



(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **198 19 846.9**
 (22) Anmeldetag: **05.05.1998**
 (43) Offenlegungstag: **11.11.1999**
 (45) Veröffentlichungstag
 der Patenterteilung: **24.11.2016**

(51) Int Cl.: **C07K 16/00 (2006.01)**
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

Innerhalb von neun Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
**Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des
 öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE**

(72) Erfinder:
Little, Melvyn, 69151 Neckargemünd, DE;
Kipriyanov, Sergej, 69121 Heidelberg, DE

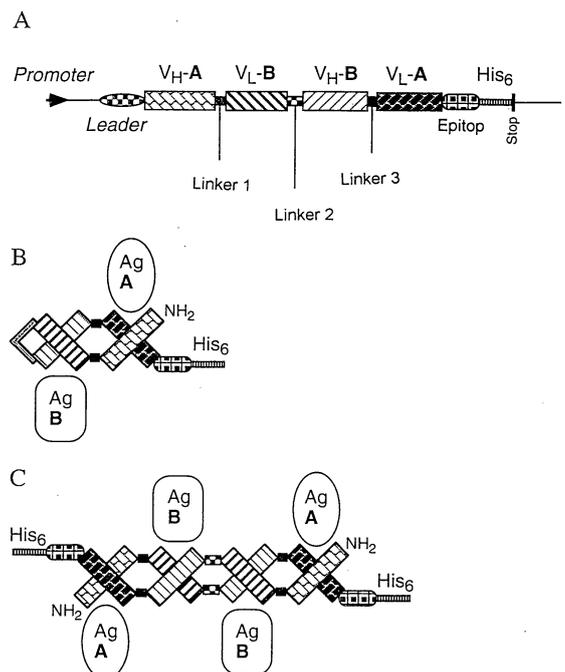
(74) Vertreter:
Dr. B. Huber und Kollegen, 81825 München, DE

(56) Ermittelter Stand der Technik:

DE	198 16 141	A1
WO	91/ 19 739	A1

(54) Bezeichnung: **Multivalente Antikörper-Konstrukte**

(57) Hauptanspruch: Multivalenter F_v-Antikörper mit mindestens vier variablen Domänen, die über einen Peptidlinker 1, einen mittleren Peptidlinker 2 und einen Peptidlinker 3 miteinander verbunden sind, dadurch gekennzeichnet, dass die Peptidlinker 1 und 3 0–10 Aminosäuren aufweisen und der F_v-Antikörper an ein Antigen aus der Gruppe bestehend aus CD19 und CD3 bindet.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft multivalente F_V -Antikörper-Konstrukte, die CD3 und CD19 binden, sie kodierende Expressionsplasmide, und ein Verfahren zur Herstellung der F_V -Antikörper-Konstrukte sowie ihre Verwendung.

[0002] Natürliche Antikörper sind Dimere und werden daher als bivalent bezeichnet. Sie weisen vier variable Domänen, nämlich zwei V_H - und zwei V_L -Domänen, auf. Die variablen Domänen dienen als Bindungsstellen für ein Antigen, wobei eine Bindungsstelle aus einer V_H - und einer V_L -Domäne ausgebildet ist. Natürliche Antikörper erkennen jeweils ein Antigen, wodurch sie auch als monospezifisch bezeichnet werden. Ferner weisen sie auch konstante Domänen auf. Diese tragen zur Stabilität der natürlichen Antikörper bei. Andererseits sind sie auch für unerwünschte Immunreaktionen mitverantwortlich, die entstehen, wenn natürliche Antikörper verschiedener Tierarten wechselseitig verabreicht werden.

[0003] Zur Vermeidung solcher Immunreaktionen werden Antikörper konstruiert, denen die konstanten Domänen fehlen. Insbesondere sind dies Antikörper, die nur noch die variablen Domänen aufweisen. Solche Antikörper werden mit F_V -Antikörper-Konstrukten bezeichnet. Diese liegen häufig in Form einzelkettiger, sich miteinander gepaarter Monomere vor. WO 91/19739 A1 beschreibt ein einzelkettiges F_V -Antikörper-Konstrukt aus zwei F_V -Fragmenten, die durch einen Peptidlinker miteinander verbunden sind. Antineuramidase Einzelketten Antikörper sind beschrieben in Chemical Abstracts 119:157915a und Einzelketten F_V -Antikörper gegen Mykotoxin-Zearalenon sind beschrieben in Chemical Abstracts 126:130370b.

[0004] Es hat sich allerdings gezeigt, daß F_V -Antikörper-Konstrukte nur eine geringe Stabilität aufweisen. Ihre Verwendbarkeit für therapeutische Zwecke ist daher stark eingeschränkt.

[0005] DE 198 16 141 A1 offenbart ein einzelkettiges, mehrfach-antigen bindendes Molekül, mit verschiedenen variablen Domänen einer schweren bzw. leichten Kette eines Immunglobulins, die in Form eines V_H - V_L Konstruktes verbunden sind zur Therapie von Tumoren.

[0006] Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, einen Antikörper bereitzustellen, mit dem unerwünschte Immunreaktionen vermieden werden können. Ferner soll er eine Stabilität aufweisen, die ihn für therapeutische Zwecke einsetzbar macht.

[0007] Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

[0008] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein multivalentes F_V -Antikörper-Konstrukt, das eine große Stabilität aufweist, sowie CD3 und CD19 bindet. Ein solches eignet sich für diagnostische und therapeutische Zwecke.

[0009] Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß die Stabilität eines F_V -Antikörper-Konstruktes erhöht werden kann, wenn dieses in Form eines einzelkettigen Dimeres vorliegt, bei dem die vier variablen Domänen über drei Peptidlinker miteinander verbunden sind. Ferner hat der Anmelder erkannt, daß sich das F_V -Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa 10–30 Aminosäuren aufweist. Des Weiteren hat der Anmelder erkannt, daß sich das F_V -Antikörper-Konstrukt mit anderen F_V -Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa bis zu 10 Aminosäuren aufweist, wodurch ein multimeres, d. h. multivalentes, F_V -Antikörper-Konstrukt erhalten wird. Auch hat der Anmelder erkannt, daß das F_V -Antikörper-Konstrukt multispezifisch sein kann.

[0010] Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein multivalentes F_V -Antikörper-Konstrukt bereitzustellen, das mindestens vier variable Domänen umfaßt, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind.

[0011] Der Ausdruck "F_V-Antikörper-Konstrukt" weist auf einen Antikörper hin, der variable Domänen, nicht aber konstante Domänen aufweist.

[0012] Der Ausdruck "multivalentes F_V -Antikörper-Konstrukt" weist auf einen F_V -Antikörper hin, der mehrere variable Domänen, jedoch mindestens vier aufweist. Solches wird erreicht, wenn sich das einzelkettige F_V -Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet, wodurch vier variable Domänen gegeben sind, oder sich mit anderen einzelkettigen F_V -Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet. In letzterem Fall liegt ein F_V -Antikörper-Konstrukt vor, das 8, 12, 16, etc. variable Domänen aufweist. Günstig ist es, wenn das F_V -Antikörper-Konstrukt vier oder acht variable Domänen aufweist, d. h. es ist bi- oder tetravalent (vgl. Fig. 1). Das Antikörper-Konstrukt erkennt die Proteine CD19 und CD3, d. h. es ist bispezifisch.

[0013] Der Ausdruck "Peptidlinker 1, 3" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines F_V -Antikörper-Konstruktes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Die Peptidlinker 1 und 3 können gleich oder verschieden voneinander sein. Ferner weist der Peptidlinker eine Länge von etwa 0–10 Aminosäuren auf. In ersterem Fall ist der Peptidlinker lediglich eine Peptidbindung aus dem COOH-Rest einer der variablen Domänen und

dem NH₂-Rest einer anderen der variablen Domänen. Vorzugsweise weist der Peptidlinker die Aminosäuresequenz GG auf.

[0014] Der Ausdruck "Peptidlinker 2" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines F_v-Antikörper-Konstruktes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Ferner kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 3–10 Aminosäuren, insbesondere 5 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz GGPGS, aufweisen, wodurch erreicht wird, daß sich das einzelkettige F_v-Antikörper-Konstrukt mit anderen einzelkettigen F_v-Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet. Des Weiteren kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 11–20 Aminosäuren, insbesondere 15–20 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz (G₄S)₄, aufweisen, wodurch erreicht wird, daß sich das einzelkettige F_v-Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet.

[0015] Ein erfindungsgemäßes F_v-Antikörper-Konstrukt kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Günstig ist ein Verfahren, bei dem für die Peptidlinker 1, 2 und 3 kodierende DNAs mit für die vier variablen Domänen eines F_v-Antikörper-Konstruktes kodierenden DNAs ligiert werden derart, daß die Peptidlinker die variablen Domänen miteinander verbinden, und das erhaltene DNA-Molekül in einem Expressionsplasmid exprimiert wird. Es wird auf die Beispiele 1–5 verwiesen. Hinsichtlich der Ausdrücke "F_v-Antikörper-Konstrukt" und "Peptidlinker" wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Ergänzend wird auf Maniatis, T. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1982, verwiesen.

[0016] DNAs, die für ein erfindungsgemäßes F_v-Antikörper-Konstrukt kodieren, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ferner sind Expressionsplasmide, die solche DNAs enthalten, auch Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Bevorzugte Expressionsplasmide sind pDISC3x19-LL, pDISC3x19-SL, pPIC-DISC-LL und pPIC-DISC-SL. Diese wurden bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellen) am 30. April 1998 unter DSM 12150, DSM 12149, DSM 12152 bzw. DSM 12151 hinterlegt.

[0017] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit, umfassend:

- (a) ein erfindungsgemäßes F_v-Antikörper-Konstrukt, und/oder
- (b) ein erfindungsgemäßes Expressionsplasmid, sowie
- (c) übliche Hilfsstoffe, wie Puffer, Lösungsmittel und Kontrollen.

[0018] Von den einzelnen Komponenten können ein oder mehrere Vertreter vorliegen.

[0019] Die vorliegende Erfindung stellt ein multivalentes F_v-Antikörper-Konstrukt bereit, bei dem die variablen Domänen über Peptidlinker miteinander verbunden sind. Ein solches Antikörper-Konstrukt zeichnet sich dadurch aus, daß es keine Teile enthält, die zu unerwünschten Immunreaktionen führen können. Ferner weist es eine große Stabilität auf. Des Weiteren ermöglicht es mehrere Antigene gleichzeitig zu binden. Das erfindungsgemäße F_v-Antikörper-Konstrukt eignet sich daher bestens nicht nur für diagnostische, sondern auch für therapeutische Zwecke verwendet zu werden. Solche Zwecke können hinsichtlich jeder Erkrankung, insbesondere einer viralen, bakteriellen oder Tumor-Erkrankung, gesehen werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

[0020] Fig. 1 zeigt die genetische Organisation eines erfindungsgemäßen F_v-Antikörper-Konstruktes (A) und Schemata zur Bildung eines bivalenten (B) bzw. tetravalenten F_v-Antikörper-Konstruktes (C). Ag: Antigen; His₆: sechs C-terminale Histidinreste; Stop: Stoppcodon (TAA); V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

[0021] Fig. 2 zeigt das Schema zur Konstruktion der Plasmide pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL. c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E1 erkannt wird, His₆: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase (PelB-Leader); rbs: Ribosomenbindungsstelle; Stop: Stoppcodon (TAA); V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

[0022] Fig. 3 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3x19-LL, 6xHis: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; bla: Gen, das für β Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; ColE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG: intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt lac-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid kodiert, das die V_H- und V_L-Domänen verknüpft; Linker 2: Sequenz, die für ein (Gly₄Ser)₄-Polypeptid kodiert, das die hybriden soFv-Fragmente verknüpft; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

[0023] Fig. 4 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3x19-SL. 6xHis: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste codiert; bla: Gen, das für β-paare; c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epi-

top, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CoIE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG; intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt lac-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid codiert, das die V_H - und V_L -Domänen verknüpft; Linker 3; Sequenz, die für ein GlyGlyProGlySer-Oligopeptid codiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L : variable Region der schweren und der leichten Kette.

[0024] Fig. 5 zeigt die Nukleotid- und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDIS3x19-LL kodierten bivalenten F_V -Antikörper-Konstruktes. c-myc-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region; Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His6-Schwanz, Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste codiert; PelB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; RBS: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L : variable Region der schweren und der leichten Kette.

[0025] Fig. 6 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDISC3x19-SL kodierten tetravalenten F_V -Antikörper-Konstruktes. c-myc-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region, Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His6-Schwanz, Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste codiert; PelB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; RBS: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L : variable Region der schweren und der leichten Kette.

[0026] Fig. 7 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für eine α -Faktor-Leadersequenz codiert, und einem Gen, das für das tetravalente F_V -Antikörper-Konstrukt codiert, in dem *Pichia*-Expressionsplasmid pPIC-DISC-SL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des *Saccharomyces cerevisiae*- α -Faktor-Sekretionssignals; V_H : variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

[0027] Fig. 8 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für eine α -Faktor-Leadersequenz codiert, und einem Gen, das für das bivalente F_V -Antikörper-Konstrukt codiert, in dem *Pichia*-Expressionsplasmid pPIC-DISC-LL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des *Saccharomyces cerevisiae*- α -Faktor-Sekretionssignals; V_H : variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

[0028] Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Konstruktion der Plasmide pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F_V -Antikörper-Konstrukten in Bakterien

[0029] Die Plasmide pHOG- α CD19 und pHOG-dmOKT3, welche für die scFv-Fragmente codieren, die von dem Hybridom HD37, das für menschliches CDT9 (Kipriyanov et al., 1996, J. Immunol. Meth. 196, 51–62) spezifisch ist, bzw. von dem Hybridom OKT3, das für menschliches CD3 (Kipriyanov et al., 1997, Protein Eng. 10, 445–453) spezifisch ist, abgeleitet sind, wurde zur Konstruktion von Expressionsplasmiden für ein einzelkettiges F_V -Antikörper-Konstrukt verwendet. Ein PCR-Fragment 1 der V_H -Domäne von Anti-CD19, gefolgt von einem Segment, das für einen GlyGly-Linker codiert, wurde unter Verwendung der Primer DP1, 5'-TCACACAGAATTCTTAGATCTATTAAGAGGAGAAATTAACC, und DP2, 5'-AGCACACGATATCACCGCCAAGCTTGGGTGTTGTTTTGGC, erzeugt (vgl. Fig. 2). Das PCR-Fragment 1 wurde mit EcoRI und EcoRV gespalten und mit dem mit EcoRI/EcoRV linearisierten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor pHOG19-3 erzeugt wurde. Das PCR-Fragment 2 der V_L -Domäne von Anti-CD19, gefolgt von einem Segment, das für ein c-myc-Epitop und einen Hexahistidinylschwanz codiert, wurde unter Verwendung der Primer DP3, 5'-AGCACACAAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTCACCCAACTCCA, und DP4, 5'-AGCACTCTAGAGACACACAGATCTTAGTGATGGTGATGGTGATGTGAGTTTAGG, erzeugt. Das PCR-Fragment 2 wurde mit HindIII und XbaI gespalten und mit dem durch HmdIII/XbaI linearisierten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor pHOG3-19 erhalten wurde (vgl. Fig. 2). Das für das hybride scFv-3-19 codierende Gen in dem Plasmid pHOG3-19 wurde mittels PCR mit den Primern Bi3sk, 5'-CAGCCGGCCATGGCGCAGGTGCAACTGCAGCAG und entweder Li-1, 5'-TATATACTGCAGCTGCACCTGGCTACCACACCACCGGAGCCGCCACCACCGCTACCACCGCCGCGAACCACCACCAGCGGCCG-CAGCATCAGCCCG, zur Erzeugung eines langen flexiblen $(Gly_4Ser)_4$ -inter-scFv-Linkers (PCR-Fragment 3, vgl. Fig. 2) oder Li-2, 5'-TATATACTGCAGCTGCACCTGGCTGGCCACCA-GCGGCCGAGCATCAGCCCG, zur Erzeugung eines kurzen, starren GPGS-Linkers (PCR-Fragment 4, vgl. Fig. 2) amplifiziert. Die Expressionsplasmide pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL wurden durch Ligierung des NcoI/PvuII-Restriktionsfragments aus pHOG 19-3, umfassend das Vektorgerüst und die NcoI/PvuII-gespaltenen PCR-Fragmente 3 bzw. 4 konstruiert (vgl. Fig. 3, Fig. 4). Die vollständige Nu-

kleotid- und Proteinsequenzen der bivalenten bzw. tetravalenten F_V -Antikörper-Konstrukte sind in den **Fig. 5** bzw. **Fig. 6** angegeben.

Beispiel 2: Konstruktion der Plasmide pPIC-DISC-LL und pPIC-DISC-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F_V -Antikörper-Konstrukten in Hefe

(A) Konstruktion von pPIC-DISC-SL

[0030] Der Vektor pPICZ α A (Invitrogen BV, Leek, Niederlande) zur Expression und Sekretion von rekombinanten Proteinen in der Hefe *Pichia pastoris* wurde als Ausgangsmaterial verwendet. Er enthält ein Gen, das für das *Saccharomyces cerevisiae* α -Faktor-Sekretionssignal codiert, gefolgt von einem Polylinker. Die Sekretion dieses Vektors beruht auf dem dominanten selektierbaren Marker, ZeacinTM, der sowohl in *Pichia* als auch in *E. coli* bifunktionell ist. Das Gen, das für das tetravalente F_V -Antikörper-Konstrukt (scDia-SL) codiert, wurde mittels PCR von der Matrize pDISC3x19-SL unter Verwendung der Primer 5'-PIC, 5'-CCGTGAATTCCAGGTGCAACTGCAGCA-GTCTGGGGCTGAAGTGGC, und pSEXbN 5'-GGT-CGACGTTAACCGACAAACAACAGATAAAACG amplifiziert. Das so erhaltene PCR-Produkt wurde mit EcoRI und XbaI gespalten und in mit EcoRI/XbaI linearisiertes pPICZ α A ligiert. Es wurde das Expressionsplasmid pPIC-DISC-SL erhalten. Die Nukleotid- und Proteinsequenzen des tetravalenten F_V -Antikörper-Konstruktes sind in **Fig. 7** gezeigt.

(B) Konstruktion von pPIC-DISC-LL

[0031] Die Konstruktion von pPIC-DISC-LL wurde auf der Grundlage von pPICZ α A (Invitrogen BV, Leek, Niederlande) und pDISC3x19-LL (vgl. **Fig. 3**) durchgeführt. Die Plasmid-DNA pPICZ α A wurde mit EcoRI gespalten. Die überstehenden 5'-Enden wurden unter Verwendung eines Klenow-Fragments der *E. coli*-DNA-Polymerase I aufgefüllt. Die so erhaltene DNA wurde mit XbaI gespalten, und das große Fragment, umfassend den pPIC-Vektor, wurde isoliert. Analog wurde die DNA von pDISC3x19-LL mit NcoI gespalten und mit einem Klenow-Fragment behandelt. Nach der Spaltung mit XbaI wurde ein kleines Fragment, umfassend ein für den bivalenten F_V -Antikörper kodierendes Gen, isoliert. Dessen Ligierung mit einer pPIC-abgeleiteten Vektor-DNA ergab das Plasmid pPIC-DISC-LL. Die Nukleotid- und Proteinsequenz des bivalenten F_V -Antikörper-Konstruktes sind in **Fig. 8** gezeigt.

Beispiel 3: Expression des tetravalenten bzw. bivalenten F_V -Antikörper-Konstruktes in Bakterien

[0032] *E. coli*-XL1-Blue-Zellen (Stratagene, La Jolla, CA), die mit den Expressionsplasmiden pDISC3x19-

LL bzw. pDISC3x19-SL transformiert worden waren, wurden über Nacht in 2xYT-Medium mit 50 μ g/ml Ampicillin und 100 mM Glucose (2xYT_{GA}) bei 37°C gezüchtet. 1:50-Verdünnungen der Übernachtskulturen in 2xYT_{GA} wurden als Kolbenkulturen bei 37°C unter Schütteln mit 200 UpM gezüchtet. Als die Kulturen einen OD₆₀₀-Wert von 0,8 erreicht hatten, wurden die Bakterien durch 10minütige Zentrifugation mit 1500 g bei 20°C pelletiert und in dem gleichen Volumen eines frischen 2xYT-Mediums, das 50 μ g/ml Ampicillin und 0,4 M Saccharose enthielt, resuspendiert. IPTG wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mM zugesetzt, und das Wachstum wurde bei Raumtemperatur (20–22°C) 18–20 h fortgesetzt. Die Zellen wurden durch 10minütige Zentrifugation mit 5000 g bei 4°C geerntet. Der Kulturüberstand wurde zurückgehalten und auf Eis gelagert. Um die löslichen periplasmatischen Proteine zu isolieren, wurden die pelletierten Bakterien in 5% des Anfangsvolumens an eiskalter 50 mM Tris-HCl, 20% Saccharose, 1 mM EDTA, pH 8,0, resuspendiert. Nach einer 1 stündigen Inkubation auf Eis unter gelegentlichem Rühren wurden die Sphäroplasten mit 30.000 g 30 min bei 4°C zentrifugiert, wobei der lösliche periplasmatische Extrakt als Überstand und die Sphäroplasten mit dem unlöslichen periplasmatischen Material als Pellet erhalten wurden. Der Kulturüberstand und der lösliche periplasmatische Extrakt wurden vereinigt. durch weitere Zentrifugation (30.000 g, 4°C, 40 min) geklärt. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammoniumsulfatfällung (Endkonzentration 70% Sättigung) eingengt. Das Proteinpräzipitat wurde durch Zentrifugation (10.000 g, 4°C, 40 min) gewonnen und in 10% des Anfangsvolumens an 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0, aufgelöst. Eine immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) wurde bei 4°C unter Verwendung einer 5 ml Säule an chelatierender Sepharose (Pharmacia), die mit Cu²⁺ beladen war und mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 (Startpuffer) equilibriert worden war, durchgeführt. Die Probe wurde durch ihr Leiten über die Säule aufgeladen. Sie wurde dann mit zwanzig Säulenvolumina Startpuffer, gefolgt von Startpuffer mit 50 mM Imidazol, bis die Absorption bei 280 nm des Effluenten minimal war, gewaschen (etwa dreißig Säulenvolumina). Das absorbierte Material wurde mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,0, eluiert.

[0033] Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Bradford-Farbstoffbindungstest (1976, Anal. Biochem., 72, 248–254) unter Verwendung des Bio-Rad (München, Deutschland)-Proteinassaykits bestimmt. Die Konzentrationen der gereinigten tetravalenten bzw. bivalenten F_V -Antikörper-Konstrukte wurden aus den A₂₈₀-Werten unter Verwendung der Extinktionskoeffizienten $\epsilon^{1 \text{ mg/ml}} = 1,96$ bzw. 1,93 bestimmt.

Beispiel 4: Expression des tetravalenten bzw. bivalenten Antikörper-Konstruktes in der Hefe *Pichia pastoris*

[0034] Kompetente *P. pastoris* GS155-Zellen (in vitro) wurden in Gegenwart von 10 µg Plasmid-DNA von pPIC-DISC-LL bzw. pPIC-DISC-SL, die mit SacI linearisiert worden war, elektroporiert. Die Transformanten wurden 3 Tage bei 30°C auf YPD-Platten, die 100 µg/ml Zeocin™ enthielten, selektiert. Die Klone, die bivalente bzw. tetravalente F_v-Antikörper-Konstrukte sezernierten, wurden durch Platten-screening unter Verwendung eines anti-c-myc-mAk 9E10 (IC Chemikalien, Ismening, Deutschland) selektiert.

[0035] Zur Expression der bivalenten bzw. tetravalenten F_v-Antikörper-Konstrukte wurden die Klone in YPD-Medium in Schüttelkolben 2 Tage bei 30°C unter Rühren gezüchtet. Die Zellen wurden zentrifugiert, in dem gleichen Volumen des Mediums, das Methanol enthielt, resuspendiert und weitere 3 Tage bei 30°C unter Rühren inkubiert. Die Überstände wurden nach der Zentrifugation gewonnen. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammoniumsulfatfällung, gefolgt von IMAC, wie vorstehend beschrieben, isoliert.

Beispiel 5: Charakterisierung des tetravalenten bzw. bivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes

(A) Größenausschlusschromatographie

[0036] Eine analytische Gelfiltration der F_v-Antikörper-Konstrukte wurde in PBS unter Verwendung einer Superdex-200-HR10/30-Säule (Pharmacia) durchgeführt. Das Probenvolumen und die Fließgeschwindigkeit betragen 200 µl/min bzw. 0,5 ml/min. Die Säule wurde mit hoch- und niedermolekularen Gelfiltrations-Kalibrationskits (Pharmacia) kalibriert.

(B) Durchflußzytometrie

[0037] Die menschliche CD3⁺/CD19⁻-akute-T-Zell-Leukämie-Linie Jurkat und die CD19⁺/CD3⁻-B-Zell-Linie JOK-1 wurden für die Durchflußzytometrie verwendet. 5 × 10⁵ Zellen in 50 µl RPMI 1640-Medium (GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland), das mit 10% FCS und 0,1% Natriumazid supplementiert war (als vollständiges Medium bezeichnet), wurden mit 100 µl der F_v-Antikörper-Präparate 45 min auf Eis inkubiert. Nach Waschen mit dem vollständigen Medium wurden die Zellen mit 100 µl 10 µg/ml anti-c-myc-Mak 9E10 (IC Chemikalien) in dem gleichen Puffer 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem zweiten Waschzyklus wurden die Zellen mit 100 µl des FITC-markierten Ziege-anti-Maus-IgG (GIBCO BRL) unter den gleichen Bedingungen wie vorher inkubiert. Die Zellen wurden dann erneut gewaschen und in 100 µl 1 µg/ml-Propidiumiodid-Lösung (Sigma, De-

senhofen, Deutschland) in vollständigem Medium unter Ausschluß von toten Zellen resuspendiert. Die relative Fluoreszenz der gefärbten Zellen wurde unter Verwendung eines FACScan-Durchflußzytometers (Becton Dickinson, Mountain View, CA) gemessen.

(C) Cytotoxizitätstest

[0038] Die CD19-exprimierende Burkitt-Lymphoma-Zelllinie Raji und Namalwa wurden als Zielzellen verwendet. Die Zellen wurden in RPMI 1640 (GIBCO BRL), das mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (GIBCO BRL), 2 mM Glutamin und 1 mM Pyruvat supplementiert war, bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 7,5% CO₂ inkubiert. Die cytotoxischen T-Zell-Tests wurden in RPMI-1640-Medium, das mit 10% FCS, 10 mM HEPES, 2 mM Glutamin, 1 mM Pyruvat und 0,05 mM 2-ME supplementiert war, durchgeführt. Die cytotoxische Aktivität wurde unter Verwendung eines Standard⁵¹Cr]-Freisetzungstests bewertet; 2 × 10⁶ Zielzellen wurden mit 200 µCi Na⁵¹Cr]O₄ (Amersham-Buchler, Braunschweig, Deutschland) markiert und 4mal gewaschen und anschließend in Medium in einer Konzentration von 2 × 10⁵/ml resuspendiert. Die Effektorzellen wurden auf eine Konzentration von 5 × 10⁶/ml eingestellt. Zunehmende Mengen an CTLs in 100 µl wurden auf 10⁴ Zielzellen/Vertiefung in 50 µl titriert. 50 µl Antikörper wurden jeder Vertiefung zugesetzt. Der gesamte Test wurde dreifach angesetzt und 4 h bei 37°C inkubiert. 100 µl des Überstands wurden gewonnen und auf ⁵¹Cr]-Freisetzung in einem gamma-Zähler (Cobra Auto Gamma; Canberra Packard, Dreieich, Deutschland) getestet. Die maximale Freisetzung wurde durch Inkubation der Zielzellen in 10% SDS bestimmt, und die spontane Freisetzung wurde durch Inkubation der Zellen in Medium allein bestimmt. Die spezifische Lyse (%) wurde berechnet als: (experimentelle Freisetzung – spontane Freisetzung)/(–maximale Freisetzung – spontane Freisetzung) × 100.

Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO St. 25. Dieses kann von der amtlichen Veröffentlichungsplattform des DPMA heruntergeladen werden.

Patentansprüche

1. Multivalenter F_v-Antikörper mit mindestens vier variablen Domänen, die über einen Peptidlinker 1, einen mittleren Peptidlinker 2 und einen Peptidlinker 3 miteinander verbunden sind, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Peptidlinker 1 und 3 0–10 Aminosäuren aufweisen und der F_v-Antikörper an ein Antigen aus der Gruppe bestehend aus CD19 und CD3 bindet.

2. F_v-Antikörper nach Anspruch 1, wobei die Peptidlinker 1 und 3 die Aminosäuresequenz GG aufweisen.

3. F_v-Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt bivalent ist.

4. F_v-Antikörper nach Anspruch 3, wobei der mittlere Peptidlinker 2 11–20 Aminosäuren aufweist.

5. F_v-Antikörper nach Anspruch 3 oder 4, wobei der mittlere Peptidlinker 2 die Aminosäuresequenz (G₄S)₄ aufweist.

6. F_v-Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, wobei der F_v-Antikörper tetravalent ist.

7. F_v-Antikörper nach Anspruch 6, wobei der mittlere Peptidlinker 2 3–10 Aminosäuren aufweist.

8. F_v-Antikörper nach Anspruch 6 oder 7, wobei der mittlere Peptidlinker 2 die Aminosäuresequenz GGPGS aufweist.

9. F_v-Antikörper nach einem der Ansprüche 1–8, wobei der F_v-Antikörper bispezifisch ist.

10. F_v-Antikörper nach einem der Ansprüche 1–8, wobei der F_v-Antikörper monospezifisch ist.

11. Verfahren zur Herstellung des multivalenten F_v-Antikörpers- nach einem der Ansprüche 1–10, wobei für den Peptidlinker 1, mittleren Peptidlinker 2 und Peptidlinker 3 kodierende DNAs mit für die vier variablen Domänen eines F_v-Antikörper-Konstruktes kodierenden DNAs ligiert werden derart, daß die Peptidlinker die variablen Domänen miteinander verbinden, und das erhaltene DNA-Molekül in einem Expressionsplasmid exprimiert wird.

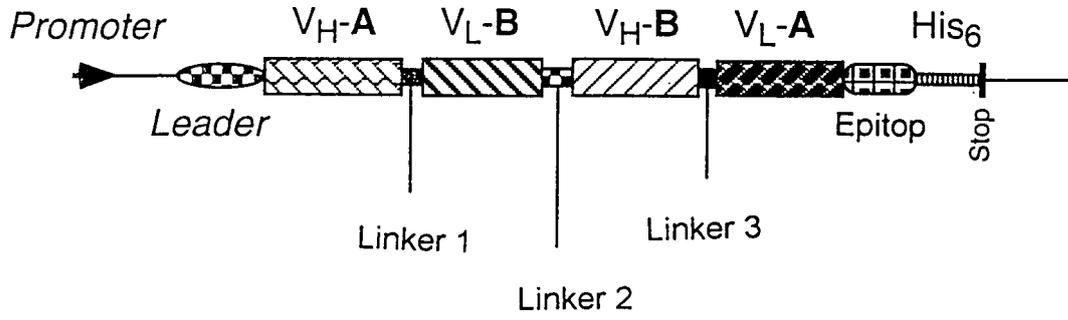
12. Verwendung des multivalenten F_v-Antikörpers- nach einem der Ansprüche 1–10 zur Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen.

13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei die Erkrankungen virale, bakterielle oder Tumor-Erkrankungen sind.

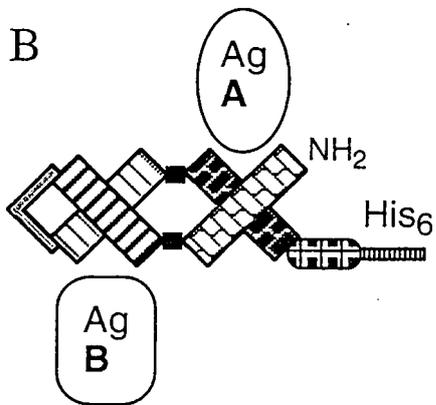
Es folgen 8 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

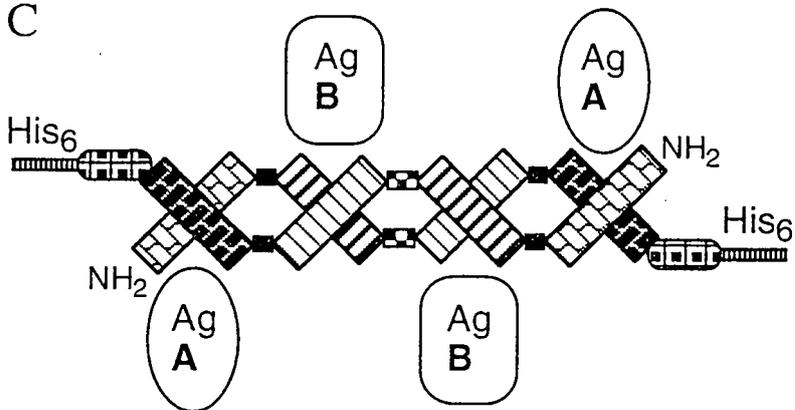
A



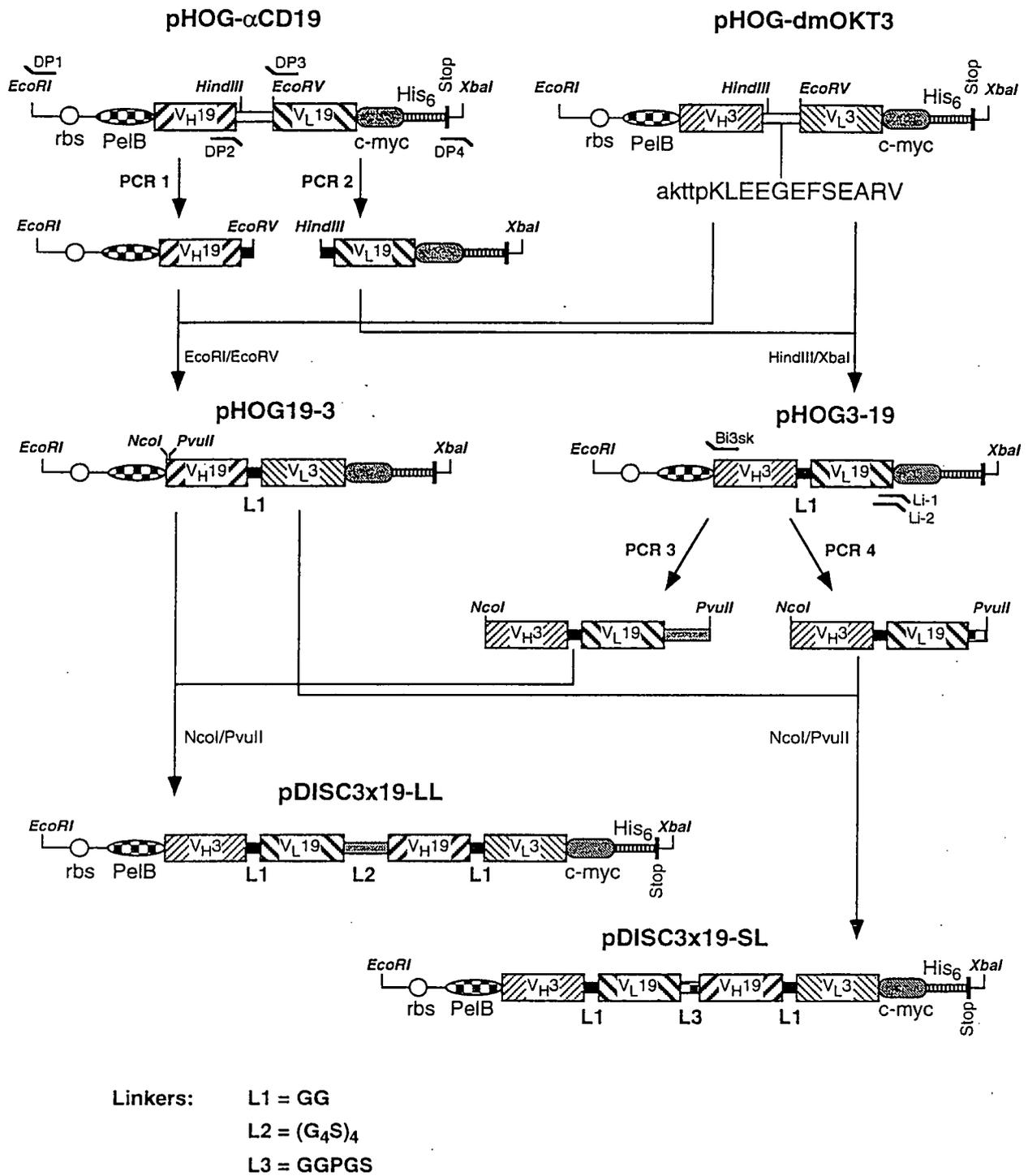
B



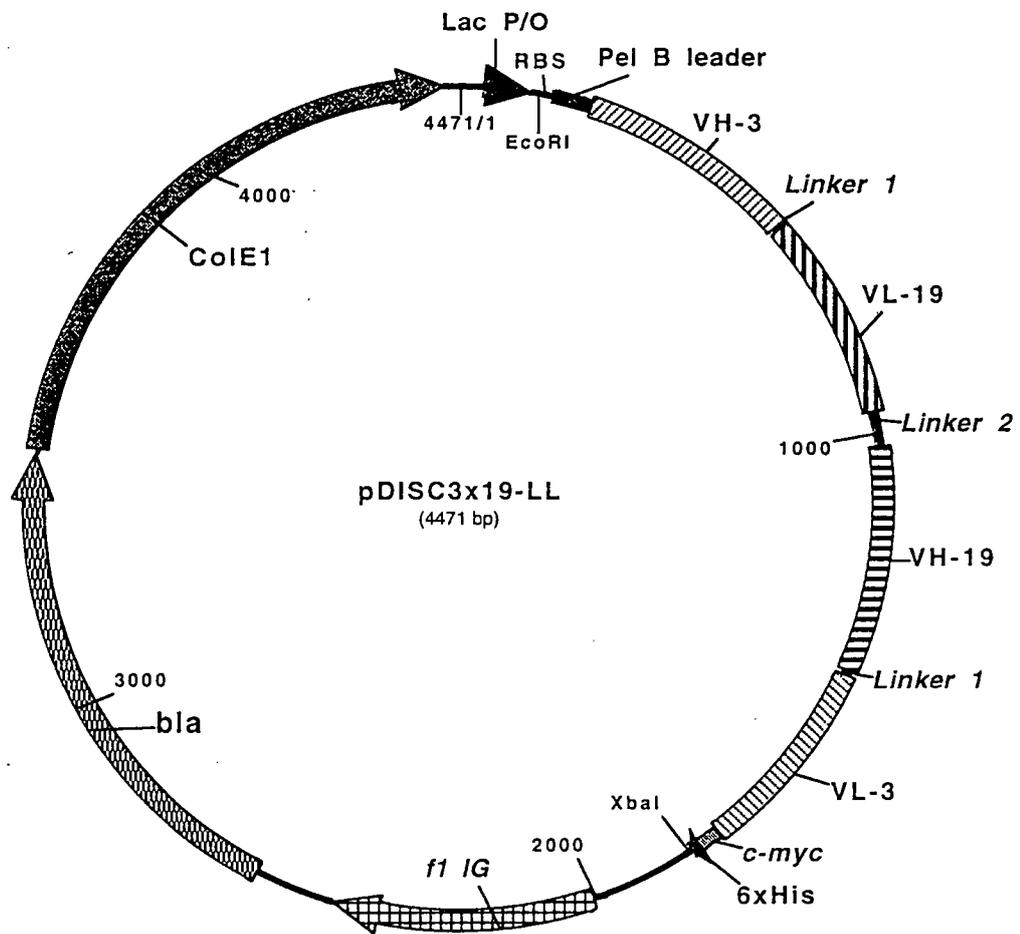
C



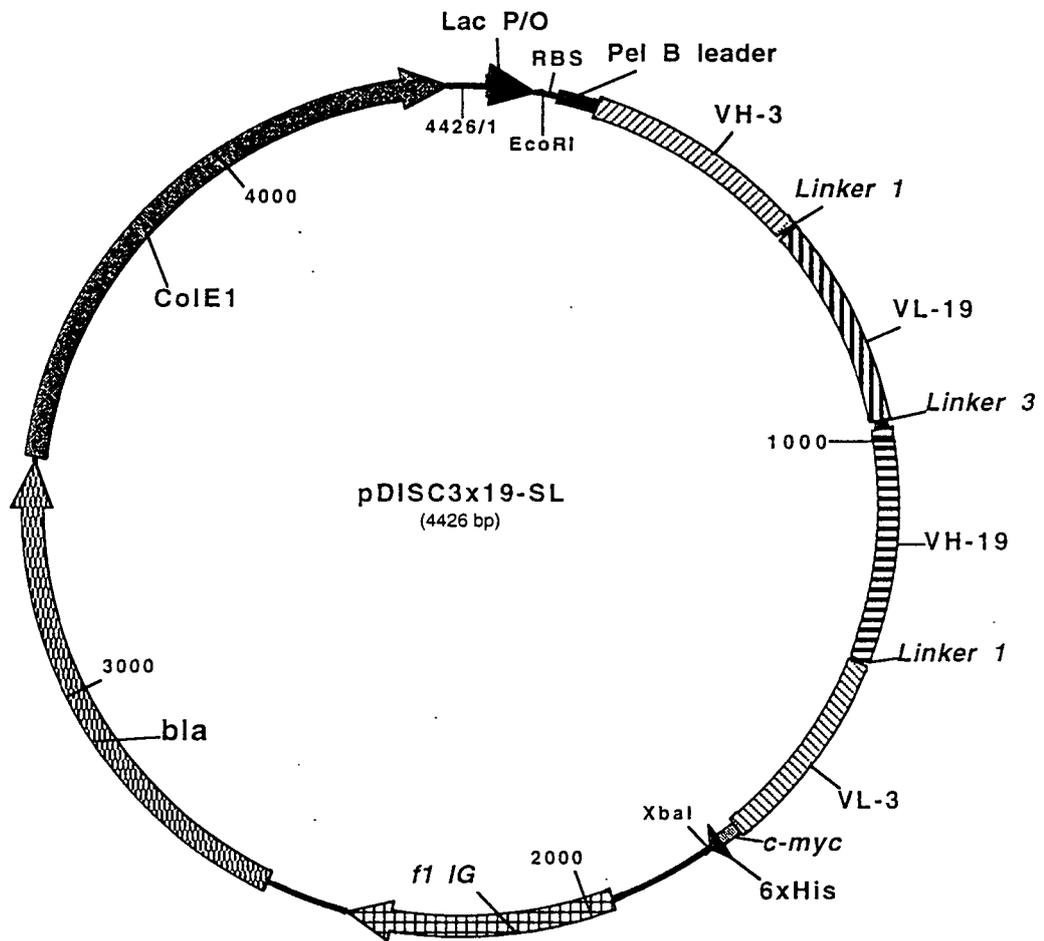
FIGUR 1



FIGUR 2



FIGUR 3



FIGUR 4

EcoRI RBS PelB leader NcoI
 1 GAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAACCATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGCTGCTGCTGGCAGCTCAGCCGGCCATGG
 1 M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A M
 Frame-H1 VH anti-CD3
 92 CGCAGGTGCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCTTGCAGGCTTCTGGCTACACCTTTAC
 22 A Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T
 CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2
 183 TAGGTACACGATGCACTGGGTAAAACAGAGCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGCCGTGGTTATAC
 52 R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T
 Frame-H3
 267 TAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGAC
 80 N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T
 CDR-H3 Frame-H4
 354 ATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACAGCCTTGACTACTGGGCCAAGGCACCCTCTCA
 109 S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y S L D Y W G Q G T T L
 CH1 Linker 1 Frame-L1 VL anti-CD19
 440 CAGTCTCCTCAGCCAAAACACCCCAAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTCACCCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGCTCTAGGGCAGA
 138 T V S S A K T T P K L G G D I L L T Q T P A S L A V S L G Q
 CDR-L1 Frame-L2
 530 GGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTGATTATGATGGTGATAGTTATTTGAACTGGTACCAACAGATTCCAGGAC
 168 R A T I S C K A S Q S V D Y D G D S Y L N W Y Q Q I P G
 CDR-L2 Frame-L3
 614 AGCCACCCAAACTCCTCATCTATGATGCATCCAATCTAGTTTCTGGGATCCCACCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT
 196 Q P P K L L I Y D A S N L V S G I P P R F S G S G S G T D F
 CDR-L3 Frame-L4
 702 CACCCTCAACATCCATCTCTGTGGAGAAGGTGGATGCTGCAACCTATCACTGTGAGCAAGTACTGAGGATCCGTGGACGTTCCGGTGA
 225 T L N I H P V E K V D A A T Y H C Q Q S T E D P W T F G G
 C kappa NotI Linker 2
 790 GGCACCAAGCTGGAATCAAAACGGGCTGATGCTGCGCCCGCTGGTGGTGGTGGTCTGGCGGCGGTGGTAGCGGTGGTGGCGGG
 255 G T K L E I K R A D A A A A G G G G S G G G G S G G G G
 PvuII Frame-H1 VH anti-CD19
 874 TCCGGTGGTGGTGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGCTGAGCTGGTGAGGCTGGGTCCCTCAGTGAAGATTTCCTGCAAGG
 283 S G G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K
 CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2
 962 CTTCTGGCTATGCATTCAGTACTGCTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTGGC
 312 A S G Y A F S S Y W M N W V K Q R P G Q G L E W I G Q I W
 PstI Frame-H3
 1049 CTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAGTTCAAGGGTAAAGCCACTCTGACTGCAGACGAATCCTCCAGCACAGCCTACA
 341 P G D G D T N Y N G K F K G K A T L T A D E S S S T A Y
 CDR-H3
 1133 TGCAACTCAGCAGCCTAGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGACGGGAGACTACGACGGTAGGCCGTTATTACTAT
 369 M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R R E T T T V G R Y Y Y
 Frame-H4 CH1 Linker 1 Frame-L1
 1219 GCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACCAACCCAAGCTTGGCGGTGATATCGTGCTCCTC
 398 A M D Y W G Q G T S V T V S S A K T T P K L G G D I V L T
 VL anti-CD3 CDR-L1
 1307 AGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCAACATGACCTGCAGTGGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGAACTGG
 427 Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S S V S Y M N W
 Frame-L2 CDR-L2 Frame-L3
 1393 TACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAAAAGTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCATTTCAGGGGCA
 456 Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K L A S G V P A H F R G
 CDR-L3
 1481 GTGGGTCGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCGGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAA
 485 S G S G T S Y S L T I S G M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S N
 Frame-L4 C kappa c-myc epitope
 1569 CCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAACCGGGCTGATACACCAACTGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAG
 514 P F T F G S G T K L E I N R A D T A P T G S E Q K L I S
 His6 tail XbaI
 1655 AAGAAGACCTAAACTCACATCACCATCACCATCAATCTAGA
 543 E E D L N S H H H H H H .

FIGUR 5

EcoRI RBS PeIB leader NcoI
 1 GAATTCATTAAGAGGAGAAATTAACCA TGAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGTCTGCTGCTGGCAGCTCAGCCGGCCATGG
 1) M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A M
 Frame-H1 VH anti-CD3
 92 CGCAGGTGCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCTCAGTGAAGATGCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTAC
 22) A Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T
 CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2
 183 TAGGTACACGATGCAC TGGGTAAAACAGAGGCTGGACAGGCTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGCCGTGGTTATAC
 52) R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T
 Frame-H3
 267 FAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGAC
 80) N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T
 CDR-H3 Frame-H4
 354 ATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACAGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCA
 109) S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y S L D Y W G Q G T T L
 CH1 Linker 1 Frame-L1 VL anti-CD19
 440 CAGTCTCCTCAGCCAAAACAACCCCAAGCTTGGGGTGTATATCTTGCTACCCAAAATCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGA
 138) T V S S A K T T P K L G G D I L L T Q T P A S L A V S L G Q
 CDR-L1 Frame-L2
 530 GGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTGATTATGATGGTGTATAGTTATTTGAACTGGTACCAACAGATTCCAGGAC
 168) R A T I S C K A S Q S V D Y D G D S Y L N W Y Q Q I P G
 CDR-L2 Frame-L3
 614 AGCCACCCAAACTCCTCATCTATGATGCATCCAATCTAGTTTCTGGGATCCCACCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT
 196) Q P P K L L I Y D A S N L V S G I P P R F S G S G S G T D F
 CDR-L3 Frame-L4
 702 CACCCTCAACATCCATCTCTGTGGAGAAGGTGGATGCTGCAACCTATCACTGTGAGCAAAAGTACTGAGGATCCGTGGACGTTCCGGTGA
 225) T L N I H P V E K V D A A T Y H C Q Q S T E D P W T F G G
 C kappa NotI Linker 3 PvuII Frame-H1
 790 GGCACCAAGCTGGAATCAAACCGGGCTGATGCTGCGGGCCGCTGGTGGCCAGGGTCCGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCT
 255) G T K L E I K R A D A A A A G G P G S Q V Q L Q Q S G A E L
 VH anti-CD19 CDR-H1 Frame-H2
 879 GGTGAGGCCTGGTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTCAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGC
 284) V R P G S S V K I S C K A S G Y A F S S Y W M N W V K Q R
 CDR-H2
 968 CTGGACAGGCTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTGGCCCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAGTTCAAGGGTAAAGCC
 314) P G Q G L E W I G Q I W P G D G D T N Y N G K F K G K A
 Frame-H3
 1051 ACTCTGACTGCAGACGAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTAGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAC
 342) T L T A D E S S S T A Y M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R
 CDR-H3 Frame-H4 CH1
 1142 GGGAGACTACGACGGTAGGCCGTTATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAA
 372) R E T T T V G R Y Y Y A M D Y W G Q G T S V T V S S A K
 Linker 1 Frame-L1 VL anti-CD3
 1226 CAACACCCCAAGCTTGGCGGTGATATCGTCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGCTGTCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCA
 400) T T P K L G G D I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C
 CDR-L1 Frame-L2 CDR-L2
 1316 GTGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGAACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAGATGGATTTATGACACATCCAA
 430) S A S S S V S Y M N W Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K
 Frame-L3
 1401 ACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTCAGGGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCGGCATGGAGGCTGAAGATGC
 458) L A S G V P A H F R G S G S G T S Y S L T I S G M E A E D A
 CDR-L3 Frame-L4 C kappa
 1491 TGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTCAGCTTCCGCTCGGGGACAAAGTTGAAATAAACCGGGCTGATACTGC
 488) A T Y Y C Q Q W S S N P F T F G S G T K L E I N R A D T A
 c-myc epitope His6 tail XbaI
 1578 ACCAACTGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAACTCAATCACCATCACCATCAC TAATCTAGA
 517) P T G S E Q K L I S E E D L N S H H H H H H .

FIGUR 6

941 **ATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC**
1▶ M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T

alpha-factor signal

1015 AACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATG
25▶ T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D

1089 TTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCT
50▶ V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A

XhoI

EcoRI

1163 GCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTCAGGTGCAACTGCAGCAGTC
75▶ A K E E G V S L E K R E A E A E F Q V Q L Q Q S

VH anti-CD3

1234 TGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT
98▶ G A E L A R P G A S V K M S C K A S

FIGUR 7

941 **ATGAGATTCCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC**
1▶ M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T

alpha-factor signal

1015 AACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATG
25▶ T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D

BsrDI

1089 TTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCT
50▶ V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A

XhoI

EcoRI

1163 GCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTCATGGCGCAGGTGCAACTGCAG
75▶ A K E E G V S L E K R E A E A E F M A Q V Q L Q

VH anti-CD3

1235 CAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT
99▶ Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S

FIGUR 8