



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 36 748 T2** 2007.10.11

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 812 333 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 36 748.3**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US96/02754**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 907 146.3**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1996/026964**
(86) PCT-Anmeldetag: **29.02.1996**
(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **06.09.1996**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.12.1997**
(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **06.12.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **11.10.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 16/16 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 5/12 (2006.01)
C12N 5/16 (2006.01)
C12N 5/18 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
397411 **01.03.1995** **US**

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

(73) Patentinhaber:
PDL BioPharma, Inc., Fremont, Calif., US; Iowa Immunotherapy Investigators, Iowa City, Ia., US

(72) Erfinder:
WEINER, George, Iowa City, IA 52246, US; GINGRICH, Roger, Iowa City, IA 52246, US; LINK, K., Brian, Coralville, IA 52241, US; TSO, Yun, J., Menlo Park, CA 94025, US

(74) Vertreter:
WUESTHOFF & WUESTHOFF Patent- und Rechtsanwälte, 81541 München

(54) Bezeichnung: **BISPEZIFISCHER ANTIKÖRPER ZUR EFFEKTIVEN BEHANDLUNG VON B-ZELL LYMPHOMEN UND ZELLINIEN**

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

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

Beschreibung

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0001] Die Verabreichung von monoklonalen Antikörpern (MoAb) hat sich als vielversprechend erwiesen, und zwar als eine neue Behandlungsmodalität für humanes Malignom. Jedoch tritt die Zerstörung von malignen Zellen durch MoAb sogar nach erfolgreichem Binden des Antikörpers an die Zielzelle nicht immer auf. Eine zweite Herangehensweise zur Malignom-Immunotherapie involviert die Manipulation des zellulären Immunsystems. Lymphokine wie IL-2 können verwendet werden, um sowohl NK-Zellen als auch T-Zellen zu aktivieren, die aus dem Blut, der Milz oder malignen Tumoren selbst isoliert wurden. Die Anti-Tumoreffekte solcher Zellen sind gut dokumentiert worden, und zwar sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Die Toxizität einer Therapie, die allein auf IL-2 beruht, kann ernsthaft sein und kann den klinischen Nutzen dieser Therapie sehr einschränken.

[0002] Eine Malignom-Immunotherapie, welche die Spezifität von Antikörpern mit der Kraft von aktivierten Lymphozyten versucht zu kombinieren, kann effektiver und weniger toxisch sein. Eine solche Herangehensweise stellt die Verwendung von bispezifischen Antikörpern dar, um aktivierte T-Zelltoxizität in die Richtung von Tumorzellen umzuleiten, die das Zielantigen (Ag.) exprimieren.

[0003] Verschiedene Formen von bispezifischen Antikörpern sind hergestellt worden. Diese schließen BSIgG, welche IgG-Moleküle sind, die zwei verschiedene schwere Ketten und zwei verschiedene leichte Ketten umfassen, die durch so genannte „Hybrid-Hybridome“ sezerniert werden, und Heteroantikörperkonjugate, die durch die chemische Konjugation von Antikörpern oder Antikörperfragmenten verschiedener Spezifitäten hergestellt werden, ein.

[0004] Mehrere Forscher haben Anti-CD3/Anti-Tumor-bispezifische Antikörperstrukturen als immunotherapeutische Mittel evaluiert. Segal DM, Urch CE, George AJT, Jost CR, „Bispecific Antibodies in cancer treatment“ in DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (Hg.), *Biologic Therapy of Cancer Updates* (Philadelphia, PA, Lippincott 1992). Solche Studien haben von einer *in-vitro*-Zytolyse von Nierenzellkarzinom, Melanom, Gliom, Lymphom, Leukämie und Zellen berichtet, die das „Multidrug-Resistance-related“ Glykoprotein exprimieren. Es ist auch von IL-2-aktivierten humanen peripheren Lymphozyten, die durch bestimmte Anti-CD3/Anti-Tumor-spezifische Heteroantikörperkonjugate gelenkt werden, berichtet worden, dass sie das Wachstum von humanen Karzinom-Xenografts in Nacktmäusen verhindern. *In-vitro*- und *in-vivo*-Studien an immunschwachen Mäusen, die humane Xenografts trugen, haben berichtet, dass bestimmte bispezifische Antikörper in der Lage sind, das Wachstum sowohl von Tumorzellen, die bestimmte Zielantigene tragen, als auch teilweise von Tumorzellen im Abseits, die von dem therapeutischen Antikörper nicht erkannt werden, zu blockieren.

[0005] Link und Weiner, 1993 (*Blond*, Band 81, Nr. 12, S. 3343-3349) erörtern einen bispezifischen Antikörper, der sowohl CD3 als auch das Zielantigen 1D10 erkennt, das auf einer Mehrzahl von malignen humanen B-Zellen zu finden ist (siehe auch Link und Weiner, 1992, *Proc. Am. Association for Canc. Res. Annual Meeting*, Band 33, S. 345).

[0006] Die Charakterisierung des B-Zell-Antigens 1D10 zeigte, dass es ein heterodimeres Polypeptid von α - und β -Ketten mit Molekulargewichten von 32 bzw. 28 kD ist. Das Antigen wurde ursprünglich durch die Verwendung eines Antikörpers (ebenfalls als 1D10 bezeichnet), der spezifisch für das Antigen ist, identifiziert (Ginrich et al., 1990, *Blond*, Band 75, Nr. 12, S. 2375-2387).

[0007] Ein Verfahren zur Herstellung bispezifischer Antikörper wird durch Kostelny et al., 1992 (*J. Immunology*, Band 148, Nr. 5, S. 1547-1553) erörtert. Dieses Verfahren setzt die Verwendung von überlagerungsbildenden Leucin-Reißverschluss (bzw. Zipper)-Peptiden von Fos und Jun ein. Die Peptide wurden von zwei verschiedenen monoklonalen Antikörpern zu Fab-Abschnitten umverknüpft, wodurch ihre dimere Assoziation erleichtert wird.

[0008] Verfahren zur Entwicklung und Erzeugung humanisierter monoklonaler Antikörper mit einer oder mehreren komplementärbestimmenden Regionen (CDRs) aus einem Spenderimmunoglobulin und einer Gerüstregion aus einem humanen Immunoglobulin sind erörtert worden (WO 90/07861). Zusätzlich ist das Potential für die Verwendung humanisierter Antikörper in gesteigerten Therapien ebenfalls betrachtet worden (Joliffe, 1992, *Intern. Rev. Immunol.*, Band 10, 1993, S. 241-250).

[0009] Die Zellmembranen von Lymphozyten sind einzigartig konstruiert und bestimmen solch verschiedene zelluläre phänotypische Charakteristika, wie die Unterdrückungs-, Induktions- oder zytolytische Funktion der

Zelle, den Zustand der Aktivierung oder das Stadium der Differenzierung der Zelle, und ob die Zelle zu einer Population gehört, die monoklonal oder polyklonal ist. Die überwiegende Mehrheit von zellulären Membranantigenen, die bisher auf malignen Lymphozyten beschrieben wurden, sind auf nicht-malignen Lymphozyten in einem gewissen Stadium der Differenzierung oder Aktivierung vertreten.

[0010] Aus dem Vorerwähnten ist es ersichtlich, dass ein Bedarf für therapeutische Mittel besteht, die gegen ein Antigen gerichtet sind, das überwiegend oder ausschließlich auf malignen Zellen zu finden ist, und die in der Lage sind, starke zytolytische Aktivität gegen solche Zellen zu induzieren. Die vorliegende Erfindung erfüllt dieses und andere Bedürfnisse.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0011] Die vorliegende Erfindung basiert auf der Erkenntnis, dass ein bispezifischer monoklonaler Antikörper, der an maligne B-Zelllymphome und an T-Zellen bindet, gebildet werden kann, der nur an malignen B-Zellen effektiv bindet und nicht an normalen B-Zellen bindet.

[0012] Ferner basiert die vorliegende Erfindung auf der Erkenntnis, dass ein bispezifischer Antikörper aus einer Zelllinie gebildet werden kann, die aus einem peripher diffusen großen Zelllymphom erhalten wird, um einen monoklonalen Antikörper zu erzeugen, der nur für maligne B-Zellen spezifisch ist, und dass dieser monoklonale Antikörper modifiziert werden kann, um einen bispezifischen Antikörper zu bilden, der auch an Killer-T-Zellen oder NK-Zellen bindet.

[0013] Die vorliegende Erfindung basiert ferner auf der Erkenntnis, dass eine Zelllinie, die aus einer Fusion einer Zelllinie, die einen IgG-Antikörper spezifisch gegen die T-Zellen oder NK-Zellen produziert, und einer Zelllinie, die den IgG-Antikörper spezifisch gegen B-Zellmalignome produziert, gebildet wird, ihrerseits einen einzigartigen bispezifischen Antikörper produziert, der sowohl an maligne B-Zellen als auch an T-Zellen oder NK-Zellen effektiv bindet, wobei die Lyse oder Zerstörung der malignen B-Zellen bewirkt wird.

[0014] Eine Zelllinie stammte aus der Fusion einer Zelllinie, die einen Antikörper spezifisch gegen das CD3-Antigen der T-Zelle produziert, in Kombination mit einer Zelllinie spezifisch gegen ein Heterodimer auf der Zellmembran der malignen B-Zellen, wie weiter unten erläutert.

[0015] Hierin beschrieben wird der 1D10-Antikörper, der spezifisch für das heterodimere 28/32-kDa-Protein auf der Oberfläche von malignen B-Zellen ist.

[0016] Gemäß einem Aspekt stellt die Erfindung eine humanisierte Version des Maus-Antikörpers 1D10 bereit, wobei der Maus-Antikörper gekennzeichnet ist durch eine variable Region einer leichten Kette, dargestellt in der [Fig. 4A](#) untere Abbildung, und eine variable Region einer schweren Kette, dargestellt in der [Fig. 4B](#) untere Abbildung. In einer Ausführungsform stellt die Erfindung einen humanisierten Antikörper bereit, wie oben beschrieben, wobei der Antikörper (1) eine humanisierte leichte Kette, die drei komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR1, CDR2 und CDR3) mit Aminosäuresequenzen der entsprechenden komplementaritätsbestimmenden Regionen der leichten Kette des 1D10-Immunglobulins und eine variable Gerüstregion einer variablen Gerüstregionssequenz einer humanen kappa leichten Kette umfasst, mit Ausnahme an wenigstens einer Position, die aus einer ersten Gruppe gewählt ist, die aus L48, L49, L69 und L70 besteht, wobei die Aminosäureposition durch die gleiche Aminosäure belegt ist, die an der entsprechenden Position der variablen Gerüstregion der leichten Kette des 1D10-Immunglobulins vorhanden ist; und (2) eine humanisierte schwere Kette umfasst, die drei komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR1, CDR2 und CDR3) mit Aminosäuresequenzen der entsprechenden komplementaritätsbestimmenden Regionen der schweren Kette des 1D10-Immunglobulins und eine variable Gerüstregion einer variablen Gerüstregionssequenz einer humanen schweren Kette umfasst, mit Ausnahme an wenigstens einer Position, die aus einer zweiten Gruppe gewählt ist, die aus H27, H29, H30, H37, H87, H71, H78 und H83 besteht, wobei die Aminosäureposition durch die gleiche Aminosäure belegt ist, die an der entsprechenden Position der variablen Gerüstregion der schweren Kette des Maus-1D10-Immunglobulins vorhanden ist. Der humanisierte Antikörper bindet spezifisch das heterodimere 28/32-kDa-Protein, das auf der Oberfläche von malignen B-Zellen vorhanden ist, und zwar mit einer Bindungsaffinität mit einer unteren Grenze von etwa 10^7 M^{-1} und einer oberen Grenze des Fünffachen der Bindungsaffinität des 1D10-Immunglobulins. Vorzugsweise ist die variable Gerüstregion der humanisierten leichten Kette aus dem R3.5H5G-Antikörper (mit Ausnahme an der wenigstens einen Position, die aus der ersten Gruppe gewählt ist, und mit Ausnahme an Position 43, die durch die Aminosäure belegt ist, die an der entsprechenden Position einer humanen kappa Untergruppe I Konsensus-Sequenz vorhanden ist) und die humanisierte schwere Kette ist aus der variablen Gerüstregion der schweren Kette des IC4-Antikörpers (mit Ausnah-

me an der wenigstens einen Position, die aus der zweiten Gruppe gewählt ist, und mit Ausnahme an Position 73, die durch die gleiche Aminosäure belegt ist, die an der entsprechenden Position einer humanen Immunglobulin-Untergruppe II oder IV Konsensus-Sequenz vorhanden ist).

[0017] Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung humanisierte Antikörper bereit, die spezifisch für das CD3-Antigen sind. Die Antikörper umfassen humanisierte schwere und leichte Ketten. Die humanisierte leichte Kette umfasst drei komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR1, CDR2 und CDR3) mit Aminosäuresequenzen der entsprechenden komplementaritätsbestimmenden Regionen der leichten Kette des M291-Immunglobulins und eine variable Gerüstregion aus einer variablen Gerüstregionssequenz einer humanen kappa leichten Kette. Die humanisierte schwere Kette umfasst drei komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR1, CDR2 und CDR3) mit Aminosäuresequenzen der entsprechenden komplementaritätsbestimmenden Regionen der schweren Kette des M291-Immunglobulins und eine variable Gerüstregion aus einer variablen Gerüstregionssequenz einer humanen schweren Kette, mit Ausnahme an wenigstens einer Position, die aus einer zweiten Gruppe gewählt ist, die aus H30, H67, H68, H70, H72 und H74 besteht, wobei die Aminosäureposition durch die gleiche Aminosäure belegt ist, die an der entsprechenden Position der variablen Gerüstregion der schweren Kette des Maus-M291-Immunglobulins vorhanden ist. Das M291-Immunglobulin ist gekennzeichnet durch eine variable Region einer leichten Kette, wie in der [Fig. 5A](#) untere Abbildung dargestellt, und eine variable Region einer schweren Kette, dargestellt in der [Fig. 5B](#) untere Abbildung. Der humanisierte Antikörper bindet spezifisch an ein CD3-Antigen auf der Oberfläche von T-Zellen, und zwar mit einer Bindungsaffinität mit einer unteren Grenze von etwa 10^7 M^{-1} und einer oberen Grenze des Fünffachen der Bindungsaffinität des M291-Immunglobulins. Vorzugsweise ist die variable Gerüstregion der humanisierten leichten Kette aus der variablen Gerüstregion der leichten Kette des HF2-1/17-Antikörpers in der Untergruppe I, und die Gerüstregion der humanisierten schweren Kette ist aus der variablen Gerüstregion der schweren Kette des 21/28-Antikörpers, mit Ausnahme an wenigstens einer Position, die aus der zweiten Gruppe gewählt ist, und mit Ausnahme an Position 44, die durch die gleiche Aminosäure belegt ist, die an der entsprechenden Position einer humanen Immunglobulin-Untergruppe I Konsensus-Sequenz vorhanden ist.

[0018] In einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung humanisierte bispezifische Antikörper bereit, die ein erstes Bindungsfragment umfassen, das spezifisch an das CD3-Antigen bindet, und ein zweites Bindungsfragment, das spezifisch an das heterodimere 28/32-kDa-Antigen auf der Oberfläche der malignen B-Zellen bindet. Das erste Bindungsfragment umfasst eine humanisierte Form der variablen Region der schweren Kette des M291-Antikörpers, wie in der [Fig. 5B](#) untere Abbildung dargestellt, und eine humanisierte Form der variablen Region der leichten Kette des M291-Antikörpers, wie in der [Fig. 5A](#) untere Abbildung dargestellt. Das zweite Bindungsfragment, das an das erste Bindungsfragment verknüpft ist, umfasst eine humanisierte Form der variablen Region der schweren Kette des 1D10-Antikörpers, wie in der [Fig. 4B](#) untere Tafel dargestellt, und eine humanisierte Form der variablen Region der leichten Kette des 1D10-Antikörpers, wie in der [Fig. 4A](#) untere Tafel dargestellt.

[0019] Das erste und zweite Bindungsfragment umfassen ferner jeweils ein Segment einer konstanten Region, die mit den entsprechenden variablen Regionen der schweren Ketten verschmolzen ist, und die Bindungsfragmente sind durch Assoziation der konstanten Regionen verknüpft. Zum Beispiel können die Bindungsfragmente Fab oder Fab' sein. Sofern beide Bindungsfragmente Fab' sind, ist der bispezifische Antikörper ein $F(ab')_2$. Optional umfassen die ersten und zweiten Bindungsfragmente ferner erste und zweite Leucin-Reißverschlüsse, die mit den entsprechenden konstanten Regionen verschmolzen sind.

[0020] Die Erfindung stellt ferner die Verwendung von einem bispezifischen Antikörper der Erfindung in der Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung eines Patienten bereit, der an einer der Krankheiten leidet, die aus akuter lymphoblastischer Leukämie, B-Zellleukämie, chronischer lymphozytischer Leukämie und multiplem Myelom gewählt ist, wobei das Medikament optional auch ein Mittel einschließt, um T-Zellen in dem Patienten zu aktivieren, z. B. IL-2.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0021] Die [Fig. 1](#) ist eine Graphik, welche die Lyse von malignen B-Zellen durch den spezifischen Antikörper der vorliegenden Erfindung darstellt;

[0022] Die [Fig. 2](#) ist eine Graphik, welche die Lyse von Raji-Zellen darstellt, verursacht durch verschiedene Konzentrationen des Antikörpers der vorliegenden Erfindung; die [Fig. 3](#) ist eine Graphik, welche die Lyse von KH-Zellen über einen Zeitraum durch den bispezifischen Antikörper der vorliegenden Erfindung darstellt, wobei sie auch eine vergleichende Studie darstellt.

[0023] Fig. 4. Aminosäuresequenzen der variablen Regionen der leichten Ketten (A) und der schweren Ketten (B) des humanisierten 1D10-Antikörpers (obere Linien) und Maus-1D10-Antikörpers (untere Linien), wobei die Signalsequenzen nicht eingeschlossen sind. Die drei CDRs in jeder Kette sind unterstrichen. Reste in dem humanen Gerüst, die durch Maus-Aminosäuren oder humane Konsensus-Aminosäuren ersetzt worden sind, sind doppelt unterstrichen. Aminosäuresequenzen der vollständigen leichten Kette und der schweren Kette des humanisierten 1D10 sind in (C) bzw. (E) dargestellt. Die V_L -Domäne besteht aus den Resten 1-107 und der C_K 108-214. Die V_H -Domäne besteht aus den Resten 1-116, der C_H1 117-214, dem Gelenk 215-229, der C_H2 230-339 und der C_H3 -Domäne 340-446. Die Aminosäuresequenz des Fd-Jun in dem humanisierten F(ab'-Reißverschluss) von 1D10 ist in (D) dargestellt. Die V_H -Domäne besteht aus den Resten 1-116, der C_H1 -Domäne 117-214, dem modifizierten Gelenk 215-234 und dem Fos-Leucin-Reißverschluss 235-273.

[0024] Fig. 5. Aminosäuresequenzen der variablen Regionen der leichten Ketten (A) und der schweren Ketten (B) des humanisierten M291-Antikörpers (obere Linien) und Maus-M291-Antikörpers (untere Linien), wobei die Signalsequenzen nicht eingeschlossen sind. Die drei CDRs in jeder Kette sind unterstrichen. Reste in dem humanen Gerüst, die durch Maus-Aminosäuren oder humanen Konsensus-Aminosäuren ersetzt worden sind, sind doppelt unterstrichen. Aminosäuresequenzen der vollständigen leichten Kette des humanisierten M291 sind in (C) dargestellt. Die V_L -Domäne besteht aus den Resten 1-106 und der humanen C_K -Domäne 107-213. Die Aminosäuresequenz des Fd-Fos in dem humanisierten F(ab'-Reißverschluss)2 von M291 ist in (D) dargestellt. Die V_H -Domäne besteht aus den Resten 1-120, der C_H1 -Domäne 121-218, dem modifizierten Gelenk 219-238 und dem Fos-Leucin-Reißverschluss 239-279.

[0025] Fig. 6. Konstruktion des Plasmids pHu1D10.IgG1.rG.dE, das zur Expression des humanisierten 1D10-IgG1 verwendet wurde.

[0026] Fig. 7. (A). Verdrängungsassay zum Vergleich der relativen Affinität von humanisiertem 1D10 und murinem 1D10 für das Antigen. Untersättigungsmengen an murinem 1D10-IgG2a-FITC auf Raji-Zellen wurden durch zunehmende Mengen an murinem 1D10-IgG2a oder humanisiertem 1D10-IgG1 verdrängt. Raji-Zellen wurden in vollständigem Medium bei $2,5 \times 10^6$ /ml resuspendiert. Verdünnungen des Test- (humanisiertes 1D10-IgG1) oder Kontroll- (murines 1D10-IgG2a) Antikörpers wurden zugegeben und bei 4°C 1 Stunde lang inkubiert. Eine festgelegte Untersättigungsmenge an murinem 1D10-IgG2a-FITC wurde zugegeben, und die Zellen wurden bei 4°C 1 Stunde lang inkubiert, gewaschen und in 1%igem Paraformaldehyd resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend unter Anwendung von Durchflusszytometrie analysiert. Die Werte wurden in % Inhibition von Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Kontrolle ohne kompetitiven Antikörper ausgedrückt. (B). Scatchard-Diagrammanalyse des Bindens von ^{125}I -markiertem humanisiertem 1D10-IgG1 an Raji-Zellen. Die Scatchard-Analyse wurde durch Binden von Verdünnungen des markierten Antikörpers an 4×10^5 Raji-Zellen in 0,2 ml 90 min lang bei 0°C durchgeführt. Die Zellen wurden in Bindungspuffer (2%iges Pferdeserum in PBS, enthaltend 0,1% Natriumazid) gewaschen und gezählt. Die unspezifische Bindung wurde durch Inhibition der spezifischen Bindung mit einem Überschuss von nicht-markiertem humanisiertem 1D10-IgG1 bestimmt. Die apparente K_D und die Anzahl an Bindungsstellen wurden aus der Neigung bzw. dem X-Achsenabschnitt des Scatchard-Diagramms berechnet.

[0027] Fig. 8. (A). Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizitäts-(ADCC)-Fähigkeit durch verschiedene 1D10-Isotypen. ^{51}Cr -markierte humane Raji-Lymphomzellen wurden als Ziele für (\blacktriangle) murines 1D10-IgG1, (c) murines 1D10-IgG2a oder (\blacksquare) humanisiertes 1D10-IgG1 verwendet, und humane periphere Mononukleare als Effektorzellen. Das Effektor:Ziel-Verhältnis war 40:1. Die spontane Freisetzung machte weniger als 20% von der gesamten Freisetzung aus. Die Balken repräsentieren SEM. (B). Komplement-vermittelte Zytotoxizität durch verschiedene 1D10-Isotypen. ^{51}Cr -markierte humane Raji-Lymphomzellen wurden als Ziele für (\blacktriangle) murines 1D10-IgG1, (\bullet) murines 1D10-IgG2a oder (\blacksquare) humanisiertes 1D10-IgG1 verwendet, und humane Seren aus einer Normalperson als Komplement verwendet. Die spontane Freisetzung machte weniger als 20% von der gesamten Freisetzung aus. Die Balken repräsentieren SEM.

[0028] Fig. 9. Schematische Diagramme der Plasmide pHu1D10-Jun.rG.dE und pHuM291-Fos.rG.dE zur Expression von Hu1D10-Jun und HuM291-Fos-F(ab'-Reißverschluss)₂. Die Konstruktionen dieser beiden Plasmide waren ähnlich wie die von pHu1D10.IgG1 in der Fig. 6, mit Ausnahme der Ersetzung der C_H2 - und C_H3 -Exons durch die Leucin-Reißverschluss-Sequenzen Jun und Fos. Das Polyadenylierungssignal für das Fd-Reißverschlusstranskript stammt aus der nichtcodierenden 3'-Sequenz des Maus-IgG2a-Gens (siehe Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547 (1992)).

[0029] Fig. 10. (A). Die Sequenz des modifizierten humanen IgG1-Gelenks, das in der Gelenk-Reißverschluss-Fusion verwendet wurde. Zwei Reste Lys-Cys (unterstrichen) wurden in das modifizierte Gelenk ein-

gesetzt. Das erste Cys in diesem modifizierten Gelenk bildet eine Disulfidbindung mit der leichten Kette und die letzten drei Cys-Reste bilden Disulfide zwischen den schweren Ketten. Zum Vergleich sind Gelenksequenzen des humanen IgG1 (B) und des Maus-IgG2a (C) ebenfalls dargestellt. Alle drei Cys-Reste in dem Maus-IgG2a-Gelenk werden für Disulfide zwischen den schweren Ketten verwendet. Nach der Insertion von Lys-Cys weisen das modifizierte Gelenk und das Maus-IgG2a-Gelenk eine extensive Sequenzhomologie in der Nähe des COOH-Terminus auf.

[0030] Fig. 11. (A). Verdrängungsassay zum Vergleich der relativen Affinität von HuM291-Fos und M291 für ihr Antigen. Untersättigungsmengen an murinem M291-FITC auf humanen T-Zellen wurden durch zunehmende Mengen an murinem M291 oder HuM291-Fos verdrängt. T-Zellen wurden in vollständigem Medium bei $2,5 \times 10^6$ /ml resuspendiert. Verdünnungen des Test-(HuM291-Fos) oder Kontroll-(muriner M291) Antikörpers wurden zugegeben und bei 4°C 1 Stunde lang inkubiert. Eine festgelegte Untersättigungsmenge an murinem M291-FITC wurde zugegeben, und die Zellen wurden bei 4°C 1 Stunde lang inkubiert, gewaschen und in 1%igem Paraformaldehyd resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend unter Anwendung von Durchflusszytometrie analysiert. Die Werte wurden in % Inhibition von Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Kontrolle ohne kompetitiven Antikörper ausgedrückt. (B). Scatchard-Diagrammanalyse des Bindens von ^{125}I -markiertem HuM291-Fos an aktivierten humanen T-Zellen. Die Scatchard-Analyse wurde durch Binden von Verdünnungen von markiertem Antikörper an 4×10^5 T-Zellen in 0,2 ml 90 min lang bei 0°C durchgeführt. Die Zellen wurden in Bindungspuffer (2%iges Pferdeserum in PBS, enthaltend 0,1% Natriumazid) gewaschen und gezählt. Die unspezifische Bindung wurde durch Inhibition des spezifischen Bindens mit einem Überschuss von nicht-markiertem HuM291-Fos bestimmt. Die apparente K_d und die Anzahl an Bindungsstellen wurden aus der Neigung bzw. dem X-Achsenabschnitt des Scatchard-Diagramms berechnet.

[0031] Fig. 12. Bispezifischer Antikörper induzierte T-Zell-vermittelte Lyse von 1D10-positiven Zellen. T-Zellen in humanen PBL wurden durch den Anti-CD3-Antikörper OKT3 aktiviert und durch ihre Kultivierung in IL-2 expandiert. Zielzellen wurden mit ^{51}Cr markiert und gewaschen. T-Zellen und markierte Zielzellen wurden in einem Effektor:Ziel-Verhältnis von 25:1 in V-Boden-Mikrotiterplatten plattiert. Antikörper wurden in gewünschter Konzentration zugegeben. Die verwendeten Antikörper waren: Hu1D10-Jun, HuM291-Fos, der bispezifische Maus-IgG-1DT3-D und der humanisierte bispezifische F(ab'-Reißverschluss)₂-Hu1D10-Jun \times HuM291-Fos. Die Platten wurden bei 37°C 4 Stunden lang inkubiert, zentrifugiert, und die Zielzelllyse wurde durch Bestimmung der Menge an freigesetztem ^{51}Cr gemessen. Prozentangaben der spezifischen Freisetzung wurden in diesem Zytotoxizitätsassay berechnet als: $\{\text{Durch Antikörper freigesetzte Zählungen minus freigesetzte Zählungen ohne zugegebenen Antikörper}\} / \{\text{Durch 0,1 \%iges SDS freigesetzte Zählungen minus freigesetzte Zählungen ohne zugegebenem Antikörper}\} \times 100$.

DEFINITIONEN

[0032] Der Terminus „beträchtliche Identität“ oder „beträchtliche Homologie“ bedeutet, dass zwei Peptidsequenzen, sofern optimal aligniert, wie durch die Programme GAP oder BESTFIT, die voreingestellte Lückenschichtungen verwenden, wenigstens 65 Prozent Sequenzidentität, vorzugsweise wenigstens 80 oder 90 Prozent Sequenzidentität, stärker bevorzugt wenigstens 95 Prozent Sequenzidentität oder mehr (z. B. 99 Prozent Sequenzidentität) teilen. Vorzugsweise unterscheiden sich Restpositionen, die nicht identisch sind, durch konservative Aminosäuresubstitutionen.

[0033] Zu Zwecken der Klassifizierung von Aminosäuresubstitutionen als konservativ oder nicht-konservativ werden Aminosäuren wie folgt gruppiert: Gruppe I (hydrophobe Seitenketten): Norleucin, Met, Ala, Val, Leu, Ile; Gruppe II (neutrale hydrophile Seitenketten): Cys, Ser, Thr; Gruppe III (saure Seitenketten): Asp, Glu; Gruppe IV (basische Seitenketten): Asn, Gin, His, Lys, Arg; Gruppe V (Reste, welche die Kettenausrichtung beeinflussen): Gly, Pro; und Gruppe VI (aromatische Seitenketten): Trp, Tyr, Phe. Konservative Substitutionen involvieren Substitutionen zwischen Aminosäuren in derselben Klasse. Nicht-konservative Substitutionen setzen Austausch eines Vertreters von einer von diesen Klassen für einen Vertreter einer anderen ein.

[0034] Aminosäuren aus den variablen Regionen der reifen schweren und leichten Ketten von Immunoglobulinen werden als Hx bzw. Lx bezeichnet, wobei x eine Zahl darstellt, welche die Position einer Aminosäure gemäß dem Schema von Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 und 1991) bezeichnet. Kabat listet viele Aminosäuresequenzen für Antikörper jeder Unterklasse auf und listet die am gewöhnlichsten auftretende Aminosäure für jede Restposition in dieser Unterklasse auf. Kabat wendet ein Verfahren zur Zuordnung einer Restzahl an jede Aminosäure in einer aufgelisteten Sequenz an, und dieses Verfahren zur Zuordnung von Restzahlen ist im Gebiet Standard geworden. Das Schema von Kabat ist erweiterbar auf andere Antikörper, die nicht in seinem Kompendium eingeschlossen

sind, und zwar durch Alignierung bzw. Ausrichtung des fraglichen Antikörpers mit einer der Konsensus-Sequenzen in Kabat. Die Anwendung des Kabat-Nummerierungssystems erkennt leicht Aminosäuren an entsprechenden Positionen in verschiedenen Antikörpern. Zum Beispiel belegt eine Aminosäure an der Position L50 eines humanen Antikörpers die entsprechende Position zu einer Aminosäureposition L50 eines Mausantikörpers.

[0035] Sowohl N-terminale als auch C-terminale leichte und schwere Ketten umfassen die Domänen FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 und FR4. Die Übertragung von Aminosäuren an jede Domäne findet gemäß der Definitionen von Kabat (1987) und (1991), supra, oder Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987); Chothia et al., Nature 342: 878-883 (1989) statt.

[0036] Es ist bekannt, dass die strukturelle Antikörper-Grundeinheit ein Tetramer umfasst. Jedes Tetramer besteht aus zwei identischen Paaren von Polypeptidketten, wobei jedes Paar eine „leichte“ (etwa 25 kDa) und eine „schwere“ (etwa 50-70 kDa) Kette besitzt. Der Amino-terminale Abschnitt jeder Kette schließt eine variable Region von etwa 100 bis 110 oder mehr Aminosäuren ein, die primär für die Antigenerkennung verantwortlich ist. Der Carboxy-terminale Abschnitt jeder Kette definiert eine konstante Region, die primär für die Effektor-Funktion verantwortlich ist. Die variablen Regionen jedes leichten/schweren Kettenpaares bilden die Antikörper-Bindungsstelle. Folglich besitzt ein intakter Antikörper zwei Bindungsstellen.

[0037] Leichte Ketten werden entweder als kappa oder lambda klassifiziert. Schwere Ketten werden als gamma, mu, alpha, delta oder epsilon klassifiziert und definieren den Isotyp des Antikörpers als IgG, IgM, IgA, IgD bzw. IgE. Innerhalb von leichten und schweren Ketten sind die variablen und konstanten Regionen durch eine „J“-Region von etwa 12 oder mehr Aminosäuren verknüpft, wobei die schwere Kette auch eine „D“-Region von etwa 10 oder mehr Aminosäuren einschließt. (Siehe allgemein Fundamental Immunology (Paul, W., Hg., 2. Ausgabe Raven Press, N.Y., 1989), Kapitel 7 (hierin durch den Bezug darauf in seiner Gesamtheit für alle Zwecke einbezogen)).

[0038] Der Terminus Epitop schließt jede beliebige Proteindeterminante ein, die in der Lage ist, an einen Immunoglobulin- oder T-Zellrezeptor spezifisch zu binden. Epitop-Determinanten bestehen gewöhnlich aus chemisch aktiven Oberflächengruppierungen von Molekülen, wie Aminosäuren oder Zucker-Seitenketten, und besitzen gewöhnlich spezifische dreidimensionale strukturelle Charakteristika ebenso wie spezifische Ladungs-Charakteristika.

[0039] Der Terminus Patient schließt Menschen und Tiere ein.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG

[0040] Die vorliegende Erfindung stellt bispezifische Antikörper bereit, die sowohl gegen Effektorzellen (T-Zellen oder natürliche Killerzellen) als auch gegen ein heterodimeres 28/32-kDa-Antigen, das auf der Oberfläche von malignen B-Zellen vorhanden ist, spezifisch sind. Ebenfalls hierin beschrieben werden Hybridome und andere Zelllinien, welche die beanspruchten Antikörper produzieren.

[0041] Das 28/32-kDa-Antigen ist überwiegend auf der Oberfläche von malignen B-Lymphozyten zu finden und wird nicht auf ruhenden Lymphozyten oder B- und T-Zellen exprimiert, die in vitro durch eine Vielfalt von induktiven Stimuli aktiviert werden. Siehe Gingrich et al., Blood 75, 2375-2387 (1990). Das Antigen kann exprimiert werden, und zwar wenn Lymphozyten einer malignen Transformation unterliegen oder in einigen Fällen, wenn sie durch das Epstein-Barr-Virus (EBV) gestört werden. Normale ruhende und stimulierte Lymphozyten exprimieren das Antigen nicht. Das Antigen fehlt auch auf hämopoietischen Stammzellen. Obwohl die wissenschaftliche Grundlage für das 28/32-kDa-Antigen, das überwiegend oder ausschließlich auf malignen B-Zellen exprimiert wird, nicht kritisch für die Ausführung der Erfindung ist, wird angenommen, dass das Antigen eine abweichende post-translationale Prozessierungsvariante des HLA-Dr-Antigens darstellen kann.

[0042] Um die für maligne B-Zellen spezifischen Antikörper herzustellen, wurde eine Lymphomzelllinie, die von einem Patienten mit peripherisierendem diffusem, als HO-85 bezeichnetem Riesenzell-Lymphom stammte, in Suspensionskultur RPMI-1640 mit 10%igem fötalem Kalbsserum gezüchtet, und zwar mit einer Verdopplungszeit von etwa 24 Stunden. Die Zelllinie ist CD20, mu, delta (schwach), kappa, HLA Klasse I und II Antigen-positiv. Sie reagiert nicht mit monoklonalen Antikörpern, die CALLA-, T-Zell-, myeloide oder monozytische Zellantigene erkennen. Die Zellen reagieren mit den monoklonalen SFR7-, DR7- und B7/21-Antikörpern, was darauf hindeutet, dass sie DR7- bzw. DP-Antigene exprimieren.

[0043] Weibliche BALB/c-Mäuse im Alter von 6-8 Wochen wurden mit 4 bis 6 intraperitonealen Impfungen in zweiwöchigen Intervallen behandelt, und zwar mit 5×10^6 Zellen aus der humanen Riesenzell-Lymphomlinie, wie oben beschrieben. Die Tiere wurden fünf Tage nach der letzten Impfung getötet und die Milzzellen wurden mit der nicht-sekretorischen murinen Myelomzelllinie N-1 verschmolzen. Hybridome wurden in Hypoxanthin-aminopterin-thymidin-(HAT)-Medium selektiert, und zwar nachdem sie in Zellkulturschalen mit 96 Vertiefungen plattiert wurden. Nach 10 Tagen wurden 25-Mikroliter-Aliquote aus jeder Vertiefung zur Bestimmung der maligne-B-Zell-(anti-HO-85)-Antikörper-Bindungsaktivität entnommen.

[0044] Die maligne-B-Zell-(anti-HO-85)-Antikörper-Bindungsaktivität wurde durch einen indirekten Radioimmunoassay mit ganzen Zellen bestimmt, und zwar unter Verwendung frischer HO-85-Zellen als Ziele. Genau der gleiche Assay wurde unter Verwendung von RAJI (ATCC CCL86), MOLT-3 (ATCC CRL1582), HL-60 (ATCC CCL240) und frischen peripheren mononukleären Blutzellen als Ziele durchgeführt. Vertiefungen, die eine höhere Bindungsaktivität als das Fünffache derjenigen des Gewebe-Kulturmediums allein gegenüber HO-85 und Raji gezeigt haben aber nicht mit MOLT-3, HL-60 und peripheren mononukleären Blutzellen reaktiv waren, wurden gesammelt.

[0045] Es wurde festgestellt, dass Zellen, welche die oben genannten Kriterien erfüllen, einen Antikörper produzieren, der als 1D10 bezeichnet wird, und diese wurden anschließend durch limitierende Verdünnung geklont. Das Hybridom wächst gut in vitro und Ascites von mit Pristan vorbehandelten BALB/c-Mäusen.

[0046] Der Teil der malignen B-Zellen, an welchem 1D10 bindet, ist ein heterodimeres Polypeptid, das zwei Proteine mit einem Molekulargewicht der alpha- und beta-Ketten von 32 kDa bzw. 28 kDa enthält. Die Proteine können durch Solubilisierung maligner B-Zellen wie Raji-Zellen mit Detergens erhalten werden. Die Bestimmung des Molekulargewichts wird durch Verwendung jodierter Zellen und eindimensionaler SDS-PAGE-Analyse des MoAb6-Antigenpräzipitats durchgeführt. Die Bildung des 1D10-Antikörpers wird durch Gingrich et al., Blood 75, 2375-2387 (1990) erörtert. Andere Antikörper mit der gleichen oder ähnlicher Bindungsspezifität zu 1D10 werden durch Kompetitionsbindung mit 1D10 an das heterodimere 28/32-kDa-Antigen gescreent. Zahlreiche Typen von kompetitiven Bindungsassays sind bekannt, zum Beispiel: direkter oder indirekter Festphasenradioimmunoassay (RIA), direkter oder indirekter Festphasen-Enzymimmunoassay (EIA), Sandwich-Kompetitionsassay (siehe Stahl et al., Methods in Enzymology 9, 242-253 (1983)); direkter Festphasen-Biotin-Avidin-EIA (siehe Kirkland et al., J. Immunol. 137, 3614-3619 (1986)); direkter markierter Festphasenassay, direkter markierter Festphasen-Sandwichassay (siehe Harlow & Lane, „Antibodies, A Laboratory Manual“, Cold Spring Harbor Press (1988)); direkter Festphasen-Markierungs-RIA, der I-125-Markierung verwendet (siehe Morel et al., Molec. Immunol. 25, 7-15 (1988)); direkter Festphasen-Biotin-Avidin-EIA (Cheung et al., Virology 176, 546-552 (1990)); und direkter markierter RIA (Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol. 32, 77-82 (1990)). Typischerweise involviert ein solcher Assay die Verwendung von Zellen, die das 28/32-kDa-Antigen tragen, ein unmarkiertes Test-Immunglobulin und ein markiertes Referenz-Immunglobulin (1D10). Die kompetitive Inhibition wird durch Bestimmung der Menge der an den Zellen gebundenen Markierung gemessen, und zwar in Gegenwart des Test-Immunglobulins. Gewöhnlich ist das Test-Immunglobulin im Überschuss vorhanden. Antikörper, die durch einen Kompetitionsassay (konkurrierende Antikörper) erkannt werden, schließen Antikörper ein, die an das gleiche Epitop wie der Referenz-Antikörper binden, und Antikörper, die an ein angrenzendes Epitop binden, und zwar in ausreichender Nähe zu dem durch den Referenz-Antikörper gebundenen Epitop, so dass sterische Hinderung auftreten kann.

[0047] Die zweite Komponente für die bispezifischen Antikörper der Erfindung ist ein Antikörper mit Spezifität für ein Antigen auf der Oberfläche von T-Zellen oder NK-Zellen. Humane T-Zellantigene, die wahrscheinlich geeignet sind, schließen CD3, CD2, CD28, CD44, C69, A 13 und G1 ein. Geeignete Antigene auf natürlichen Killerzellen schließen FC-Gamma-Rezeptoren (3G8, B73.1, LEUL1, VEP13 und AT10) ein. Humane T-Zellantigene, die wahrscheinlich ungeeignet sind, schließen die MHC Klasse I, CD4, CD8, CD18 und CD71 ein.

[0048] Zelllinien, die gegen die oben beschriebenen Effektor-Zellantigene spezifisches IgG produzieren, sind kommerziell erhältlich oder können de novo produziert werden (siehe das Beispiel 3). Die OKT3-Zelle (ATCC CRL 8001) stellt eine geeignete Quelle von Antikörpern für das CD3-Antigen dar. Andere Antikörper gegen das CD3-Antigen schließen WT31, WT32, Anti-Leu-4, UCHT-1, SPV-3TA und SPV-T3B ein. Die CD3-Stelle wird aufgrund ihrer Gegenwart in allen T-Zellen bevorzugt.

[0049] Die Antikörper können durch eine Zelllinie produziert werden, die gebildet wird durch die Verschmelzung bzw. Fusion von einer Zelllinie mit der ersten Komponente, die Antikörper spezifisch für das heterodimere 28/32-kDa-Antigen produziert, mit einer zweiten Zelllinie, die einen Antikörper spezifisch entweder für T-Zellen oder natürliche Killerzellen produziert. Zum Beispiel wurde das Hybridom, das 1D10 produziert, mit OKT3 ver-

schmolzen, wie folgt.

[0050] Die OKT3-Hybridom-Zelllinie wurde durch sequentielles Züchten von OKT3-Zellen in Medien selektiert, die 0,13 mM 8-Azaguanin und anschließend 1,0 mM Ouabain enthielten. Hybrid-Hybridome wurden durch Verschmelzung (unter Verwendung von 38%igem Polyethylenglykol) von 10^6 HAT-resistenten, Ouabain-empfindlichen, 1D10-sezernierenden Hybridomen mit 10^6 HAT-empfindlichen, Ouabain-resistenten, OKT3-sezernierenden Hybridomen hergestellt.

[0051] Verschmolzene Zellen wurden in HAT-Ouabain-Medium plattiert, um sie hinsichtlich der Hybrid-Hybridome zu selektieren. Das HAT in diesem Medium verhinderte das Wachstum von unverschmolzenen OKT3-Zellen und das Ouabain verhinderte das Wachstum von unverschmolzenen 1D10-Zellen. Folglich haben nur Hybrid-Hybridome, die genetisches Material von beiden elterlichen Hybridomen enthielten, überlebt. Zwölf Hybrid-Hybridome wurden durch Anwendung dieser Technik isoliert.

[0052] Zelllinien, die bispezifische Antikörper sezernieren, können durch ein Drei-Schritt-Screening-Verfahren identifiziert werden. Zum Beispiel wurde in einer Analyse von Hybridomen, die durch Verschmelzung von 1D10 und OKT3 gebildet wurden, ein anfängliches Screen durchgeführt, in welchem Hybrid-Hybridom-Überstand auf ELISA-Platten gegeben wurde, die mit Ziegen-Anti-Maus-IgG1-Antikörper beschichtet waren. Nach dem Waschen wurde Ziegen-Anti-Maus-IgG2a, das mit alkalischer Phosphatase markiert war, zugegeben. Die Reaktivität zeigte an, dass der Hybrid-Hybridom-Überstand einzelne Antikörpermoleküle mit schweren Ketten sowohl von IgG1 als auch von IgG2a enthielt.

[0053] Ein indirekter Immunfluoreszenz-Assay wurde als ein zweiter Screen verwendet, und zwar für alle Proben, die positiv im ELISA waren. In diesem zweiten Screen wurde Hybrid-Hybridom-Überstand separat zu HO-85- (1D10-reaktiven) und Jurkat-(OKT3-reaktiven) Zellen gegeben. Ziegen-Anti-Maus-IgG-FITC wurde nach dem Waschen zugegeben, um das Vorhandensein von gebundenen Antikörper festzustellen. Alle zwölf Hybrid-Hybridome haben Antikörper sezerniert, der in der Lage war, sowohl an HO-85- als auch an Jurkat-Zellen zu binden. Eines von diesen Hybrid-Hybridomen wurde zur weiteren Untersuchung ausgewählt. Es wurde durch limitierende 2er-Verdünnung subkloniert und als 1DT3-D bezeichnet. Diese Zelllinie wurde am 24. März 1992 gemäß dem „Budapester Vertrag“ bei der „American Type Culture“-Sammlung, 12301 Parklaven Drive, Rockville, MD 20852 abgelegt, und zwar unter Zuordnung zu der Nummer ATCC HB 10993.

[0054] 1DT3-D wurde in vitro in HB-101-Medium, ergänzt mit 100 µg L-Glutamin und 100 U/ml Penicillin-Streptomycin kultiviert. Diese Zellen wurden zu einer Mini-Flo-path-Bioreaktor-Hohlfaservorrichtung überführt. Vom verwendeten Medium erhaltener Antikörper wurde durch HPLC-Kationenaustausch unter Verwendung eines Gradienten von 0,18 bis 0,5 M NaCl fraktioniert. Der Peak, der bispezifische Reaktivität enthielt, wie durch die obengenannten Assays demonstriert, wurde isoliert, gegen Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung dialysiert, konzentriert und in weiteren Untersuchungen verwendet.

[0055] Der durch Verschmelzung von 1D10 und OKT3 gebildete bispezifische Antikörper ist ein aus der Maus stammender monoklonaler. Humanisierte Versionen dieses Antikörpers und andere bispezifische Antikörper der Erfindung können ebenfalls eingesetzt werden, wie unten ausführlicher diskutiert.

Humanisierte Antikörper

[0056] Die Erfindung stellt humanisierte Immunoglobuline (oder Antikörper) bereit, wie oben und in den Ansprüchen beschrieben. Einige humanisierte Antikörper sind für das T-Zellantigen CD3 spezifisch. Andere humanisierte Antikörper sind für das 28/32-kDa-Heterodimer auf malignen B-Zellen spezifisch. Diese humanisierten Antikörper sind selber als therapeutische und diagnostische Reagenzien nützlich, oder können kombiniert werden, um einen humanisierten bispezifischen Antikörper zu bilden, der beide Bindungsspezifitäten seiner Komponenten besitzt. Die humanisierten Formen von Immunoglobulinen besitzen variable Gerüstregion(en), und zwar im Wesentlichen von einem humanen Immunoglobulin (bezeichnet als Akzeptor-Immunoglobulin), und komplementaritätsbestimmende Regionen, und zwar im Wesentlichen von einem Maus-Immunoglobulin (angegeben als das Spenderimmunoglobulin). Die konstante(n) Region(en), soweit vorhanden, sind ebenfalls im Wesentlichen von einem humanen Immunoglobulin. Die humanisierten Antikörper zeigen eine spezifische Bindungsaffinität für ihre entsprechenden Antigene von mindestens 10^7 , 10^8 , 10^9 oder $10^{10}M^{-1}$. Oft liegen die oberen und unteren Grenzen der Bindungsaffinität der humanisierten Antikörper innerhalb eines Faktors von drei oder fünf oder zehn von derjenigen des Maus-Antikörpers, von dem sie stammen.

(1) Maus-Antikörper zur Humanisierung

[0057] Das Ausgangsmaterial zur Herstellung eines humanisierten Antikörpers, der spezifisch für das 28/32-kDa-Heterodimer ist, ist der 1D10-Maus-Antikörper. Das Ausgangsmaterial zur Herstellung eines humanisierten Antikörpers, der spezifisch für CD3 ist, ist der M291-Antikörper, dessen Isolierung in dem Beispiel 3 beschrieben wird.

(2) Selektion von humanen Antikörpern, um Gerüstreste bereitzustellen

[0058] Die Substitution von Maus-CDRs in eine humane variable Gerüstdomäne führt sehr wahrscheinlich zur Bewahrung ihrer korrekten räumlichen Ausrichtung, sofern die humane variable Gerüstdomäne die gleiche oder eine zu dem variablen Mausgerüst ähnliche Konformation annimmt, von welchem die CDRs stammen. Dies wird erreicht durch das Erhalten der humanen variablen Domänen von humanen Antikörpern, deren Gerüstsequenzen einen hohen Grad an Sequenzidentität mit den murinen variablen Gerüstdomänen zeigen, von welchen die CDRs stammen. Die variablen Gerüstregionen der schweren und leichten Ketten können von den gleichen oder verschiedenen humanen Antikörpersequenzen stammen. Die humanen Antikörpersequenzen können die Sequenzen von natürlich vorkommenden humanen Antikörpern sein oder können Konsensus-Sequenzen von mehreren humanen Antikörpern sein.

[0059] Geeignete humane Antikörpersequenzen werden durch Computervergleiche der Aminosäuresequenzen der variablen Maus-Regionen mit den Sequenzen von bekannten humanen Antikörpern identifiziert. Der Vergleich wird separat für schwere und leichte Ketten durchgeführt, aber die Prinzipien sind jeweils ähnlich.

(3) Computermodellierung

[0060] Die unnatürliche Nebeneinanderstellung von murinen CDR-Regionen mit einer humanen variablen Gerüstregion kann zu unnatürlichen Konformationseinschränkungen führen, die, sofern nicht durch Substitution von bestimmten Aminosäureresten korrigiert, zu Verlust von Bindungsaffinität führen. Die Selektion von Aminosäureresten zur Substitution wird teilweise durch Computermodellierung bestimmt. Computerhardware und —software zur Erstellung dreidimensionaler Bilder von Immunoglobulinmolekülen sind in weiter Verbreitung erhältlich. Im Allgemeinen werden molekulare Modelle ausgehend von gelösten Strukturen für Immunoglobulinketten oder Domänen davon erstellt. Die zu modellierenden Ketten werden auf Aminosäuresequenzähnlichkeit hin verglichen, und zwar mit Ketten oder Domänen von gelösten dreidimensionalen Strukturen, und die Ketten oder Domänen, welche die größte Sequenzähnlichkeit zeigen, werden als Ausgangspunkte zur Konstruktion des molekularen Modells gewählt. Die gelösten Ausgangsstrukturen werden modifiziert, um das Modellieren von Unterschieden zwischen den eigentlichen Aminosäuren in den Immunoglobulinketten oder —domänen und derjenigen in der Ausgangsstruktur zu ermöglichen. Die modifizierten Strukturen werden anschließend in ein zusammengesetztes Immunoglobulin eingebracht. Schließlich wird das Modell durch Energieminimierung und indem verifiziert wird, dass alle Atome sich innerhalb geeigneter Entfernungen voneinander befinden, und dass die Bindungslängen und —winkel sich innerhalb chemisch akzeptabler Grenzen befinden, verfeinert.

Substitution von Aminosäureresten

[0061] Wie oben angemerkt, umfassen die humanisierten Antikörper der Erfindung variable Gerüstregion(en), und zwar im Wesentlichen von einem humanen Immunoglobulin, und komplementaritätsbestimmende Regionen, und zwar im Wesentlichen von einem Maus-Immunoglobulin (z. B. 1D10 oder M291). Wurden die komplementaritätsbestimmenden Regionen von Maus-Antikörpern und geeignete Akzeptor-Immunoglobuline identifiziert, so besteht der nächste Schritt darin, zu bestimmen, welche, wenn überhaupt welche, Reste von diesen Komponenten substituiert werden sollten, um die Eigenschaften des resultierenden humanisierten Antikörpers zu optimieren. Im Allgemeinen sollte die Substitution von humanen Aminosäureresten mit murinen minimiert werden, da die Einführung von murinen Resten das Risiko erhöht, dass der Antikörper eine HA-MA-Antwort bei Menschen auslöst. Aminosäuren werden zur Substitution selektiert, und zwar basierend auf ihrem möglichen Einfluss auf die CDR-Anordnung und/oder Binden an das Antigen. Das Untersuchen von solchen möglichen Einflüssen findet durch Modellierung, Untersuchung der Charakteristika der Aminosäuren an bestimmten Stellen oder empirische Beobachtung der Effekte von Substitution oder Mutagenese von bestimmten Aminosäuren statt.

[0062] Wenn eine Aminosäure sich zwischen einer variablen Maus-Gerüstregion und einer entsprechenden variablen humanen Gerüstregion unterscheidet, so sollte die humane Gerüstaminosäure gewöhnlich durch die

entsprechende Maus-Aminosäure substituiert werden, sofern vernünftigerweise erwartet wird, dass die Aminosäure:

- (1) nicht-kovalenten Kontakt mit dem Antigen direkt hat, oder
- (2) an eine CDR-Region angrenzt oder anderweitig mit einer CDR-Region interagiert (z. B. sich innerhalb etwa 4-6 Å von einer CDR-Region befindet).

[0063] Andere Kandidaten zur Substitution sind humane Akzeptor-Gerüstaminosäuren, die ungewöhnlich für ein humanes Immunglobulin an dieser Position sind. Diese Aminosäuren können mit Aminosäuren aus der entsprechenden Position von typischeren humanen Immunglobulinen substituiert werden. Alternativ dazu können Aminosäuren aus entsprechenden Positionen in dem Maus-Antikörper in den humanen Gerüstregionen eingeführt werden, sofern solche Aminosäuren für ein humanes Immunglobulin an den entsprechenden Positionen typisch sind.

[0064] Im Allgemeinen ist die Substitution von allen oder den meisten der Aminosäuren, welche die obengenannten Kriterien erfüllen, erwünscht. Gelegentlich besteht jedoch ein gewisser Zweifel daran, ob eine bestimmte Aminosäure die obengenannten Kriterien erfüllt, und alternative unterschiedliche Immunglobuline werden hergestellt, wobei eines davon diese bestimmte Substitution besitzt, das andere davon nicht.

[0065] Die humanisierten Antikörper der Erfindung, die von dem Maus-1D10-Antikörper stammen, enthalten gewöhnlich eine Substitution von einem Gerüstrest einer humanen kappa leichten Kette mit einem entsprechenden mu-MAb-1D10-Rest an mindestens 1, 2, 3, oder 4 der folgenden Positionen: L48, L49, L69 und L70. Die humanisierten Antikörper enthalten gewöhnlich auch eine Substitution von einem Gerüstrest einer humanen schweren Kette an mindestens 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, oder 8 der folgenden Positionen: H27, H29, H30, H37, H67, H71, H78 und H83. In bevorzugten Ausführungsformen, wenn das Akzeptor-Immunglobulin der humanen leichten Kette R3.5HG ist, enthält die leichte Kette auch eine Substitution an Position 43. Diese Position wird mit der Aminosäure aus der entsprechenden Position eines humanen Immunglobulins mit typischeren Aminosäureresten oder aus einer Konsensus-Sequenz eines solchen humanen Immunglobulins substituiert. In ähnlicher Weise, wenn das Akzeptor-Immunglobulin der humanen schweren Kette IC4 ist, enthält die schwere Kette auch eine Substitution an Position 73.

[0066] Die humanisierten Antikörper der Erfindung, die von dem Maus-M291-Antikörper stammen, enthalten keine Substitution von einem Gerüstrest einer humanen kappa leichten Kette, sofern der Akzeptor der leichten Kette HF2-1/17 ist. Die humanisierten Antikörper enthalten gewöhnlich auch eine Substitution von einem Gerüst einer humanen schweren Kette an mindestens 1, 2, 3, 4, 5 und 6 der folgenden Positionen: H30, H67, H68, H70, H72 und H74. In bevorzugten Ausführungsformen, wenn das Akzeptor-Immunglobulin der schweren Kette 21/28 ist, enthält die leichte Kette auch eine Substitution an Position 44. Diese Position wird mit der Aminosäure aus der entsprechenden Position eines humanen Immunglobulins mit typischeren Aminosäureresten oder aus einer Konsensus-Sequenz eines solchen humanen Immunglobulins substituiert.

[0067] In der Regel sind die CDR-Regionen in humanisierten Antikörpern im Wesentlichen identisch und noch gewöhnlicher identisch mit den entsprechenden CDR-Regionen in dem Maus-Antikörper, von dem sie stammen. Obwohl gewöhnlich nicht erwünscht, ist es gelegentlich möglich, eine oder mehrere konservative Aminosäuresubstitutionen von CDR-Resten vorzunehmen, ohne die Bindungsaffinität des resultierenden humanisierten Immunglobulins nennenswert zu beeinträchtigen. Gelegentlich können Substitutionen von CDR-Regionen die Bindungsaffinität verstärken.

[0068] Anders als für die oben diskutierten spezifischen Aminosäuresubstitutionen, sind die Gerüstregionen von humanisierten Immunglobulinen gewöhnlich im Wesentlichen identisch und noch gewöhnlicher identisch mit den Gerüstregionen der humanen Antikörper, von denen sie stammen. Natürlich leisten viele von den Aminosäuren in der Gerüstregion einen kleinen oder keinen Beitrag zu der Spezifität oder Affinität eines Antikörpers. Folglich können viele individuelle konservative Substitutionen von Gerüstresten toleriert werden, ohne nennenswerte Änderung der Spezifität oder Affinität des resultierenden humanisierten Immunglobulins. Im Allgemeinen sind jedoch solche Substitutionen unerwünscht.

Herstellung von variablen Regionen

[0069] Wurden die CDR- und Gerüstkomponenten von humanisierten Immunglobulinen dem Konzept nach ausgewählt, ist eine Vielfalt von Verfahren zur Herstellung solcher Immunglobuline verfügbar. Aufgrund der Degeneration des Codes wird eine Vielfalt von Nukleinsäuresequenzen jede Immunglobulin-Aminosäuresequenz codieren. Die gewünschten Nukleinsäuresequenzen können durch de-novo-Festphasen-DNA-Synthese

se oder durch PCR-Mutagenese einer früher präparierten Variante des gewünschten Polynukleotids hergestellt werden. Alle Nukleinsäuren, welche die in dieser Anmeldung beschriebenen Antikörper codieren, können verwendet werden, um Antikörper der Erfindung herzustellen.

(6) Selektion einer konstanten Region

[0070] Die variablen Segmente von humanisierten Antikörpern, die wie oben beschrieben hergestellt wurden, sind typischerweise mit mindestens einem Abschnitt von einer konstanten Immunoglobulinregion (Fc) verknüpft, und zwar typischerweise dem von einem humanen Immunglobulin. Humane DNA-Sequenzen einer konstanten Region können gemäß allgemein bekannter Verfahren aus einer Vielfalt von humanen Zellen, aber vorzugsweise immortalisierten B-Zellen isoliert werden (siehe Kabat et al., supra, und WO87/02671). Gewöhnlich wird der Antikörper konstante Regionen sowohl leichter Ketten als auch schwerer Ketten enthalten. Die konstante Region einer schweren Kette schließt gewöhnlich CH1-, Gelenk-, CH2-, CH3- und gelegentlich CH4-Regionen ein.

[0071] Die humanisierten Antikörper schließen Antikörper mit allen Typen von konstanten Regionen, einschließlich IgM, IgG, IgD, IgA und IgE, und jeden beliebigen Isotyp ein, einschließlich IgG₁, IgG₂, IgG₃ und IgG₄. Wenn es gewünscht wird, dass der humanisierte Antikörper zytotoxische Aktivität zeigt, ist die konstante Domäne gewöhnlich eine Komplement-fixierende konstante Domäne und die Klasse ist typischerweise IgG₁. Wenn eine solche zytotoxische Aktivität nicht gewünscht ist, kann die konstante Domäne aus der IgG₂-Klasse sein. Der humanisierte Antikörper kann Sequenzen aus mehr als einer Klasse oder einem Isotyp umfassen.

Expressionssysteme

[0072] Nukleinsäuren, die variable Regionen humanisierter leichter und schwerer Ketten codieren, die optional mit konstanten Regionen verknüpft sind, werden in Expressionsvektoren eingesetzt. Die leichten und schweren Ketten können in den selben oder verschiedenen Expressionsvektoren kloniert werden. Die DNA-Segmente, die Immunoglobulinketten codieren, werden operabel mit Regulierungssequenzen in dem/den Expressionsvektor(en) verknüpft, welche die Expression von Immunoglobulinpolypeptiden sicherstellen. Solche Regulierungssequenzen schließen eine Signalsequenz, einen Promotor, einen Enhancer und eine Transkriptions-Terminierungssequenz ein (siehe Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029 (1989); WO 90/07861; Co et al., J. Immunol. 148, 1149 (1992)).

(8) Fragmente von humanisierten Antikörpern

[0073] Die humanisierten Antikörper der Erfindung schließen Fragmente ebenso gut wie intakte Antikörper ein. Typischerweise konkurrieren diese Fragmente mit dem intakten Antikörper, von dem sie stammen, um das Antigenbinden. Die Fragmente binden typischerweise mit einer Affinität von mindestens 10^7 M^{-1} und noch typischer 10^8 oder 10^9 M^{-1} (d. h. innerhalb derselben Bereiche wie der intakte Antikörper). Humanisierte Antikörperfragmente schließen separate schwere Ketten, Leichtketten-Fab, Fab', F(ab')₂ und Fv ein. Fragmente werden durch rekombinante DNA-Techniken oder durch enzymatische oder chemische Trennung von intakten Immunoglobulinen hergestellt.

Rekombinante bispezifische Antikörper

[0074] Die oben diskutierten Verfahren zur Bildung bispezifischer Antikörper aus Antikörpern, die durch Hybridomzellen hergestellt wurden, können auch zur Herstellung von bispezifischen Antikörpern aus rekombinant exprimierten Antikörpern angewendet oder adaptiert werden, wie den humanisierten Versionen von 1D10 und M291. Zum Beispiel können bispezifische Antikörper durch Verschmelzung von zwei Zelllinien hergestellt werden, die jeweils die Teilantikörper exprimieren. Alternativ dazu können die Teilantikörper in derselben Zelllinie co-exprimiert werden. Bispezifische Antikörper können auch durch chemische Vernetzung von rekombinanten Teilantikörpern gebildet werden.

[0075] Rekombinante Teilantikörper können auch genetisch verknüpft werden. In einer Herangehensweise wird ein bispezifischer Antikörper als ein einziges Verschmelzungsprotein exprimiert, das die vier verschiedenen variablen Domänen aus den zwei Teilantikörpern umfasst, und zwar getrennt durch Spacer. Zum Beispiel kann ein solches Protein von einem Terminus zum anderen die VL-Region des ersten Teilantikörpers, einen Spacer, die VH-Domäne des ersten Teilantikörpers, einen zweiten Spacer, die VH-Domäne des zweiten Teilantikörpers, einen dritten Spacer und die VL-Domäne des zweiten Teilantikörpers umfassen. Siehe z. B. Segal et al., Biologic Therapy of Cancer Updates 2, 1-12 (1992).

[0076] In einer weiteren Herangehensweise werden bispezifische Antikörper gebildet, indem Teilantikörper mit Leucin-Reißverschlusspeptiden verknüpft werden. Siehe allgemein die Parallelanmeldung 11823-003200 (07/801 798, eingereicht am 29. November 1991; Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992)). Leucin-Reißverschlüsse weisen die allgemeine strukturelle Formel $(\text{Leucin-X}_1\text{-X}_2\text{-X}_3\text{-X}_4\text{-X}_5\text{-X}_6)_n$ auf, wobei die X beliebige von den herkömmlichen 20 Aminosäuren sein können (Proteins, Structures and Molecular Principles, (1984) Creighton (Hg.), W.H. Freeman and Company, New York), aber höchstwahrscheinlich Aminosäuren mit hohem α -Helix-bildendem Potential sind, zum Beispiel Alanin, Valin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Lysin (Richardson und Richardson, Science 240, 1648 (1988)), und n kann 3 oder größer sein, obwohl n typischerweise 4 oder 5 ist. Der Leucin-Reißverschluss tritt in einer Vielfalt von eukaryotischen DNA-bindenden Proteinen auf, wie GCN4, C/EBP, c-fos-Genprodukt (Fos), c-jun-Genprodukt (Jun) und c-myc-Genprodukt. In diesen Proteinen erzeugt der Leucin-Reißverschluss einen Dimerisierungsanschluss, wobei Proteine, die Leucin-Reißverschlüsse enthalten, stabile Homodimere und/oder Heterodimere bilden können.

[0077] Die Leucin-Reißverschlüsse zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung besitzen vorzugsweise paarige Affinität. Paarige Affinität wird als die Kapazität für eine Art von Leucin-Reißverschluss definiert, zum Beispiel den Fos-Leucin-Reißverschluss, überwiegend Heterodimere mit einer anderen Art von Leucin-Reißverschluss zu bilden, zum Beispiel dem Jun-Leucin-Reißverschluss, so dass Heterodimerbildung gegenüber Homodimerbildung bevorzugt ist, wenn zwei Arten von Leucin-Reißverschlüssen in ausreichenden Konzentrationen vorhanden sind. Siehe Schuemann et al., Nucleic Acids Res. 19, 739 (1991). Folglich führt die überwiegende Bildung von Heterodimeren zu einer Dimerpopulation, die typischerweise 50 bis 75 Prozent, vorzugsweise 75 bis 85 Prozent und am meisten bevorzugt mehr als 85 Prozent Heterodimere aufweist. Wenn Aminotermini der synthetischen Peptide jeweils einen Cysteinrest einschließen, um intermolekulares Disulfidbinden zu erlauben, findet Heterodimerbildung im Wesentlichen unter Ausschluss von Homodimerisierung statt.

[0078] Bei der Bildung von bispezifischen Antikörpern werden Bindungsfragmente der Teilantikörper im Leserahmen an ersten und zweiten Leucin-Reißverschlüssen verschmolzen. Geeignete Bindungsfragmente schließen Fv, Fab, Fab' oder die schwere Kette ein. Die Reißverschlüsse können mit der schweren oder leichten Kette des Antikörper-Bindungsfragments verknüpft werden und werden gewöhnlich mit dem C-terminale Ende verknüpft. Sofern eine konstante Region oder ein Abschnitt von einer konstanten Region vorhanden ist, wird der Leucin-Reißverschluss vorzugsweise mit der konstanten Region oder dem Abschnitt davon verknüpft. Zum Beispiel wird bei einer Fab'-Leucin-Reißverschluss-Verschmelzung der Reißverschluss gewöhnlich mit dem C-terminale Ende des Gelenks verknüpft. Das Einschließen von an den entsprechenden Teilantikörperfragmenten verschmolzenen Leucin-Reißverschlüssen fördert die Bildung von heterodimeren Fragmenten, und zwar durch Annealing bzw. Anlegen der Reißverschlüsse. Wenn die Teilantikörper Abschnitte von konstanten Regionen (z. B. Fab'-Fragmente) einschließen, dient das Anlegen von Reißverschlüssen auch dazu, die konstanten Regionen einander nahe zu bringen, wodurch das Binden von konstanten Regionen gefördert wird (z. B. in einem $F(ab')_2$ -Fragment). Typische humane konstante Regionen binden durch die Bildung von zwei Disulfidbindungen zwischen Gelenkregionen der entsprechenden Ketten. Dieses Binden kann durch das Einbauen zusätzlicher Cysteinrest(e) in die entsprechenden Gelenkregionen verstärkt werden, wodurch die Bildung von zusätzlichen Disulfidbindungen ermöglicht wird.

[0079] Mit Antikörper-Bindungsfragmenten verknüpfte Leucin-Reißverschlüsse können auf verschiedene Weisen hergestellt werden. Zum Beispiel können Polynukleotidsequenzen, die ein Verschmelzungsprotein codieren, das einen Leucin-Reißverschluss umfasst, durch einen zellulären Wirt oder ein in-vitro-Translationssystem exprimiert werden. Alternativ dazu können Leucin-Reißverschlüsse und/oder Antikörper-Bindungsfragmente getrennt hergestellt werden, entweder durch chemische Peptidsynthese, und zwar durch Expression von Polynukleotidsequenzen, welche die gewünschten Polypeptide codieren, oder durch Spaltung von anderen Proteinen, die Leucin-Reißverschlüsse, Antikörper oder makromolekulare Spezies enthalten, und anschließender Reinigung. Solche gereinigten Polypeptide können durch Peptidbindungen verknüpft werden, und zwar mit oder ohne dazwischenliegenden Spacer-Aminosäuresequenzen, oder durch kovalente Nicht-Peptid-Bindungen, und zwar mit oder ohne dazwischenliegenden Spacer-Molekülen, wobei die Spacer-Moleküle entweder Aminosäuren oder andere chemische nicht-Aminosäurestrukturen darstellen. Unabhängig von dem Verfahren oder dem Typ der Verknüpfung kann eine solche Verknüpfung reversibel sein. Zum Beispiel kann eine chemisch labile Bindung, entweder Peptidyl oder andere, spontan oder nach Behandlung mit Hitze, elektromagnetischer Strahlung, Proteasen oder chemischen Mitteln gespalten werden. Zwei Beispiele für solche reversible Verknüpfungen sind: (1) eine Verknüpfung, die eine Asn-Gly-Peptidbindung umfasst, die durch Hydroxylamin gespalten werden kann, und (2) eine Disulfidbindungsverknüpfung, die durch Reduktionsmittel gespalten werden kann.

[0080] Teilantikörperfragment-Leucin-Reißverschluss-Verschmelzungsproteine können angelegt werden, indem beide Verschmelzungsproteine in derselben Zelllinie coexprimiert werden. Alternativ dazu können die Verschmelzungsproteine in separaten Zelllinien exprimiert und in vitro vermischt werden. Sofern die Teilantikörperfragmente Abschnitte von einer konstanten Region (z. B. Fab'-Fragmente) einschließen, können die Leucin-Reißverschlüsse gespalten werden, und zwar nachdem das Anlegen stattgefunden hat. Die Teilantikörper bleiben mittels der konstanten Regionen in dem bispezifischen Antikörper verknüpft.

Therapeutische Verfahren

[0081] Pharmazeutische Zusammensetzungen, die bispezifische Antikörper der vorliegenden Erfindung umfassen, sind zur parenteralen Verabreichung verwendbar, d.h. subkutan, intramuskulär und besonders intravenös. Die Zusammensetzungen zur parenteralen Verabreichung umfassen gewöhnlich eine Lösung von dem Antikörper oder einem Cocktail davon, und zwar gelöst in einem zulässigen Träger, vorzugsweise einem wässrigen Träger. Eine Vielfalt von wässrigen Trägern kann verwendet werden, z. B. Wasser, gepuffertes Wasser, 0,4%ige Kochsalzlösung, 0,3%iges Glycin und dergleichen. Diese Lösungen sind steril und im Allgemeinen frei von partikulärer Substanz. Die Zusammensetzungen können pharmazeutisch zulässige Hilfssubstanzen enthalten, wie sie erforderlich sind, um physiologische Zustände anzunähern, wie pH-Regulierungs- und Puffermittel, Toxizitätsregulierungsmittel und dergleichen, zum Beispiel Natriumacetat, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Calciumchlorid, Natriumlactat. Die Konzentration der bispezifischen Antikörper in diesen Formulierungen kann sehr variieren, d. h. von weniger als etwa 0,01 Gew.-%, gewöhnlich mindestens etwa 0,1 Gew.-%, bis soviel wie 5 Gew.-%, und wird primär auf der Basis von Fluidvolumina und —viskositäten gewählt, und zwar gemäß dem bestimmten ausgewählten Verabreichungsweg.

[0082] Eine typische Zusammensetzung zur intravenösen Infusion kann so zusammengestellt sein, dass sie 250 ml sterile Ringer-Lösung und 10 mg von dem bispezifischen Antikörper enthält. Siehe Remington's Pharmaceutical Science (15. Ausgabe, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980).

[0083] Die Zusammensetzungen, welche die vorliegenden bispezifischen Antikörper oder einen Cocktail davon enthalten, können für prophylaktische und/oder therapeutische Behandlungen verabreicht werden. Bei einer therapeutischen Anwendung werden die Zusammensetzungen an einen von malignen B-Zellen bereits befallenen Patienten verabreicht (z. B. bei akuter lymphoblastischer Leukämie, B-Zell-Lymphom, chronischer lymphozytischer Leukämie und multiplem Myelom), und zwar in einer Menge, die ausreichend ist, um den Zustand und seine Komplikationen zu heilen oder mindestens teilweise aufzuhalten. Eine Menge, die adäquat ist, um dies zu erreichen, wird als eine „therapeutisch effektive Dosis“ definiert. Effektive Mengen für diese Verwendung werden von der Schwere des Zustands und dem allgemeinen Zustand des eigenen Immunsystems des Patienten abhängen, befinden sich jedoch im Allgemeinen im Bereich von etwa 0,01 bis etwa 100 mg bispezifischen Antikörper pro Dosis, und zwar mit am gewöhnlichsten verwendeten Dosierungen von 0,1 bis 50 mg und 1 bis 10 mg pro Patienten. Einzelne oder mehrfache Verabreichungen auf einem täglichen, wöchentlichen oder monatlichen Plan können mit Dosierungshöhen und —mustern ausgeführt werden, die durch den behandelnden Arzt gewählt werden.

[0084] Bei prophylaktischen Anwendungen werden Zusammensetzungen, welche die bispezifischen Antikörper oder einen Cocktail davon enthalten, an einen Patienten verabreicht, der dadurch gefährdet ist, den Krankheitszustand zu entwickeln, um die Resistenz des Patienten zu verstärken. Eine solche Menge wird als eine „prophylaktisch effektive Dosis“ definiert. Bei dieser Anwendung hängen die genauen Mengen wieder von dem Gesundheitszustand des Patienten und allgemeinen Immunitätsstand ab, befinden sich jedoch im Allgemeinen im Bereich von 0,1 bis 100 mg pro Dosis, besonders 1 bis 10 mg pro Patienten.

[0085] Bei einigen Behandlungsverfahren werden bispezifische Antikörper mit einem zweiten Mittel verabreicht (z. B. einem Interleukin), und zwar in einer Menge, die ausreichend für aktive Effektorzellen ist, wodurch ihre Zytotoxizität gegen maligne B-Zellen verglichen mit der Verabreichung von bispezifischem Antikörper allein gesteigert wird. Interleukin-2 in einer Dosierung von etwa 500.000 U/kg ist geeignet. Eine Kombinationstherapie ist besonders geeignet, wenn der verabreichte bispezifische Antikörper ein F(ab')₂-Fragment ist.

[0086] Der monospezifische 1D10-Antikörper (besonders die humanisierte Form) ist auch geeignet zur therapeutischen Verabreichung an Patienten, die an B-Zell-Malignomen leiden oder dadurch gefährdet sind. Optional wird der Antikörper an eine Radiomarkierung oder ein Toxin konjugiert. Der monospezifische M291-Antikörper (besonders die humanisierte Form) kann als ein Immunosuppressivum bei der Behandlung von Krankheiten und Störungen des Immunsystems verwendet werden, wie Host-versus-Graft-Erkrankung, Graft-versus-Host-Erkrankung, Autoimmunkrankheiten und Entzündung. Siehe Z. B. Cosimi et al., N. Engl. J. Med. 305,

308 (1981); Russel et al., Annu. Rev. Med. 35, 63 (1984). Die Dosierungen und pharmazeutischen Exzipientien zur Verabreichung von monospezifischen Antikörpern sind ähnlich zu denen für die bispezifischen Antikörper.

Diagnostische Verfahren

[0087] Die M291- und 1D10-Antikörper (sowohl Mausformen als auch humanisierte Formen) sind auch in diagnostischen Verfahren verwendbar. Der 1D10-Antikörper (und andere Antikörper, die an dasselbe oder ähnliche Epitop binden) ist zum Diagnostizieren des Vorhandenseins von malignen B-Zellen und Überwachen der Effizienz von Behandlungen dagegen verwendbar. Der Antikörper ist auch zu Forschungszwecken verwendbar, um Zellen bestimmter Linien-Abstammungen und Entwicklungsursprüngen zu identifizieren und zu typisieren. Der M291-Antikörper ist zu diagnostischen Zwecken in der immunologischen Überwachung von Patienten (siehe z. B. Cosimi et al., supra) und zu Forschungszwecken zum Klassifizieren von Leukozyten-Untertypen, z. B. als Teil einer Antikörpergruppe, verwendbar. Diagnoseverfahren können in vitro unter Verwendung einer zellulären Probe (z. B. Blutprobe, Lymphknotenbiopsie oder Gewebe) von einem Patienten durchgeführt werden oder durch in-vivo-Imaging durchgeführt werden.

Beispiel 1

[0088] Die Fähigkeit von 1DT3-D, die Eliminierung von malignen B-Zellen durch T-Zellen zu induzieren, wurde in vitro evaluiert. Der angewendete Assay war ein ⁵¹Chromfreisetzungs-Zytotoxizitätsassay. Maligne Ziel-B-Zellen (10⁷ Zellen in 1 ml) wurden während einer Inkubation von 1 Stunde mit 100 µCi ⁵¹Cr markiert. T-Zellen von normalen Spender wurden in vitro mit IL-2 oder IL-2 und Anti-CD3-Antikörper 3-7 Tage lang inkubiert, und zwar vor der Verwendung als Effektor-Zellen. T-Zellen wurden zu ⁵¹Cr-markierten malignen B-Zellen zusammen mit Antikörper gegeben. Diese Mischung wurde 4 Stunden lang inkubiert, und zellfreier Überstand wurde entfernt und durch Gamma-Zählung auf das Vorhandensein von freigesetztem ⁵¹Cr hin ausgewertet. Die maximale Freisetzung wurde durch Auswertung des Überstands bestimmt, der aus Vertiefungen erhalten wurde, die mit Detergens (NP-40) behandelt worden waren, das die Lyse aller Zellen induziert. Die Hintergrundfreisetzung wurde durch Auswertung der ⁵¹Cr-Spiegel von Proben bestimmt, die maligne Ziel-B-Zellen und —T-Zellen aber keinen Antikörper aufwiesen. Die spezifische Freisetzung von ⁵¹Cr zeigte die Lyse der ⁵¹Cr enthaltenden Zielzellen an und wurde unter Anwendung der folgenden Formel berechnet.

$$\frac{\text{Probenfreisetzung} - \text{Hintergrundfreisetzung}}{\text{Maximale Freisetzung} - \text{Hintergrundfreisetzung}} \times 100$$

[0089] Die [Fig. 1](#) zeigt, dass 1DT3-D die Lyse einer großen Anzahl von verschiedenen malignen B-Zellen induzierte, einschließlich Raji (eine Zelllinie, die aus einem Patienten mit Burkitt-Lymphom etabliert wurde), HO-85 (eine Riesenzell-Lymphom-Zelllinie), 697 (eine Pre-B-Zelllinie akuter lymphoblastischer Leukämie) und KH (frische Lymphozyten, die aus einem Patienten mit chronischer lymphozytischer Leukämie erhalten wurden). Das T-Zellen:Zielzellen-Verhältnis war 10:1, und die Antikörperkonzentration betrug 5 µg/ml. Ziel-Lyse wurde bei der Verwendung von monospezifischem Antikörper nicht beobachtet.

[0090] Die [Fig. 2](#) zeigt, dass 1DT3-D eine signifikante Lyse von Raji-Zellen induzieren kann, und zwar bei niedrigen T-Zellen:Raji-Zellen-Verhältnissen (weniger als 1:1) und bei niedrigen Antikörperkonzentrationen (weniger als 0,1 µg/ml). Ähnliche Ergebnisse wurden mit anderen Ziel-Zelllinien beobachtet.

[0091] Die [Fig. 3](#) zeigt, dass 1DT3-D-induzierte T-Zellen-vermittelte Lyse von frischen KH-Zellen nach langen Inkubationszeiten verzeichnet wurde.

[0092] Der bispezifische Antikörper der vorliegenden Erfindung kann auch einfach hergestellt werden, indem man die Fab- oder F(ab')₂-Fragmente des 1D10-Antikörpers nimmt, diese mit Abschnitten des OKT3-Antikörpers verschmilzt, um einen bispezifischen Antikörper der vorliegenden Erfindung zu bilden. Alternativ dazu können bispezifische Antikörper, die 1D10 und ein Antigen auf natürlichen Killer-Zellen oder T-Zellen erkennen, durch Synthese oder Gentechnik-Techniken hergestellt werden.

[0093] Ein Vorteil der beanspruchten bispezifischen Antikörper ist ihre Fähigkeit, maligne B-Zellen zu erkennen und diese von nicht-malignen B-Zellen zu unterscheiden. Folglich ist eine Therapie, welche die bispezifischen Antikörper der vorliegenden Erfindung verwendet, signifikant weniger schädlich als eine Therapie, die zum Beispiel einen nicht-spezifischen Antikörper wie den Anti-CD19-Antikörper B4 verwendet.

[0094] Ferner, wie durch die in dem Beispiel beschriebenen Daten dargestellt, induziert der Antikörper der

vorliegenden Erfindung eine signifikante Lyse von malignen B-Zellen, und zwar bei relativ niedrigen T-Zellen-Verhältnissen. Die Fig. 2 zeigt, dass Verhältnisse maligner zu T-Zellen von weniger als 1:1 mit relativ niedrigen Antikörperkonzentrationen von weniger als 0,1 Mikrogramm pro ml eine signifikante Zerstörung von malignen Zellen bereitstellen. Dies ist besonders wichtig, da es die Abhängigkeit von der Konzentration an T-Zellen, die in dem Patienten verfügbar sind, reduziert. Ferner reduziert es auch die Menge an erforderlichem Antikörper, wodurch jedwede potentielle Nebenwirkungen limitiert werden.

Beispiel 2: In-vivo-Wirksamkeit des bispezifischen 1DT3-D-Antikörpers

[0095] Dieses Beispiel beschreibt einen in-vivo-Versuchseinsatz des bispezifischen Antikörpers 1DT3-D. Menschliche periphere Blutlymphozyten von einem normalen Spender wurden in vitro in der Gegenwart von OKT3 (2 µg/ml) und rekombinatem IL-2 (300 µg/ml) aktiviert. CB-17-scid/scid-Mäuse (Itoh et al., Cancer 72, 2686-2694 (1993)) wurden subkutan mit 5×10^6 Raji-Zellen, vermischt mit 5×10^6 aktivierten Lymphozyten, injiziert. 24 h später wurden die Mäuse mit bispezifischem Antikörper, einer monospezifischen Antikörperkomponente des bispezifischen Antikörpers oder keinem Antikörper injiziert. Die Mäuse wurden täglich auf die Entwicklung von Tumoren hin untersucht, und zwar von mindestens 0,5 cm an der Stelle der Tumordinjektion. Mäuse, die nach 60 Tagen tumorfrei blieben, wurden als negativ und Mäuse, die innerhalb von 60 Tagen Tumore entwickelten, als positiv verzeichnet. Unbehandelte Kontrollmäuse entwickelten immer innerhalb von 21-28 Tagen Tumore.

[0096] In einem ersten Experiment wurden 5 Mäuse mit 10 µg/Maus bispezifischem Antikörper behandelt, und zwar 24 Stunden nach der Impfung mit der Mischung aus malignen Zellen und aktivierten humanen T-Zellen. Eine Kontrollgruppe von 5 Mäusen wurde nur mit Vehikel geimpft. Das Tumor-Auftreten (d. h. Entwicklung von einem Tumor von mindestens 0,5 cm innerhalb von mindestens acht Wochen) in den behandelten und Kontrollgruppen war folgendermaßen:

<u>Gruppe</u>	<u>Keine Tumoren</u>	<u>Tumoren</u>	<u>Gesamt</u>
Behandlung	4	1	5
Kontrolle	0	5	5

[0097] Unter Verwendung des einseitigen Genauigkeitstests von Fischer hat die Behandlung mit bispezifischem Antikörper das krankheitsfreie Überleben verlängert, und zwar mit einem p-Wert von 0,024.

[0098] Ein zweites Experiment wurde entworfen, um die Anti-Tumor-Effekte des bispezifischen Antikörpers mit monospezifischem Anti-CD3 und monospezifischem 1D10 bei einer Dosierung von 10 µg/Maus in Mäusen zu vergleichen, die mit Tumor- und T-Zellen geimpft wurden, wie oben dargelegt. Mäuse der Gruppe 2 bekamen monospezifischen 1D10 und monospezifischen OKT3, Gruppe 3 bekam bispezifischen Antikörper und die Kontrollgruppe bekam nur Vehikel. Mäuse der Gruppe 4 bekamen auch bispezifischen Antikörper in einer Konzentration von 10 µg/Maus, doch diese Mäuse waren zuvor mit nicht-aktivierten T-Zellen geimpft worden, im Unterschied zu allen anderen Gruppen, die aktivierte T-Zellen bekommen haben.

<u>Gruppe</u>	<u>Keine Tumoren</u>	<u>Tumoren</u>	<u>Gesamt</u>
Kontrolle	0	5	5
2	5	0	5
3	5	0	5
4	2	3	5

[0099] Der Genauigkeitstest von Fischer für allgemeine Zwei-Weg-Tabellen (Agresti, Categorical Data Analysis (Wiley, NY, 1990), S. 64-65) wurde angewendet, um die Null-Hypothese zu testen, dass die Auftretsraten in den vier Gruppen gleich sind. Es besteht eine hochsignifikante Differenz zwischen den Gruppen ($p = 0,001$). Paarige Genauigkeitstests, welche die Kontrollgruppe mit jeweils den Gruppen 2, 3 und 4 vergleichen, wurden ebenfalls durchgeführt. Die entsprechenden einseitigen p-Werte sind 0,004, 0,004 und 0,222. Folglich sind die Gruppen 2 und 3 beide signifikant unterschiedlich von der Kontrollgruppe. Es wurde gefolgert, dass bei einer Dosis von 10 µg/Maus eine Behandlung mit bispezifischem Antikörper oder einer Kombination aus beiden monospezifischen Teilantikörpern das tumorfreie Überleben verlängert.

[0100] In einem dritten Experiment wurde eine Dosis-Wirkungs-Studie durchgeführt, um die Anti-Tumoreffekte verschiedener Dosierungen von bispezifischem Antikörper zu testen. Getrennte Gruppen von Mäusen wur-

den entsprechend mit Dosierungen von 0,4, 2 oder 10 µg/Maus bispezifischem Antikörper oder Vehikel behandelt.

<u>Gruppe</u>	<u>Keine Tumoren</u>	<u>Tumoren</u>	<u>Gesamt</u>
Kontrolle	0	5	5
0.4	1	4	5
2	5	0	5
10	4	1	5

[0101] Der Cochran-Armitage-Trendtest (Agresti, Categorical Data Analysis (Wiley, NY, 1990), S. 100-102, 118-119) wurde angewendet, um die Nullhypothese zu testen, dass die Auftretsraten in den vier Gruppen gleich sind, und zwar gegenüber der Alternativhypothese von einem linearen Trend. Unter Verwendung von Wertungen gleicher Abstände beträgt der p-Wert 0,001; unter Verwendung der Werte 0, 0,4, 2 und 10 beträgt der p-Wert 0,0164. Beide Wertesets zeigen einen signifikanten Trend in den Proportionen an. Diese Ergebnisse zeigen, dass der bispezifische Antikörper effektiv ist, um die Überlebenszeit zu verlängern, und dass Mäuse, die höhere Dosierungen bekommen haben (10 µg und 2 µg), ein verbessertes tumorfreies Überleben vorweisen.

[0102] Ein viertes Experiment wurde entworfen, um monospezifischen OKT3 und 1D10 gegenüber dem bispezifischen Antikörper zu vergleichen, und zwar bei einer Dosis von 2 µg Antikörper/Maus.

<u>Gruppe</u>	<u>Keine Tumoren</u>	<u>Tumoren</u>	<u>Gesamt</u>
Kontrolle	0	5	5
2	0	5	5
3	1	4	5
4	4	1	5

[0103] Das tumorfreie Überleben von Mäusen, die mit monospezifischem OKT3 (Gruppe 2) und monospezifischem 1D10 (Gruppe 3) behandelt wurden, war nicht signifikant unterschiedlich von der Kontrolle, wohingegen Mäuse, die mit bispezifischem Antikörper (Gruppe 4) behandelt wurden, unter Anwendung des Genauigkeitstests von Fischer für allgemeine Zweiweg-Tabellen verlängertes Überleben zeigten.

[0104] Diese Daten zeigen an, dass die systemische Verabreichung von 1DT3-D maligne B-Zellen in vivo abtötet und/oder deren Entwicklung verhindert, und dass eine Dosis von 2 µg/Tier bei der Therapie mit bispezifischem Antikörper effektiver als die Therapie mit monospezifischem Antikörper ist.

Beispiel 3: Erzeugung eines monoklonalen Antikörpers gegen das humane CD3-Antigen

[0105] Der 1DT3-D-Antikörper, der in dem Beispiel 1 beschrieben wurde, beinhaltet OKT3 als den Bindungsrest mit einer Affinität für Effektorzellen. Das vorliegende Beispiel beschreibt die Isolierung von einem alternativen Antikörper, M291, zur Verwendung als die Effektorzell-bindende Komponente in einem bispezifischen Antikörper.

[0106] Humane periphere mononukleare Blutzellen (PBMC) wurden mit PHA und IL-2 aktiviert, um T-Zellen zu expandieren. Aktivierte T-Zellen wurden als Immunogene in Balb/C-Mäusen verwendet. Hybridome wurden aus den Milzen dieser Mäuse durch Standardverfahren erzeugt. Diese Hybridome wurden auf Antikörper hin gescreent, die PBMC zur in-vitro-Proliferation stimulieren können. Anti-CD3-Antikörper mit dem geeigneten Fc veranlassen T-Zellen, sich in PBMC zu vermehren. Eines von diesen Hybridomen, M291, wurde isoliert, und es wurde festgestellt, dass es einen Antikörper des Isotyps IgG2a/kappa sezerniert, der T-Zellen zur Proliferation aktivieren konnte. Der gereinigte Antikörper M291 konkurriert mit einem anderen anti-human-CD3-Antikörper, OKT3, (IgG2a/kappa) um das Binden an humane T-Zellen, wodurch gezeigt wird, dass die durch die entsprechenden Antikörper erkannten Epitope nahe aneinander angeordnet sind. M291 ist folglich ein Antikörper mit der Spezifität gegen den humanen CD3-Komplex.

Beispiel 4: Humanisierung von 1D10- und M291-Antikörpern

[0107] Dieses Beispiel beschreibt die separaten Humanisierungsverfahren für die 1D10- und M291-Antikörper.

per.

Klonieren von cDNAs einer 1D10- und M291-V-Region

[0108] cDNAs von schwerer und leichter V-Domäne wurden unter Anwendung eines verankerten PCR-Verfahrens für 1D10 und M291 kloniert (siehe Loh et al., *Science* 243, 217 (1989)). cDNAs wurden zuerst durch Reverse Transkriptase synthetisiert, und zwar nachdem polyA⁺-RNAs aus den Hybridomzellen mit Oligo-dT geprimt wurden. Ein Schwanz von dGs wurde zu dem 3'-Terminus der cDNA mittels terminaler Deoxynukleotidyl-Transferase gegeben. Die V-Domänen wurden anschließend durch PCR amplifiziert, und zwar mit 3'-Primern, die an den C-Regionen hybridisierten, und 5'-Primern, die an den G-Schwänzen hybridisierten. Verschiedene unabhängige H- und L-Ketten-Klone wurden sequenziert, um sicherzustellen, dass keine Sequenzfehler durch die PCR eingeführt wurden. Für 1D10 wurden die V-Domänen als ein Antikörper des Maus-Isotyps IgG2a/kappa exprimiert, und zwar durch Transfektion der Gene in geeigneten Vektoren in die Myelom-Zelllinie SP2/0, um zu bestätigen, dass sie die Bindungsstelle von 1D10 codieren. Die bei der Transfektion verwendeten Expressionsvektoren ähneln den Plasmiden pVk.G und pVg.D, die von Co et al. (siehe Co et al., *J. Immunol.* 148, 1149 (1992)) beschrieben wurden, mit der Ausnahme, dass die Gene für die konstanten Regionen von Mausequenzen stammen. Es wurde durch Durchflusszytometrie festgestellt, dass aus den transfizierten Zellen isolierter Antikörper an Raji-Zellen bindet, und zwar in einem Muster, das nicht zu unterscheiden ist von dem des elterlichen Maus-IgG1/kappa-1D10-Antikörpers. Die V-Domänen von M291 wurden in ähnlicher Weise kloniert und sie wurden als Maus-F(ab'-Reißverschluss)₂ exprimiert (siehe Kostelny et al., *J. Immunol.* 148, 1547 (1992)). Der Durchflusszytometrie-Assay zeigte an, dass M291-Fos-F(ab'-Reißverschluss)₂ an humane T-Zellen bindet, und zwar mit ähnlicher oder identischer Affinität wie der elterliche Antikörper. Diese Beobachtung bestätigt, dass die richtigen V-Domänen von M291 kloniert wurden.

(2) Modellierung und Design von humanisierten Sequenzen

[0109] Die Sequenzen von humanen V-Domänen, welche dem murinen 1D10 und M291 am meisten ähneln, wurden ausgewählt, um als das Gerüst des humanisierten Antikörpers zu fungieren. Die beste humane V_K-Sequenz für 1D10 war R3.5H5G aus der humanen Untergruppe I, mit nur sechzehn Unterschieden von dem 1D10, und zwar in Gerüstregionen. Manheimer-Lory et al., *J. Exp. Med.* 174, 1639-1652 (1991). Die beste V_H-Sequenz war IC4 aus der Untergruppe II oder Untergruppe IV von Kabat (siehe Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* 1, 1137 (1991)), mit sechsundzwanzig Unterschieden. Die beste humane V_K-Sequenz für M291 ist HF2-1/17 aus der humanen Untergruppe I, mit sechsundzwanzig Aminosäureunterschieden von dem M291, und zwar in Gerüstregionen (Athison et al., *J. Clin. Invest.* 75, 1138 (1985); Lampman, *Blood* 74, 262 (1989)); die beste humane V_H-Sequenz ist 21/28 aus der humanen Untergruppe I, mit zwanzig Aminosäureunterschieden. Dersimonian et al., *J. Immunol.* 139, 2496-2501 (1987). Mit Hilfe des 3-dimensionalen Modells wurde eine zusätzliche Anzahl von Gerüstpositionen identifiziert, die sich zwischen den murinen Antikörpern und den ausgewählten humanen Sequenzen unterschieden. Der Ort dieser Aminosäurereste in dem 3-dimensionalen Raum in Relation zu den hypervariablen Regionen oder CDRs wies darauf hin, dass sie wahrscheinlich die CDR-Anordnung und folglich die Bindungsaffinität beeinflussen. Murine Sequenzen wurden in diesen Positionen verwendet. Eine Anzahl von Positionen wurde in den humanen Sequenzen identifiziert, die sich von dem Konsensus ihrer entsprechenden Untergruppen unterschieden. Diese Aminosäuren wurden ausgetauscht, um mit den Konsensus-Sequenzen zu korrespondieren. V_H- und V_L-Sequenzvergleiche zwischen dem murinen und humanisierten 1D10 und zwischen dem murinen und humanisierten M291 sind in der **Fig. 4** bzw. **Fig. 5** dargestellt.

(3) Synthese und Expression von humanisiertem 1D10-Antikörper

[0110] DNA-Segmente, welche die L- und H-kettigen V-Regionen des humanisierten 1D10 codieren, wurden durch totale Gensynthese aus überlappenden Oligonukleotiden konstruiert. Diese Miniexons schlossen Signalsequenzen, J-Segmente und Spleiß-Spendersequenzen ein, und waren von XbaI-Stellen umgeben. Die DNA-Segmente wurden in einen Expressionsvektor eingebracht, und zwar unter Verwendung des in der **Fig. 6** dargestellten Schemas.

[0111] Die humanisierten V-Domänen wurden in die XbaI-Stellen der entsprechenden schwer- und leichtkettigen Expressionsplasmide pV_g.1.D.Tt und pVk.rG.dE kloniert. Die resultierenden Plasmide werden pHu1D10.Vgl.D.Tt und pHu1D10.V_k.rG.dE genannt. Der schwerkettige Expressionsvektor pVgl.D.Tt, der das Mutanten-Dihydrofolat-Reduktasegen (mdhfr) als den selektierbaren Marker (siehe Simonsen & Levinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 2495, (1983)), den Human-Cytomegalovirus-Haupt-Immediate-Early-Promotor (hCMV) und -Enhancer zur Transkriptionsinitiierung (siehe Boshart et al., *Cell* 41, 521 (1985)) und die konstan-

ten Human-IgG1-Regionen enthält, wurde aus den entsprechenden Fragmenten durch Standardverfahren konstruiert. Er unterscheidet sich von dem Vektor pV_g1.D, der von Co et al., J. Immunol. 148, 1149 (1992) beschrieben wurde, indem er eine Transkriptionsterminierungsstelle 3' gelegen zu der γ -1-Gen-poly(A)-Stelle besitzt. Die Transkriptionsterminierungsstelle (Tt) stammte von der Sequenz, die sich stromabwärts von dem humanen Komplementgen C2 (+37 bis + 162 bp von der C2-poly(A)-Stelle) befindet (siehe Ashfield et al., EMBO J. 10, 4197 (1991)), und wurde gänzlich unter Verwendung überlappender Oligonukleotide synthetisiert.

[0112] Zur Expression einer leichten Kette wurde ein Vektor aus dem hCMV-Promotor und -Enhancer, wobei das humane C_K-Gen einen Teil von dem vorangehenden Intron einschließt, und dem Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-(gpt)-Gen (siehe Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 2072 (1981)) zur Selektion konstruiert. Der Vektor pV_K.rG.dE ähnelt dem pV_K, der von Co et al. (siehe Co et al., J. Immunol. 148, 1149 (1992)) beschrieben wurde, mit Ausnahme der Ausrichtung des gpt-Gens. Zusätzlich wurde eine von den zwei wiederholten Sequenzen in der Enhancer-Region des SV40-Promotors, der verwendet wurde, um das gpt-Gen zur transkribieren, durch SphI-Verdau entfernt.

[0113] Zur Coexpression von schweren und leichten Ketten in einem Plasmid wurde ein EcoRI-Fragment, das den hCMV-Promotor, das VH-Exon, die C_H1-, C_H2- und C_H3-Exons, das polyA-Signal und das Transkriptionsterminierungssignal enthielt, aus dem Schwerketten-Expressionsvektor genommen und in die einzige EcoRI-Stelle des entsprechenden Leichtketten-Expressionsplasmids kloniert. Aufgrund des Vorhandenseins des Transkriptionsterminierungssignals, das sich zwischen ihnen befindet, werden die zwei Gene durch den hCMV-Promotor unabhängig transkribiert. Nach der Transkription wird das humanisierte V_H-Exon an die humanen γ -1-C_H1-, Gelenk-, C_H2 und C_H3-Exons gespleisst und anschließend polyadenyliert. In ähnlicher Weise wird das V_L-Exon an das humane C_K-Exon gespleisst. Die vorausgesagten Aminosäuresequenzen der reifen leichten und schweren Ketten des humanisierten 1D10 sind in den [Fig. 4C](#) bzw. [Fig. 4E](#) dargestellt.

[0114] Das Plasmid pHu1D10.IgG1.rG.dE wurde zur Transfektion in die Maus-Myelom-Zelllinie TSO verwendet, und zwar durch Elektroporation. ISO-Zellen sind Derivate von Maus-Myelom-NSO-Zellen (ECACC 85110503), die für ihre Fähigkeit selektiert wurden, in serumfreien Medien zu wachsen, und zwar gemäß dem Verfahren von Sato et al., J. Exp. Med. 165, 1761 (1987). Die Zellen aus jeder Transfektion wurden hinsichtlich gpt-Expression selektiert. Da der SV40-Promotor/Enhancer für das gpt-Gen stark beschädigt wurde, können nur wenige Transfektanten gpt ausreichend hoch exprimieren, um die Selektion zu überleben (siehe Jasin & Berg, Genes Dev. 2, 1353 (1988)). Die Transfektionseffizienz beträgt etwa $0,5-1,0 \times 10^{-6}$; im Vergleich zu der Effizienz von $10-50 \times 10^{-6}$ der Transfektion, die ein fast identisches Plasmid verwendet, das den Wildtyp-SV40-Promotor für gpt enthält. Beim Screenen hinsichtlich der Herstellung von humanisierten Antikörpern durch einen Standard-ELISA gaben die durchschnittlichen überlebenden Zellen auch höhere Spiegel von Antikörper, und zwar im Vergleich zu denen, die mit Plasmid transfiziert wurden, das den Wildtyp-SV40-Promotor enthielt. Der beste Antikörperproduzent wurde anschließend zur Herstellung des humanisierten 1D10 subkloniert. Der Antikörper Hu1D10 wurde aus dem serumfreien verbrauchten Medium durch Protein-A-Affinitätschromatographie gereinigt.

(4) Eigenschaften von Hu1D10

[0115] Das murine 1D10-IgG2a und der humanisierte 1D10 hatten identische Spektren von Reaktivität mit 1D10-positiven und 1D10-negativen Zelllinien. Die Affinität des murinen 1D10-IgG2a und humanisierten 1D10 für Zellen, die das Zielantigen tragen, wurde durch Anwendung eines Verdrängungsassays evaluiert (siehe Woodle et al., J. Immunol. 148, 2756 (1992)). Bei diesem Assay wurde die Fähigkeit von vorgebundenem humanisiertem 1D10 und murinem 1D10-IgG2a, das Binden von FITC-markiertem murinem 1D10-IgG2a zu inhibieren, durch FACS-Analyse quantifiziert. Humanisierter 1D10 inhibierte kompetitiv das Binden von murinem 1D10-IgG2a, und zwar zu einem Grad, ähnlich demjenigen, der mit dem elterlichen Antikörper beobachtet wurde ([Fig. 7A](#)). Diese Daten zeigten an, dass der humanisierte Antikörper mit ähnlicher Affinität bindet wie der murine Antikörper. Die Scatchard-Analyse wurde verwendet, um die scheinbare Affinität des humanisierten 1D10 besser einzuschätzen. Es wurde festgestellt, dass der humanisierte 1D10-IgG1 eine scheinbare K_a von $2,3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ aufweist, und es bestehen etwa 5×10^5 Stellen pro Zelle in der Raji-Zelllinie ([Fig. 7B](#)). Zusätzlich besitzt der humanisierte 1D10 die Fähigkeit, ADCC und Komplement-vermittelte Lyse zu steuern, zwei Effektor-Funktionen, die nicht in dem ursprünglichen murinen 1D10 vorhanden sind ([Fig. 8A](#) und [Fig. 8B](#)).

(5) Synthese und Expression von humanisiertem M291- und 1D10-(ab'-Reißverschluss)₂

[0116] Die Leucin-Reißverschluss-Gene Jun und Fos wurden, wie von Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547 (1992) beschrieben, synthetisiert. Die resultierenden PCR-Produkte waren 179-bp-PstI-Sall-Fragmente, wel-

che die gesamte Gelenk-Reißverschluss-Genverschmelzung umfassen. Die PstI-Stelle stellt die natürliche Restriktionsstelle dar, die sich an dem Anfang des Gelenkexons befindet, doch die Sall-Stelle wurde an das Ende der Reißverschlusssequenzen während der PCR zugefügt. Das Gelenk/Reißverschlusssexon wurde mit einem 162-bp-Sall-BamHI-Fragment, das die nicht-codierende 3'-Sequenz des Maus-IgG2a-Gens enthielt, in den Schwerketten-Expressionsvektor pVgl.D.Tt eingefügt, wodurch die Gelenk-, C_H2- und C_H3-Exons im Plasmid ersetzt wurden. Die Co-Expression des gestutzten Schwerketten(Fd)-Gens mit dem Leichtketten-Gen in einem Plasmid ist im Wesentlichen die gleiche wie oben für pHu1D10.IgG1.rG.dE beschrieben wurde ([Fig. 6](#)). Die Expressionsplasmide werden pHu1D10-Jun.rG.dE und pHuM291-Fos.rG.dE genannt ([Fig. 9](#)). Die Unterschiede zwischen diesen Plasmiden und denen, die verwendet wurden, um den gesamten Antikörper zu exprimieren, sind: (1) das humane γ 1-C_H1-Exon wird jetzt an das Gelenk/Reißverschluss-Verschmelzungsexon gespleisst, anstatt der Gelenk-, C_H2 und C_H3-Exons, und (2) das Transkript wird durch ein heterologes Signal polyadenyliert. Der Leucin-Reißverschluss Jun wird für das Fd von Hu1D10 und Fos für das Fd von HuM291 verwendet. In Kombination mit der entsprechenden leichten Kette würde der Fd-Reißverschluss F(ab'-Reißverschluss)₂ bilden. Die humanisierten F(ab'-Reißverschluss)₂-Fragmente für 1D10 und M291 werden als Hu1D10-Jun bzw. HuM291-Fos bezeichnet. Die vorausgesagten Aminosäuresequenzen des Schwerketten-Fd-Reißverschlusses in Hu1D10-Jun und HuM291-Fos sind in den [Fig. 4D](#) bzw. [Fig. 5D](#) dargestellt. In beiden Fällen waren Modifikationen des humanen IgG1-Gelenks vorhanden, und zwar in der Region der Gelenk/Reißverschluss-Verschmelzung ([Fig. 10](#)). Eine Insertion von zwei Aminosäureresten Lys-Cys, die von dem Maus-IgG2a-Gelenk stammen, wurde in das Gelenkexon eingeführt, um eine zusätzliche inter-Schwerketten-Disulfidbindung bereitzustellen. Die Insertion dieser beiden Reste in das humane IgG1-Gelenk macht ihr COOH-Ende halb-homolog zu dem des Maus-IgG2a-Gelenks. Das modifizierte Gelenk würde drei inter-Schwerketten-Disulfidbindungen besitzen, verglichen mit zwei in dem Wildtyp-Human-IgG1. Zusätzlich wurden ein Ala-Rest (erster Rest der C_H2-Domäne) und zwei Gly-Reste an der Verschmelzungsverbindungsstelle eingeführt, um die Verbindungsstellen flexibler zu machen. Die Expressionsplasmide pHu1D10-Jun.rG.dE und pHuM291-Fos.rG.dE wurden getrennt in die Maus-Myelom-Zelllinie TSO durch Elektroporation transfiziert. Die Transfektanten wurden auf das Vorhandensein und die Menge von sezernierten F(ab'-Reißverschluss)₂-Fragmenten durch ELISA gescreent. F(ab'-Reißverschluss)₂-Fragmente wurden unter Anwendung von Protein-G-Affinitätschromatographie gereinigt.

(5) Eigenschaften von HuM291-Fos

[0117] Die relative Affinität von murinem M291 und HuM291-Fos-F(ab'-Reißverschluss)₂ für T-Zellen wurde unter Anwendung des oben beschriebenen Verdrängungsassays ermittelt. HuM291-Fos blockiert das Binden von FITC-markiertem murinem M291-IgG2a, ebenso wie das unmarkierte M291 ([Fig. 11A](#)). Die Affinität von HuM291 für CD3 wurde innerhalb des 2-3fachen derjenigen von M291 geschätzt. Die Scatchard-Analyse zeigte an, dass die scheinbare Affinität von HuM291-Fos K_a $1,1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ war, und es gibt etwa $6,6 \times 10^4$ Stellen pro Zelle in aktivierten humanen T-Zellen ([Fig. 11B](#)).

(6) Bildung des bispezifischen Hu1D10-Jun × HuM291-Fos-F(ab'-Reißverschluss)₂ in vitro

[0118] Hu1D10-Jun und HuM291-Fos wurden zu gleichen molaren Konzentrationen zwischen 0,5 bis 3,0 mg/ml vermischt und mit 10 mM DTT in PBS bei 37°C 1 Stunde lang reduziert, um Fab'-Reißverschlüsse zu bilden. Sie wurden durch eine Sepharose-G-50-Säule in PBS laufen gelassen, um das DTT zu entfernen. Das entsalzte Protein wurde bei 4°C 48 Stunden lang inkubiert, um die Bildung von heterodimerem bispezifischem Hu1D10-Jun × HuM291-Fos zu ermöglichen. Die bispezifischen Moleküle wurden ferner durch hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) auf einer Phenyl-Sepharose-Säule gereinigt.

Beispiel 5: T-Zellen-vermittelte Zytotoxizität durch humanisierte bispezifische Antikörper

[0119] Die Fähigkeit von Hu1D10-Jun × HuM291-Fos, T-Zell-vermittelte Lyse zu steuern, wurde in einem Chrom-Freisetzungssassay getestet. Menschliche T-Zellen, die von PBMC nach OKT3- und IL-2-Behandlung stammen, wurden als Effektor-Zellen verwendet. Dawo, die eine aus einem Patienten mit Riesen-B-Zell-Lymphom entwickelte Zelllinie ist, wurde für die Zielzellen verwendet. Die [Fig. 12](#) zeigt, dass der bispezifische Hu1D10-Jun × HuM291-Fos ebenso wie der bispezifische Maus-IgG-1DT3-DT-Zellen steuerte, um Zielzellen zu lysieren. Die zwei bispezifischen Moleküle schienen ähnliche Aktivitäten bei niedrigen Antikörperkonzentrationen zu besitzen. Die zwei elterlichen Antikörper HuM291-Fos und Hu1D10-Jun waren in diesem Assay nicht effektiv, und zwar weder einzeln noch in Kombination.

[0120] Bei hohen Konzentrationen (10 µg/ml) hatte 1DT3-D eine höhere Aktivität als Hu1D10-Jun × HuM291-Fos beim Vermitteln von Zielzellenlyse. Dies lag an FC-Rezeptoren niedriger Affinität auf der Ober-

fläche der Zielzellen. Bei hoher Antikörperkonzentration könnte der Fc des bispezifischen IgGs an diese Rezeptoren binden und T-Zellen dazu steuern, Zielzellen zu lysieren, und zwar unabhängig von dem Zielantigen, ein Mechanismus, der als umgekehrte Lyse bekannt ist (siehe Weiner et al., J. Immunol. 152, 2385 (1994)). Da Hu1D10-Jun × HuM291-Fos ein F(ab')₂-ähnliches Molekül ohne Fc ist, kann es keine Lyse durch Binden an einen FC-Rezeptor initiieren. In einigen therapeutischen Anwendungen ist die Eigenschaft des humanisierten Antikörpers vorteilhaft beim Erhöhen der selektiven Toxizität des Antikörpers.

SEQUENZAUF LISTUNG

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER: Weiner, George
Gingrich, Roger
Link, Brian
Tso, J. Yun

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: BISPEZIFISCHER ANTIKÖRPER ZUR EFFEKTIVEN BEHANDLUNG VON B-ZELL-LYMPHOMEN UND ZELLINIEN

(iii) ANZAHL VON SEQUENZEN: 14

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

- (A) ADRESSE: Townsend and Townsend and Crew
- (B) STRASSE: One Market Plaza, Steuart Tower, Suite 2000
- (C) STADT: San Francisco
- (D) BUNDESLAND: Kalifornien
- (E) LAND: USA
- (F) POSTLEITZAHL (ZIP): 94105

(v) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) MEDIUM-TYP: Floppy Disk
- (B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: Ausgabe der Patentinhaberin # 1.0, Version # 1.25

(vi) DERZEITIGE ANMELDE DATEN:

- (A) ANMELDENUMMER: US 08/397 411
- (B) EINREICHUNGSDATUM: 01. MÄRZ 1995
- (C) KLASSIFIZIERUNG:

(vii) FRÜHERE ANMELDE DATEN:

- (A) ANMELDENUMMER: US 07/859 583
- (B) EINREICHUNGSDATUM: 27. MÄRZ 1992

(viii) INFORMATION ZUM ANWALT/AGENTEN:

- (A) NAME: Smith, William M.
- (B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 30. 223
- (C) REFERENZ/AKTEN-NUMMER: 011823-004901

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATION:

- (A) TELEFON: (415) 326-2400
- (B) TELEFAX: (415) 326-2422

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 1:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 107 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 1:

```

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

```

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 2:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 107 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 2:

```

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

```

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 3:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 116 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 3:

```

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

```

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 4:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 116 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 4:

```

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

```

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 5:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 214 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 5:

```

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

```


(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 6:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 273 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 6:

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

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220
Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Gly Gly Arg Ile Ala Arg Leu Glu
225 230 235 240
Glu Lys Val Lys Thr Leu Lys Ala Gln Asn Ser Glu Leu Ala Ser Thr
245 250 255
Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln Leu Lys Gln Lys Val Met
260 265 270

Asn

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 7:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 446 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 7:

```

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

```

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys ~~Asp~~ Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 8:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 106 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 8:

```

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

```

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 9:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 106 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 9:

```

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

```

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 10:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 120 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 10:

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

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.:11:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 120 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.:11:

```

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

```


(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 12:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 213 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 12:

```

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

```

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 13:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 279 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 13:

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

```

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Asp Lys Ser Cys Asp
210                215                220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Gly Gly Leu Thr
225                230                235                240

Asp Thr Leu Gln Ala Glu Thr Asp Gln Leu Glu Asp Lys Lys Ser Ala
245                250                255

Leu Gln Thr Glu Ile Ala Asn Leu Leu Lys Gly Lys Glu Lys Leu Glu
260                265                270

Phe Ile Leu Ala Ala Thr Ser
275

```

(2) INFORMATION ZUR SEQ ID NR.: 14:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRANGART: einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 14:

```

Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1                5

```

Patentansprüche

1. Humanisierte Version des Maus-Antikörpers 1D10, wobei der Maus-Antikörper gekennzeichnet ist durch eine variable Region einer leichten Kette, dargestellt in [Fig. 4A](#), untere Abbildung, und eine variable Region einer schweren Kette, dargestellt in [Fig. 4B](#), untere Abbildung.

2. Humanisierter Antikörper gemäß Anspruch 1, wobei der Antikörper eine humanisierte schwere Kette und eine humanisierte leichte Kette aufweist:

(1) die humanisierte leichte Kette drei komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR1, CDR2 und CDR3) aufweist mit Aminosäuresequenzen der entsprechenden komplementaritätsbestimmenden Regionen der leichten Kette des 1D10-Immunglobulins und einer variablen Gerüstregion einer variablen Gerüstregionsequenz einer humanen kappa leichten Kette mit Ausnahme wenigstens einer Position, die aus einer ersten Gruppe gewählt ist, die aus L48, L49, L69 und L70 besteht, wobei die Aminosäureposition durch die gleiche Aminosäure besetzt ist, die an der entsprechenden Position der variablen Gerüstregion der leichten Kette des 1D10-Immunglobulins vorhanden ist; und

(2) die humanisierte schwere Kette drei komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR1, CDR2 und CDR3) aufweist mit Aminosäuresequenzen der entsprechenden komplementaritätsbestimmenden Regionen der schweren Kette des 1D10-Immunglobulins und einer variablen Gerüstregion einer variablen Gerüstregionsequenz einer humanen schweren Kette mit Ausnahme wenigstens einer Position, die aus einer zweiten Gruppe gewählt ist, die aus H27, H29, H30, H37, H67, H71, H78 und H83 besteht, wobei die Aminosäureposition durch die gleiche Aminosäure belegt ist, die an der entsprechenden Position der variablen Gerüstregion der schweren Kette des Maus-1D10-Immunglobulins vorhanden ist;

wobei der 1D10-Antikörper gekennzeichnet ist durch eine variable Region einer leichten Kette, dargestellt in [Fig. 4A](#), untere Abbildung, und eine variable Region einer schweren Kette, dargestellt in [Fig. 4B](#), untere Ab-

bildung; und

wobei der humanisierte Antikörper speziell an ein 28/32 kDa heterodimeres Protein auf der Oberfläche maligner B-Zellen bindet mit einer Bindungsaffinität mit einer unteren Grenze von ungefähr 10^7 M^{-1} und einer oberen Grenze des Fünffachen der Bindungsaffinität des 1D10-Immunglobulins.

3. Humanisierter Antikörper gemäß Anspruch 2, wobei die variable Gerüstregion der humanisierten leichten Kette aus der variablen Gerüstregion der leichten Kette des R3.5H5G-Antikörpers ist, mit der Ausnahme an der wenigstens einen Position, die aus der ersten Gruppe gewählt ist, und mit Ausnahme der Position L43, welche durch die Aminosäure belegt ist, die an der entsprechenden Position einer humanen kappa Untergruppe I Konsensus-Sequenz vorhanden ist; die humanisierte schwere Kette von der variablen Gerüstregion der schweren Kette des IC4-Antikörpers ist mit der Ausnahme wenigstens einer Position, die aus der zweiten Gruppe gewählt ist, und mit Ausnahme der Position H73, wobei die Aminosäureposition von der gleichen Aminosäure belegt ist, die an der entsprechenden Position einer humanen Immunglobulin-Untergruppe II oder IV Konsensus-Sequenz vorhanden ist.

4. Humanisierter Antikörper gemäß Anspruch 3, wobei die humanisierte leichte Kette die Aminosäuresequenz aus [Fig. 4A](#), obere Abbildung, aufweist, und die humanisierte schwere Kette die Aminosäuresequenz aus [Fig. 4B](#), obere Abbildung, aufweist; wobei optional die humanisierte leichte Kette weiter eine humane konstante kappa Region aufweist, wobei die humanisierte schwere Kette weiter eine humane konstante $\gamma 1$ -Region aufweist und wobei der humanisierte Antikörper ADCC und komplementvermittelte Lyse maligner B-Zellen bewirkt, wenn er an ein 28/32 kDa heterodimeres Protein an der Oberfläche der Zellen gebunden ist.

5. Humanisierter Antikörper, wobei der Antikörper eine humanisierte schwere Kette und eine humanisierte leichte Kette aufweist:

(1) die humanisierte leichte Kette drei komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR1, CDR2 und CDR3) aufweist mit Aminosäuresequenzen der entsprechenden komplementaritätsbestimmenden Regionen der leichten Kette des Maus-M291-Immunglobulins und einer variablen Gerüstregion einer variablen Gerüstregionsequenz einer humanen kappa leichten Kette, und

(2) die humanisierte schwere Kette drei komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR1, CDR2 und CDR3) aufweist mit Aminosäuresequenzen der entsprechenden komplementaritätsbestimmenden Regionen der schweren Kette des Maus-M291-Immunglobulins und einer variablen Gerüstregion einer variablen Gerüstregionsequenz einer humanen schweren Kette mit Ausnahme wenigstens einer Position, die aus einer zweiten Gruppe gewählt ist, die aus H30, H67, H68, H70, H72 und H74 besteht, wobei die Aminosäureposition durch die gleiche Aminosäure belegt ist, die an der entsprechenden Position der variablen Gerüstregion der schweren Kette des Maus-M291-Immunglobulins vorhanden ist;

wobei das M291-Immunglobulin gekennzeichnet ist durch eine variable Region einer leichten Kette, dargestellt in [Fig. 5A](#), untere Abbildung, und eine variable Region einer schweren Kette, dargestellt in [Fig. 5B](#), untere Abbildung; und

wobei der humanisierte Antikörper spezifisch an ein CD3-Antigen auf der Oberfläche von T-Zellen bindet mit einer Bindungsaffinität mit einer unteren Grenze von ungefähr 10^7 M^{-1} und einer oberen Grenze des Fünffachen der Bindungsaffinität des M291-Immunglobulins.

6. Humanisierter Antikörper gemäß Anspruch 5, wobei die variable Gerüstregion der humanisierten leichten Kette aus der variablen Gerüstregion der leichten Kette des HF2-1/17-Antikörpers in Untergruppe I ist; die Gerüstregion der humanisierten schweren Kette von der variablen Gerüstregion der schweren Kette des 21/28-Antikörpers ist mit der Ausnahme wenigstens einer Position, die aus der zweiten Gruppe gewählt ist, und mit Ausnahme der Position 44, wobei die Aminosäureposition von der gleichen Aminosäure belegt ist, die an der entsprechenden Position einer humanen Immunglobulin-Untergruppe I Konsensus-Sequenz vorhanden ist.

7. Humanisierter Antikörper gemäß Anspruch 6, wobei die humanisierte leichte Kette die Aminosäuresequenz aus [Fig. 5A](#), obere Abbildung, aufweist, und die humanisierte schwere Kette die Aminosäuresequenz aus [Fig. 5B](#), obere Abbildung, aufweist.

8. Bispezifischer Antikörper, welcher aufweist:

ein erstes Bindungsfragment, welches aufweist:

eine humanisierte Form der variablen Region der schweren Kette des M291-Antikörpers wie in [Fig. 5B](#), untere Abbildung, dargestellt;

eine humanisierte Form der variablen Region der leichten Kette des M291-Antikörpers wie in [Fig. 5A](#), untere

Abbildung, dargestellt; und ein zweites Bindungsfragment, welches mit dem ersten Bindungsfragment verknüpft ist und welches aufweist: eine humanisierte Form der variablen Region der schweren Kette des 1D10-Antikörpers wie in [Fig. 4B](#), untere Abbildung, dargestellt; eine humanisierte Form der variablen Region der leichten Kette des 1D10-Antikörpers wie in [Fig. 4A](#), untere Abbildung, dargestellt; wobei das erste Bindungselement spezifisch an das CD3-Antigen bindet und das zweite Bindungselement spezifisch an das 28/32 kDa heterodimere Antigen auf der Oberfläche maligner B-Zellen bindet.

9. Bispezifischer Antikörper gemäß Anspruch 8, wobei: die humanisierte Form der variablen Region der schweren Kette des M291-Antikörpers drei komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR1, CDR2 und CDR3) aufweist mit Aminosäuresequenzen der entsprechenden komplementaritätsbestimmenden Regionen der schweren Kette des M291-Immunglobulins und einer variablen Gerüstregion einer variablen Gerüstregionsequenz einer humanen schweren Kette mit Ausnahme wenigstens einer Position, die aus einer Gruppe gewählt ist, die aus H30, H67, H68, H70, H72 und H74 besteht, wobei die Aminosäureposition durch die gleiche Aminosäure belegt ist, die an der entsprechenden Position der variablen Gerüstregion der schweren Kette des Maus-M291-Immunglobulins vorhanden ist; die humanisierte Form der variablen Region der leichten Kette des M291-Antikörpers drei komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR1, CDR2 und CDR3) aufweist mit Aminosäuresequenzen der entsprechenden komplementaritätsbestimmenden Regionen der leichten Kette des M291-Immunglobulins und einer variablen Gerüstregion einer variablen Gerüstregionsequenz einer humanen kappa leichten Kette; die humanisierte Form der variablen Region der schweren Kette des 1D10-Antikörpers drei komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR1, CDR2 und CDR3) aufweist mit Aminosäuresequenzen der entsprechenden komplementaritätsbestimmenden Regionen der schweren Kette des 1D10-Immunglobulins und einer variablen Gerüstregion einer variablen Gerüstregionsequenz einer humanen schweren Kette mit Ausnahme wenigstens einer Position, die aus einer zweiten Gruppe gewählt ist, die aus H27, H29, H30, H37, H67, H71, H78 und H83 besteht, wobei die Aminosäureposition durch die gleiche Aminosäure belegt ist, die an der entsprechenden Position der variablen Gerüstregion der schweren Kette des Maus-1D10-Immunglobulins vorhanden ist; und die humanisierte Form der variablen Region der leichten Kette des 1D10-Antikörpers drei komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR1, CDR2 und CDR3) aufweist mit Aminosäuresequenzen der entsprechenden komplementaritätsbestimmenden Regionen der leichten Kette des 1D10-Immunglobulins und einer variablen Gerüstregion einer variablen Gerüstregionsequenz einer humanen kappa leichten Kette mit Ausnahme wenigstens einer Position, die aus einer ersten Gruppe gewählt ist, die aus L48, L49, L69 und L70 besteht, wobei die Aminosäureposition durch die gleiche Aminosäure besetzt ist, die an der entsprechenden Position der variablen Gerüstregion der leichten Kette des 1D10-Immunglobulins vorhanden ist.

10. Bispezifischer Antikörper gemäß Anspruch 9, wobei das erste Bindungsfragment die in [Fig. 5B](#), obere Abbildung, dargestellte variable Region der schweren Kette und die in [Fig. 5A](#), obere Abbildung, dargestellte variable Region der leichten Kette aufweist und das zweite Bindungsfragment die in [Fig. 4B](#), obere Abbildung, dargestellte variable Region der schweren Kette und die in [Fig. 4A](#), obere Abbildung, dargestellte Variable Region der leichten Kette aufweist; wobei optional das erste und zweite Bindungsfragment weiter jeweils ein Segment einer konstanten Region aufweist, das mit der entsprechenden variablen Region der schweren Kette verschmolzen ist, und die Bindungsfragmente durch Assoziation der konstanten Regionen verknüpft sind.

11. Bispezifischer Antikörper gemäß Anspruch 10, wobei die Bindungsfragmente Fab oder Fab' sind, wobei vorzugsweise die Bindungsfragmente Fab¹s sind und der bispezifische Antikörper ein F(ab')₂ ist.

12. Bispezifischer Antikörper gemäß Anspruch 10 oder 11, wobei die ersten und zweiten Bindungsfragmente weiter erste und zweite Leuzin-Reißverschlüsse (Zipper) aufweisen, die mit den entsprechenden konstanten Regionen verschmolzen sind.

13. Bispezifischer Antikörper gemäß Anspruch 12, wobei das erste Bindungsfragment eine schwere Kette mit der in [Fig. 5D](#) dargestellten Aminosäuresequenz aufweist und das zweite Bindungsfragment eine schwere Kette mit der in [Fig. 4D](#) dargestellten Aminosäuresequenz aufweist.

14. Verwendung eines bispezifischen Antikörpers gemäß einem der Ansprüche 8 bis 13 bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Patienten, der an einer der Krankheiten leidet, die gewählt ist aus akuter lymphoblastischer Leukämie, B-Zell-Lymphom, chronischer lymphatischer Leukämie, Multiplem Myelom; wobei das Medikament optional ebenfalls ein Agens enthalten kann, um T-Zellen in dem Patienten zu ak-

tivieren, beispielweise IL-2.

Es folgen 14 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

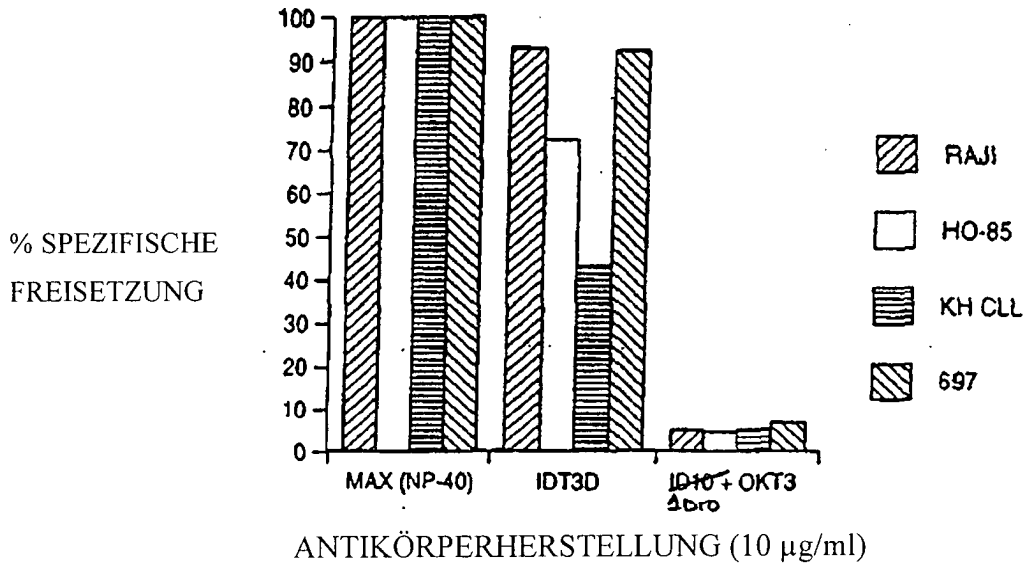


FIG. 1

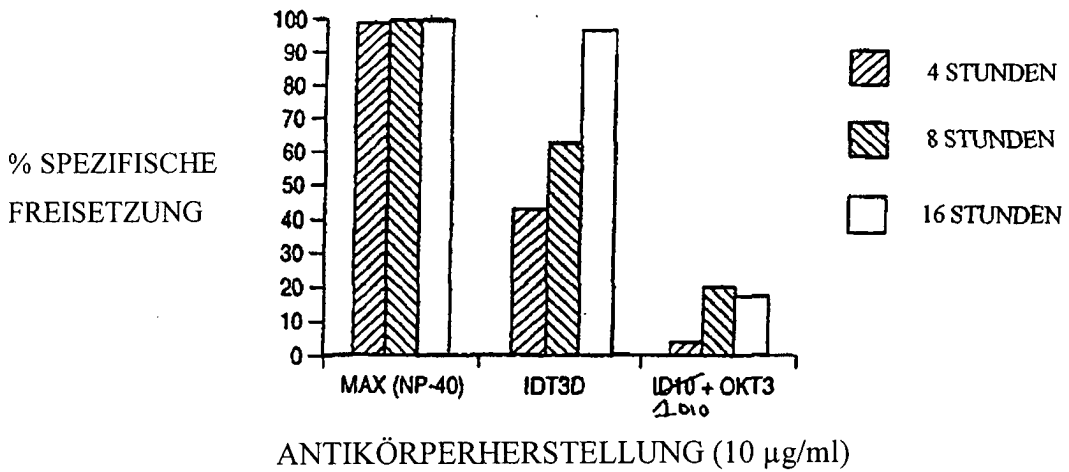


FIG. 3

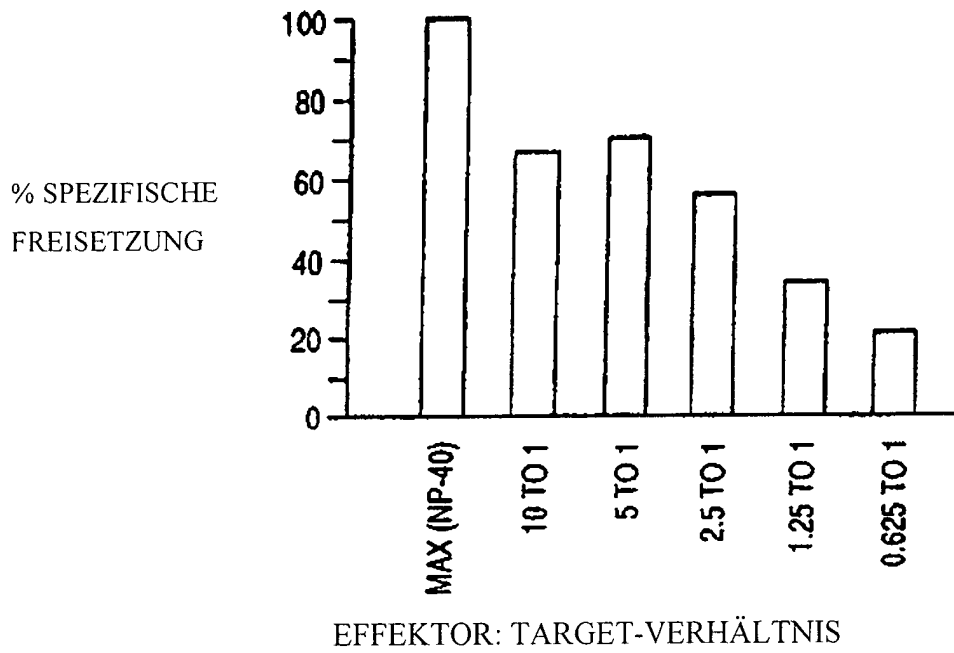


FIG. 2A

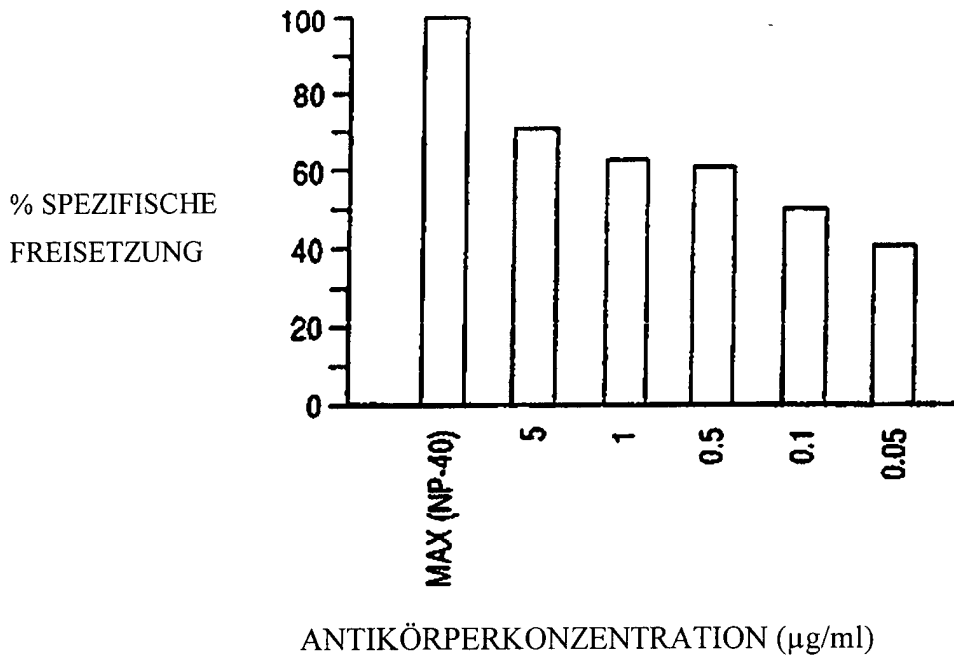


FIG. 2B


```

1      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1      D I Q M T Q S P A S L S A S V G E T V T

21     I T C R A S E N I Y S Y L A W Y Q Q K P
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
21     I T C R A S E N I Y S Y L A W Y Q Q K Q

41     G K A P K L L V S N A K T L A E G V P S
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
41     G K S P Q L L V S N A K T L A E G V T S

61     R F S G S G S G K Q F T L T I S S L Q P
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
61     R F S G S G S G K Q F S L K I N S L Q P

81     E D F A T Y Y C Q H H Y G N S Y P F G Q
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
81     E D F G N Y Y C Q H H Y G N S Y P F G G

101    G T K L E I K
      | | | | | | | |
101    G T K L E I K
    
```

FIG. 4A

```

1      Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1      Q V Q L K Q S G P G L V Q P S Q S L S I

21     T C T V S G F S L T N Y G V H W V R Q S
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
21     T C T G S G F S L T N Y G V H W V R Q S

41     P G K G L E W I G V K W S G G S T E Y N
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
41     P G K G L E W L G V K W S G G S T E Y N

61     A A F I S R L T I S K D T S K N Q V S L
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
61     A A F I S R L S I S K D N S K S Q V F F

81     K L N S L T A A D T A V Y Y C A R N D R
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
81     K M N S L Q A D D T A M Y Y C A R N D R

101    Y A M D Y W G Q G T L V T V S S
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
101    Y A M D Y W G Q G T S V T V S S
    
```

FIG. 4B

1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
 21 I T C R A S E N I Y S Y L A W Y Q Q K P
 41 G K A P K L L V S N A K T L A E G V P S
 61 R F S G S G S G K Q F T L T I S S L Q P
 81 E D F A T Y Y C Q H H Y G N S Y P F G Q
 101 G T K L E I K R T V A A P S V F I F P P
 121 S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y
 141 P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q
 161 E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T
 181 L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G
 201 L S S P V T K S F N R G E C

FIG. 4C

1 Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L
 21 T C T V S G F S L T N Y G V H W V R Q S
 41 P G K G L E W I G V K W S G G S T E Y N
 61 A A F I S R L T I S K D T S K N Q V S L
 81 K L N S L T A A D T A V Y Y C A R N D R
 101 Y A M D Y W G Q G T L V T V S S A S T K
 121 G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A
 141 L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G
 161 A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S
 181 L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N
 201 V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D
 221 K T H T C P P C K C P A G G R I A R L E
 241 E K V K T L K A Q N S E L A S T A N M L
 261 R E Q V A Q L K Q K V M N

FIG. 4D

1 Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L
21 T C T V S G F S L T N Y G V H W V R Q S
41 P G K G L E W I G V K W S G G S T E Y N
61 A A F I S R L T I S K D T S K N Q V S L
81 K L N S L T A A D T A V Y Y C A R N D R
101 Y A M D Y W G Q G T L V T V S S A S T K
121 G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A
141 L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G
161 A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S
181 L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N
201 V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D
221 K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F
241 L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C
261 V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G
281 V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R
301 V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
321 K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G
341 Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N
361 Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W
381 E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D
401 G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N
421 V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L
441 S L S P G K

FIG. 4E

```

1   D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
   | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1   Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T

21  I T C S A S S S V S Y M N W Y Q Q K P G
   | | | | | | | | | | | | | | | | | |
21  M T C S A S S S V S Y M N W Y K Q K S G

41  K A P K R L I Y D T S K L A S G V P S R
   | | | | | | | | | | | | | | | | | |
41  T S P K R W T Y D T S K L A S G V P A R

61  F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E
   | | | | | | | | | | | | | | | | | |
61  F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A E

81  D F A T Y Y C Q Q W S S N P P T F G G G
   | | | | | | | | | | | | | | | | | |
81  D A A T Y Y C Q Q W S S N P P T F G S G

101 T K V E I K
    | | | | |
101 T K L E I K
  
```

FIG. 5A

```

1   Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V
   | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1   Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M

21  S C K A S G Y T F I S Y T M H W V R Q A
   | | | | | | | | | | | | | | | | | |
21  S C K A S G Y T F I S Y T M H W V K Q R

41  P G Q G L E W M G Y I N P R S G Y T H Y
   | | | | | | | | | | | | | | | | | |
41  P G Q G L E W I G Y I N P R S G Y T H Y

61  N Q K L K D K A T L T A D K S A S T A Y
   | | | | | | | | | | | | | | | | | |
61  N Q K L K D K A T L T A D K S S S S A Y

81  M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R S A
   | | | | | | | | | | | | | | | | | |
81  M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R S A

101 Y Y D Y D G F A Y W G Q G T L V T V S S
   | | | | | | | | | | | | | | | | | |
101 Y Y D Y D G F A Y W G Q G T L V T V S A
  
```

FIG. 5B

1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
 21 I T C S A S S S V S Y M N W Y Q Q K P G
 41 K A P K R L I Y D T S K L A S G V P S R
 61 F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E
 81 D F A T Y Y C Q Q W S S N P P T F G G G
 101 T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S
 121 D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P
 141 R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E
 161 S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L
 181 S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L
 201 S S P V T K S F N R G E C

FIG. 5C

1 Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V
 21 S C K A S G Y T F I S Y T M H W V R Q A
 41 P G Q G L E W M G Y I N P R S G Y T H Y
 61 N Q K L K D K A T L T A D K S A S T A Y
 81 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R S A
 101 Y Y D Y D G F A Y W G Q G T L V T V S S
 121 A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G
 141 G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
 161 W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
 181 G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
 201 Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P
 221 K S C D K T H T C P P C K C P A G G L T
 241 D T L Q A E T D Q L E D K K S A L Q T E
 261 I A N L L K E K E K L E F I L A A T S

FIG. 5D

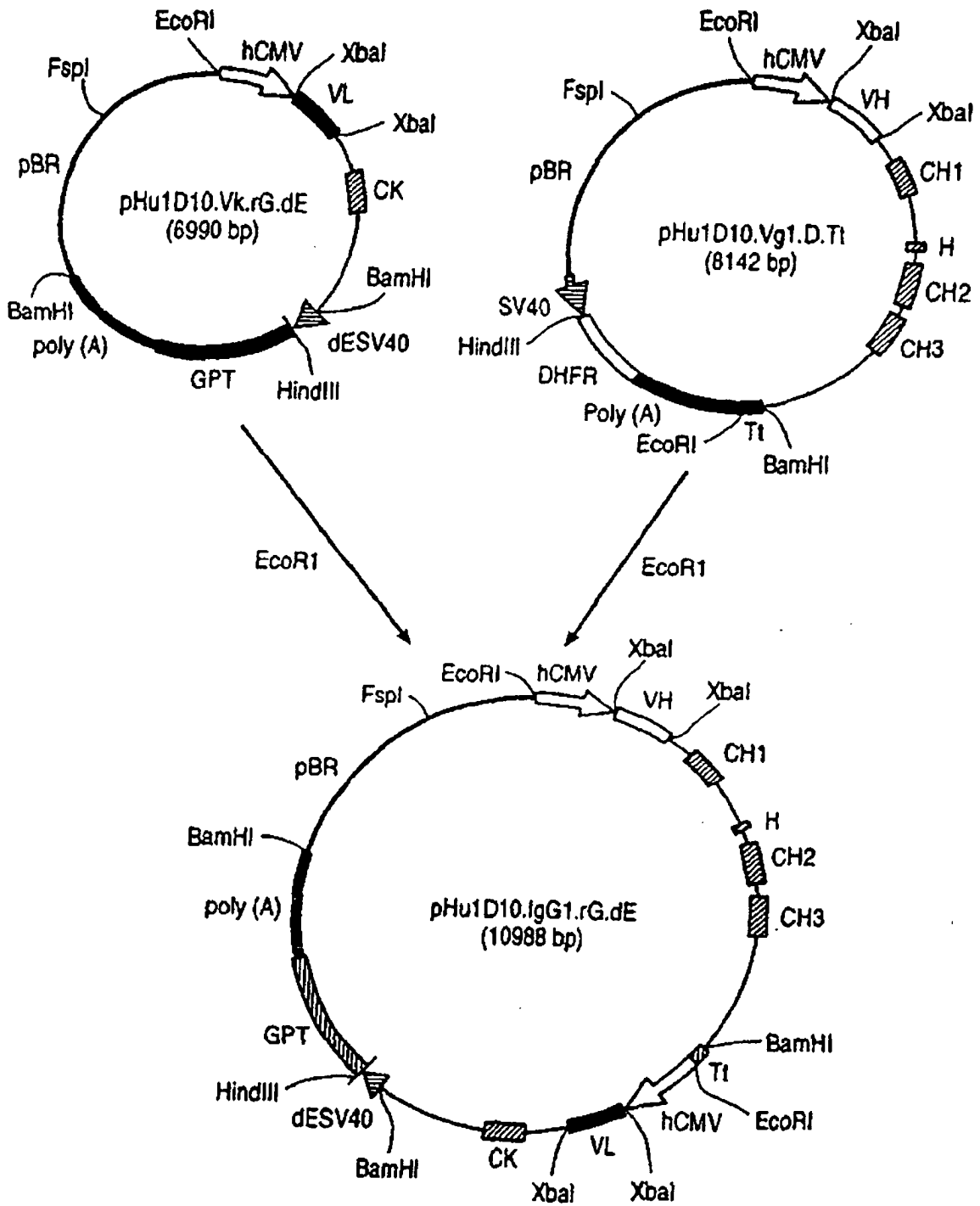


FIG. 6

PROZENTUALER WERT DER MAXIMALEN FLUORESZENZ

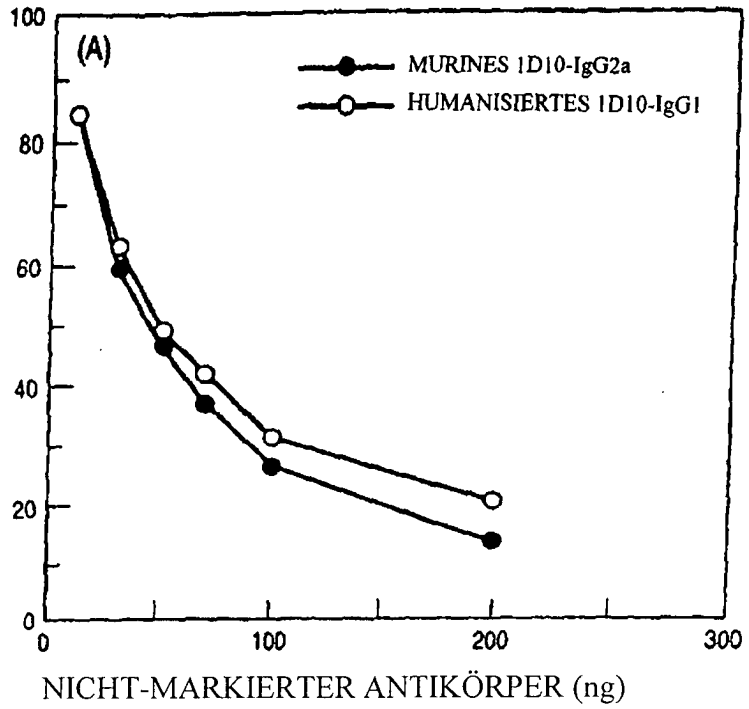


FIG. 7A

GEBUNDENER ANTIKÖRPER/
FREIER ANTIKÖRPER

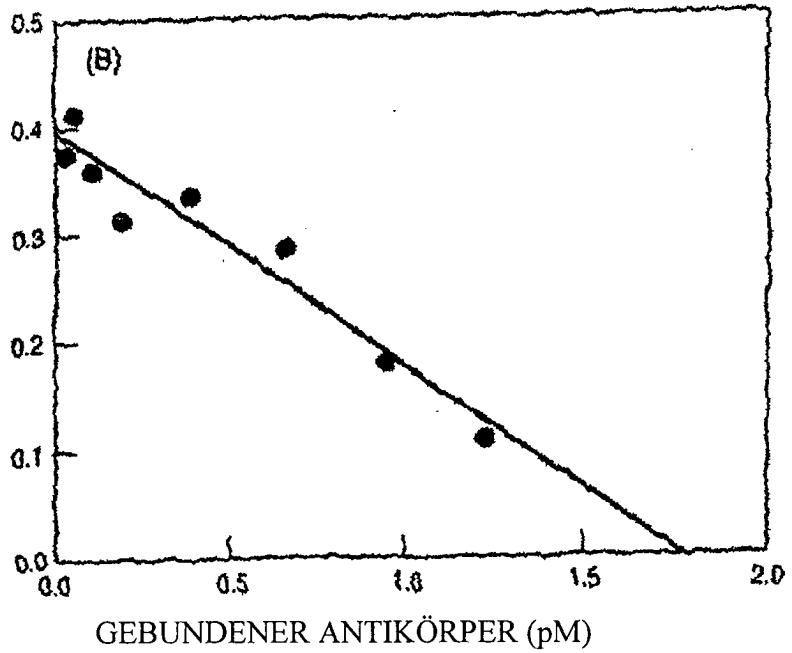


FIG. 7B

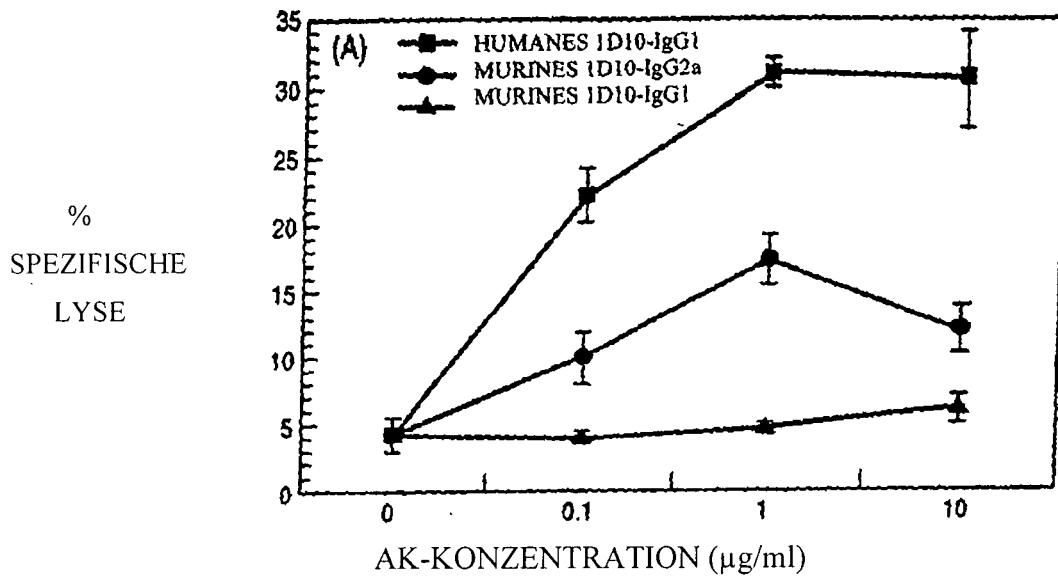


FIG. 8A

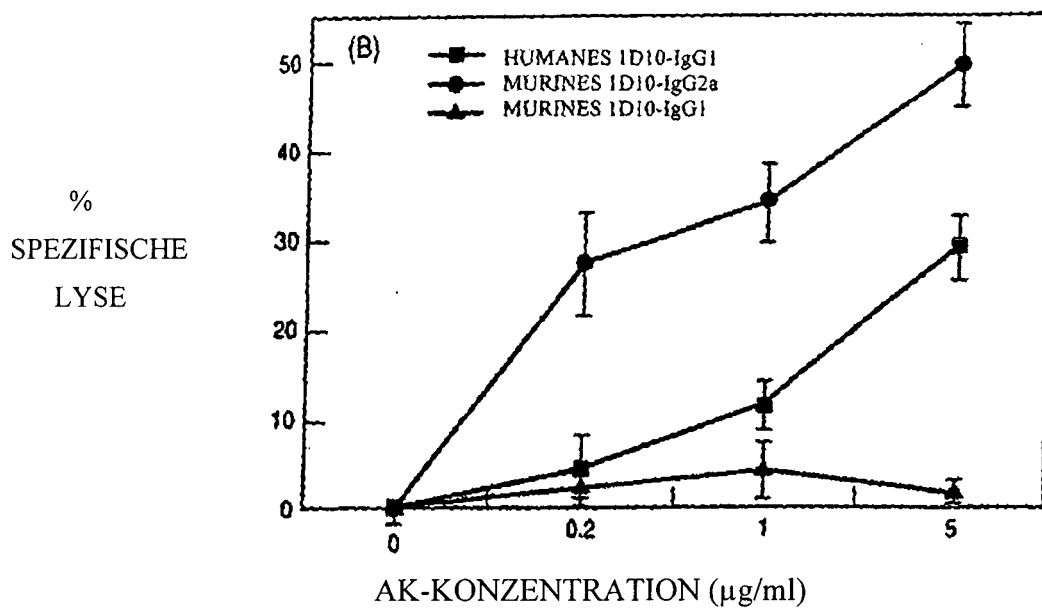


FIG. 8B

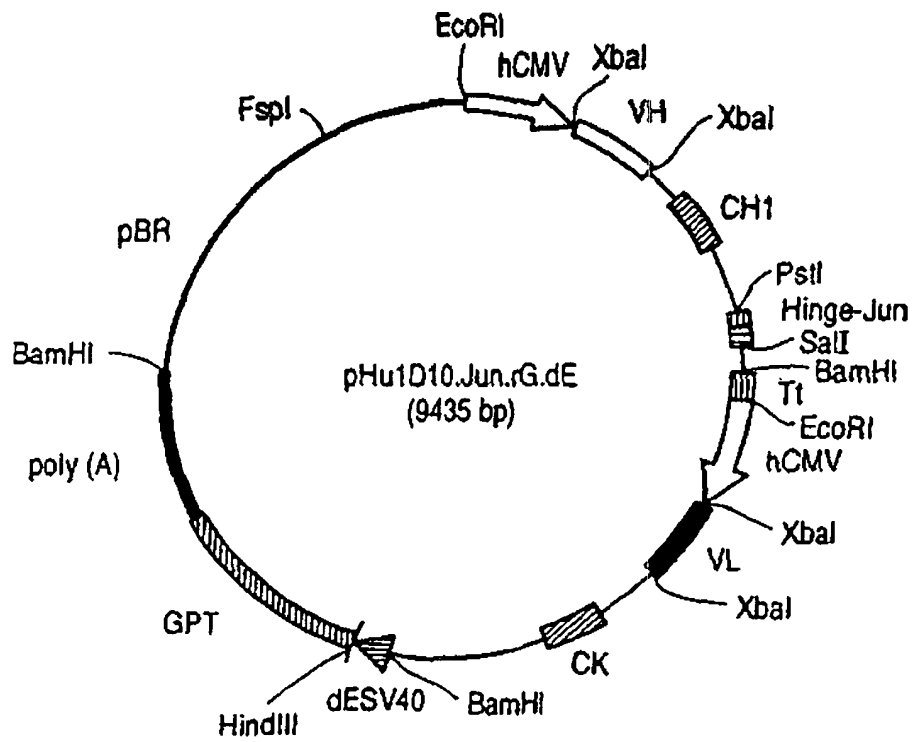


FIG. 9A

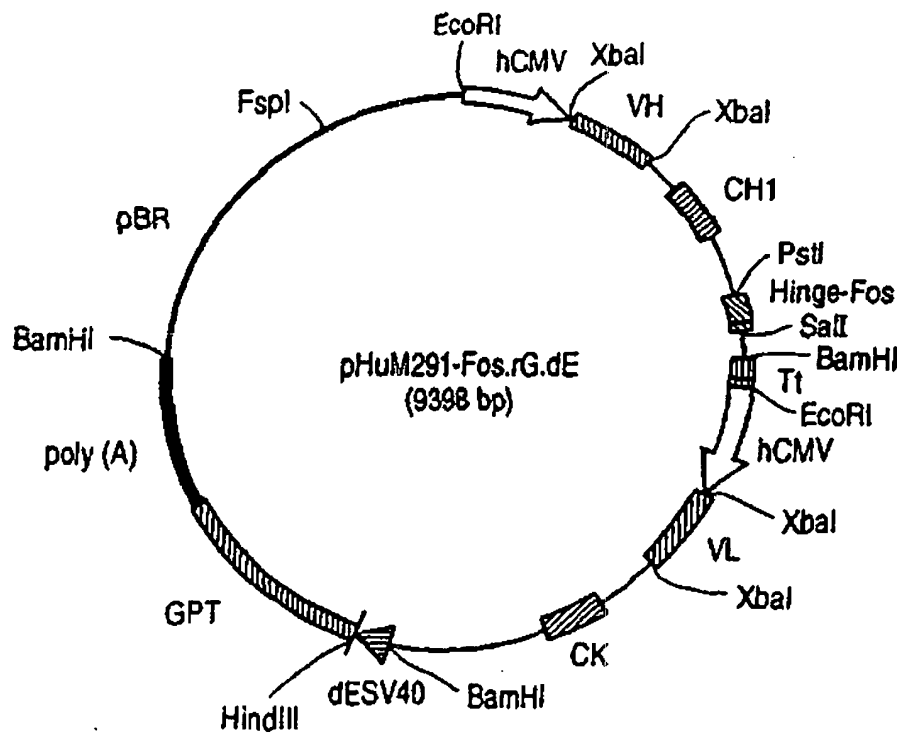


FIG. 9B

Hinge = Gelenk

A—E—P—K—S—C—D—K—T—H—T—C—P—P—C—K—C—P—A—G—G—Zipper
————— MODIFIZIERTES HUMANES IgG1-GELENK —————

FIG. 10A

A—E—P—K—S—C—D—K—T—H—T—C—P—P—C—P—
————— HUMANES IgG1-GELENK —————

FIG. 10B

E—P—R—G—P—T—I—K—P—C—P—P—C—K—C—P—
————— MÄUSE - IgG2a-GELENK —————

FIG. 10C

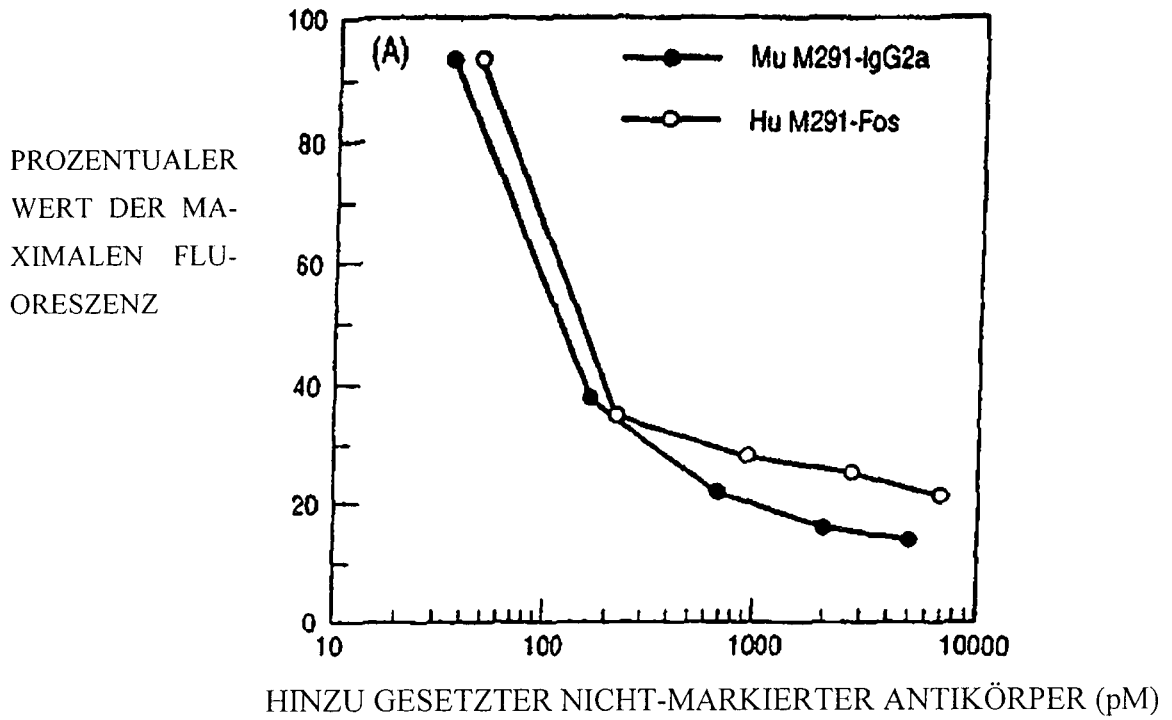


FIG. 11A

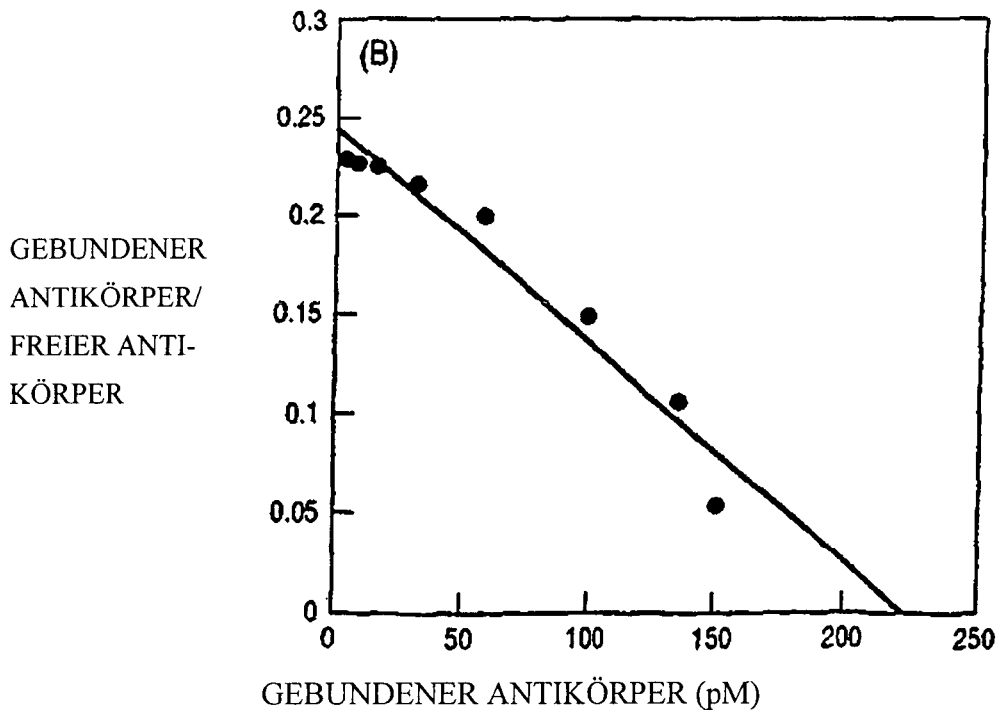


FIG. 11B

LYSE VON DAWO-ZELLEN, VERMITTELT DURCH BISPEZIFISCHEN ANTIKÖRPER

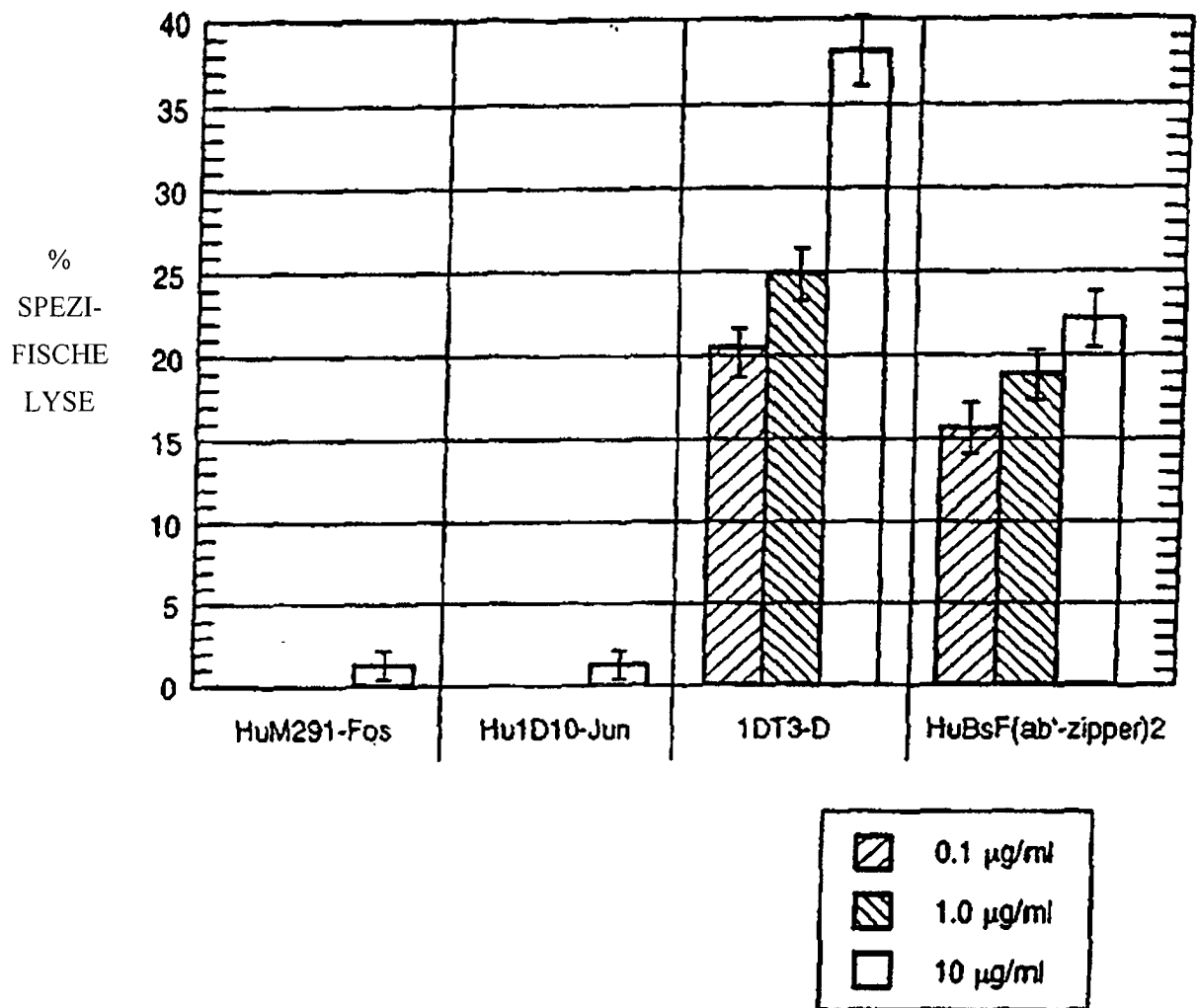


FIG. 12