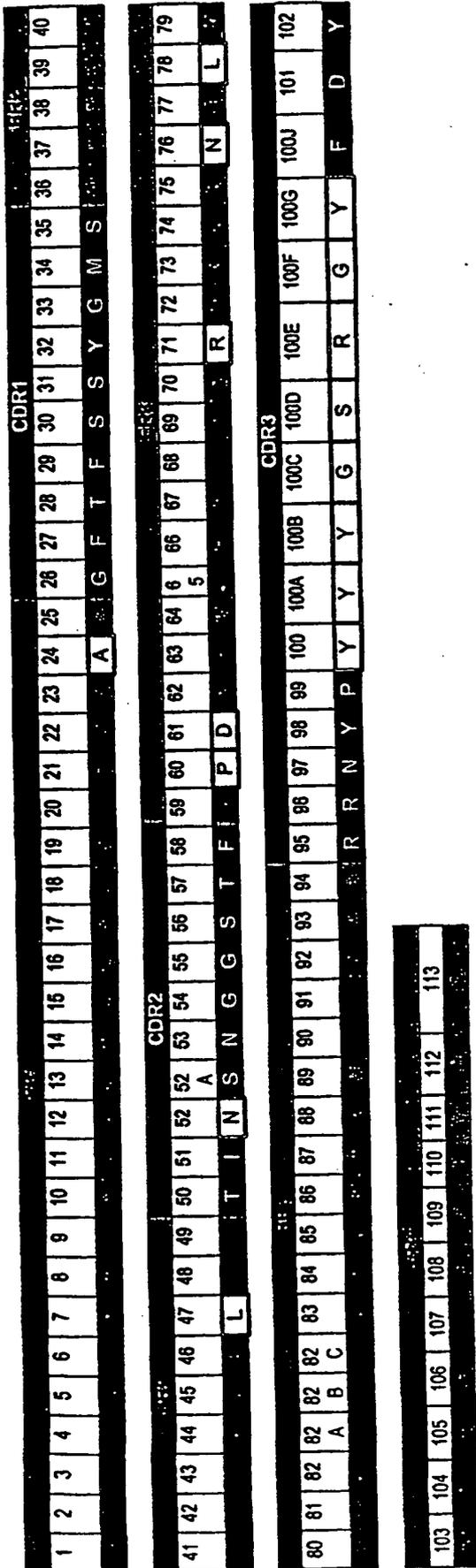


**FIG. 1**



**FIG. 2**

VH



VL

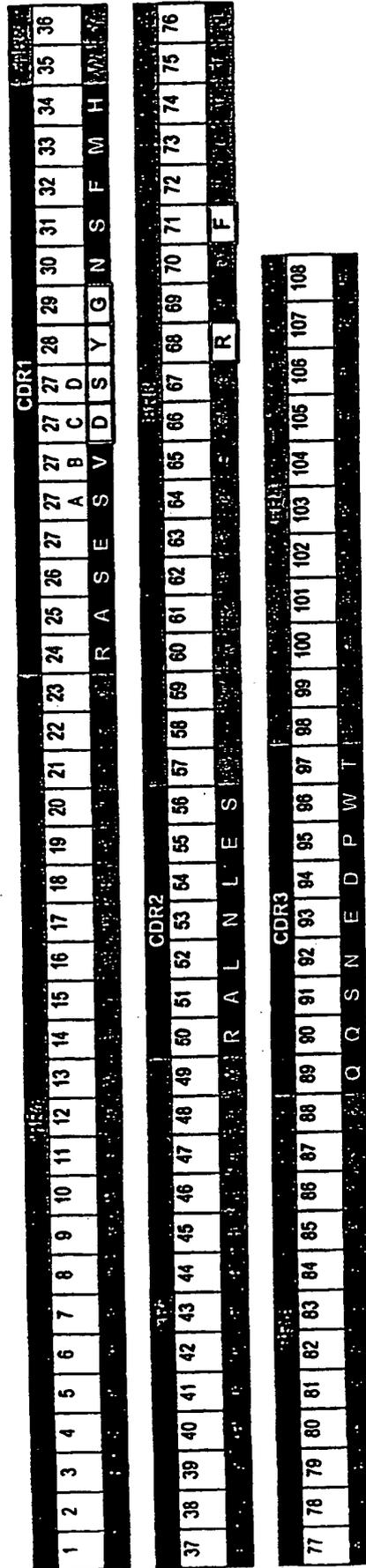


FIG. 3

VH

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
P8	QVQLQESGGDLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMHWVQTDPKRLLELVATINSNGSTFPDVKQKPTISRDNAKNTLYLQHSLSKSEDTAMYYCARRRNPYYTGGSGYFDYWGQGITVTVSS						
P1	QVQLQESGGDLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMHWVQTDPKRLLELVATI-WGDGSTDPDVKQKPTISRDNAKNTLYLQHSLSKSEDTAMYYCARRRDYR-----FDYWGQGITVTVSS						
P2	QVQLQESGGDLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMHWVQTDPKRLLEWVAHI-WGDGNTDYPDVKQKPTISRDNAKNTLYLQHSLSKSEDTAMYYCARRDYR-----LDYWGQGITVTVSS						
P3	QVQLQESGGDLVQPGGSLKLSCAVSGFSLTIGYGVNWRQTDPKRLLEWVAHI-WGDGNTDYPDVKQKPTISRDNAKNTLYLQHSLSKSEDTAMYYCARRDYR-----LDYWGQGITVTVSS						
P4	QVQLQESGGDLVQPGGSLKLSCAVSGFSLTIGYGVNWRQTDPKRLLEWVAHI-WGDGNTDYPDVKQKPTISRDNAKNTLYLQHSLSKSEDTAMYYCARRDYR-----LDYWGQGITVTVSS						
P5	QVQLQESGGDLVQPGGSLKLSCAVSGFSLTIGYGVNWRQTDPKRLLEWVAHI-WGDGNTDYPDVKQKPTISRDNAKNTLYLQHSLSKSEDTAMYYCARRDYR-----LDYWGQGITVTVSS						
D1.3	QVQLQESGDPVAPPSLSITCVSGFSLTIGYGVNWRQPPGKLEWLGMI-WGDGNTDYNALSLSKLSISKDNKSKSVFLKMSLSLHTDDTARYYCARESDYR-----LDYWGQGITVTVSS						

VL

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
F8	DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASEVDSYGNFHMWYQKFGQPPKLLIYRALNLESQIPARFSGSGSRDFTLTINPVEADVDVATYYCQGSNEDPWFPGGTKLEIKR						
P1	DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASEV---HNYYQHWYQKFGQPPKLLIYALLESQIPARFSGSGSRDFTLTINPVEADVDVATYYCQGSNEDPWFPGGTKLEIKR						
P2	DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASGNV-----HNYYAWYQKFGQPPKLLIYITTLADQIPARFSGSGSRDFTLTINPVEADVDVATYYCQHFWSIPWFPGGTKLEIKR						
P3	DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASGNI-----HNYYLAWYQKFGQPPKLLIYITTLADQIPARFSGSGSRDFTLTINPVEADVDVATYYCQHFWSIPWFPGGTKLEIKR						
P4	DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASGNI-----HNYYLAWYQKFGQPPKLLIYITTLADQIPARFSGSGSRDFTLTINPVEADVDVATYYCQHFWSIPWFPGGTKLEIKR						
P5	DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASGNI-----HNYYLAWYQKFGQPPKLLIYITTLADQIPARFSGSGSRDFTLTINPVEADVDVATYYCQHFWSIPWFPGGTKLEIKR						
D1.3	DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASGNI-----HNYYLAWYQKFGQPPKLLIYITTLADQIPARFSGSGSRDFTLTINPVEADVDVATYYCQHFWSIPWFPGGTKLEIKR						

FIG. 4

	24	25	26	27	27A	27B	27C	27D	28	29	30	31	32	33	34
<b>L-CDR1-F8:</b>	R	A	S	E	S	V	D	S	Y	G	N	S	F	M	H
							.				.	.	:		
<b>L-CDR1-MUT:</b>	R	A	S	E	S	V	H	.	.	.	.	N	Y	M	H

**FIG. 5**

VHa: (5')AAT CCA TGC CAT GGC CCA GGT GCA GCT GCA GGA GTC TGG G(3')

VHf: (5')GGT CCC TTG GCC CCA GTA GTC AAA MNN MNN MNN TCT TGC ACA GTA ATA CAT GGC TG(3')

VLa: (5')TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC(3')

VLf: (5')GAG CTT GGT GCC TCC ACC GAA CGT CCA CGG MNN MNN MNN MNN TTG CTG ACA GTA ATA GGT TGCC(3')

VLe: (5')TTC TCG ACT TGC GGC CGC CCG TTT GAT CTC GAG CTT GGT GCC TCC ACC GAA CG(3')

**FIG. 6**

VH



VL



FIG. 7