



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 33 530 T2 2007.10.31**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 212 422 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 33 530.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/23356**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 959 399.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/014424**

(86) PCT-Anmeldetag: **24.08.2000**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **01.03.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.06.2002**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **21.02.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **31.10.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/13 (2006.01)**

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

150452 P 24.08.1999 US

(73) Patentinhaber:

Medarex Inc., Princeton, N.J., US

(74) Vertreter:

Müller-Boré & Partner, Patentanwälte, European Patent Attorneys, 81671 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

KORMAN, Alan, J., Piedmont, CA 94611, US;

HALK, Edward, L., Sunnyvale, CA 94087, US;

LONBERG, Nils, Woodside, CA 94062, US; KELER,

Tibor P., Ottsville, PA 18942, US; DEO, Yashwant

M., Annadale, NJ 08801, US

(54) Bezeichnung: **HUMANE ANTIKÖRPER GEGEN CTLA-4 UND DEREN VERWENDUNGEN**

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

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

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich im allgemeinen auf molekulare Immunologie und die Behandlung humaner Krankheiten. Insbesondere bezieht sie sich auf neue Humansequenz-Antikörper gegen humanes CTLA-4 und Verfahren zur Behandlung humaner Krankheiten und Infektionen unter Verwendung dieser Antikörper.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Das vertebrale Immunsystem braucht für eine optimale Immunaktivierung mehrere Signale; siehe beispielsweise Janeway, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 54: 1–14 (1989); Paul William E., Hrsg. Raven Press, N. Y., Fundamental Immunology, 4. Auflage (1998), insbesondere Kapitel 12 und 13, Seiten 411 bis 478. Interaktionen zwischen T-Lymphozyten (T-Zellen) und Antigen-präsentierenden Zellen (APC) sind für die Immunantwort essentiell. Die Konzentrationen vieler kohäsiver Moleküle, die auf T-Zellen und APCs zu finden sind, steigen während einer Immunantwort (Springer et al., A. Rev. Immunol. 5: 223–252 (1987); Shaw and Shimuzu, Current Opinion in Immunology, Hrsg. Kindt and Long, 1: 92–97 (1988)); und Hemler, Immunofogy Today 9: 109–113 (1988)). Erhöhte Konzentrationen dieser Moleküle können helfen zu erklären, warum aktivierte APCs die Antigen-spezifische T-Zellproliferation effektiver stimulieren als ruhende APCs (Kaiuchi et al., J. Immunol. 131: 109–114 (1983); Kreiger et al., J. Immunol. 135: 2937–2945 (1985); McKenzie, J. Immunol. 141: 2907–2911 (1988); und Hawrylowicz and Unanue, J. Immunol. 141: 4083–4088 (1988)).

[0003] Die T-Zellen-Immunantwort ist ein komplexes Verfahren, das Zell-Zell-Interaktionen (Springer et al., A. Rev. Immunol. 5: 223–252 (1987)), insbesondere zwischen T- und Nebenzellen wie APCs, und die Produktion löslicher Immunmediatoren (Zytokine oder Lymphokine) umfaßt (Dinarello (1987) New Engl. Jour. Med 317: 940–945; Sallusto (1997) J. Exp. Med. 179: 1109–1118). Diese Antwort wird von mehreren T-Zell-Oberflächenrezeptoren reguliert, einschließlich des T-Zellrezeptorkomplexes (Weiss (1986) Ann. Rev. Immunol. 4: 593–619) und anderen „Neben“-Oberflächenmolekülen (Allison (1994) Curr. Opin. Immunol. 6: 414–419; Springer (1987) oben). Viele dieser Nebenmoleküle sind natürlich vorkommende Zelloberflächendifferenzierungsantigene (CD-Antigene), die durch die Reaktivität monoklonaler Antikörper auf der Oberfläche von Zellen definiert sind (McMichael, Hrsg., Leukocyte Typing III, Oxford Univ. Press, Oxford, N. Y. (1987)).

[0004] Frühere Studien suggerierten, daß die B-Lymphozytenaktivierung zwei Signale benötigt (Bretscher (1970) Science 169: 1042–1049), und nunmehr wird angenommen, daß Lymphozyten zwei Signale für ihre optimale Aktivierung benötigen, ein Antigen-spezifisches oder klonales Signal, sowie ein zweites Antigen-nicht-spezifisches Signal. (Janeway, oben). Freeman (1989) J. Immunol. 143: 2714–2722) isolierte und sequenzierte einen cDNA-Klon, der ein B-Zell-Aktivierungsantigen, das von MAb B7 erkannt wird (Freeman (1987) J. Immunol. 138: 3260). COS-Zellen, die mit dieser cDNA transfiziert wurden, wurden sowohl von markiertem MAb B7 als auch MAb BB-1 gefärbt (Clark (1986) Human Immunol. 16: 100–113; Yokochi (1981) J. Immunol. 128: 823; Freeman et al., (1989) oben; Freeman et al., (1987), oben). Überdies ist die Exprimierung dieses Antigens auf Zellen anderer Linien wie Monozyten festgestellt worden (Freeman et al., oben).

[0005] Die antigene Antwort der T-Helferzellen (Th) benötigt Signale, die von APCs bereitgestellt werden. Das erste Signal wird durch die Interaktion des T-Zell-Rezeptor-Komplexes (Weiss, J. Clin. Invest. 86: 1015 (1990)) mit einem Antigen, präsentiert im Zusammenhang mit Haupthistokompatibilitätskomplexmolekülen (MHC-Molekülen) der Klasse II, auf der APC initiiert (Allen, Immunol. Today 8: 270 (1987)). Dieses Antigen-spezifische Signal reicht zur Erzeugung einer vollständigen Antwort nicht aus, und ohne ein zweites Signal kann es tatsächlich zu einer klonalen Inaktivierung oder Anergie kommen (Schwartz, Science 248: 1349 (1990)). Das Erfordernis eines zweiten „co-stimulierenden“ Signals, geliefert von dem MHC, ist in vielen experimentellen Systemen demonstriert worden (Schwartz, oben; Weaver and Unanue, Immunol. Today 11: 49 (1990)). Das molekulare Wesen dieses zweiten Signals ist nicht vollständig verstanden, obgleich in einigen Fällen klar ist, daß sowohl lösliche Moleküle wie Interleukin (IL)-1 (Weaver and Unanue, oben) als auch Membranrezeptoren, die an der interzellulären Adhäsion (Springer, Nature 346: 425 (1990)) beteiligt sind, co-stimulierende Signale liefern können.

[0006] Das CD28-Antigen, ein homodimeres Glykoprotein der Immunoglobulin-Überfamilie (Aruffo and Seed, Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 8573–8577 (1987)), ist ein Nebenmolekül, das auf den meisten reifen humanen T-Zellen zu finden ist (Damle et al., J. Immunol. 131: 2296–2300 (1983)). Der jüngste Nachweis suggeriert, daß dieses Molekül in einem alternativen T-Zell-Aktivierungsweg, der sich von dem durch den T-Zell-Rezep-

tor-Komplex initiierten unterscheidet, dient (June et al., *Mol. Cell. Biol.* 7: 4472–4481 (1987)). Monoklonale Antikörper (MAbs), die mit dem CD28-Antigen reaktiv sind, können T-Zell-Antworten, initiiert durch verschiedene polyklonale Stimuli, verstärken (zusammengefaßt von June et al., oben). Diese stimulierenden Wirkungen können aus der MAb-induzierten Zytokinproduktion (Thompson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 1333–1337 (1989); und Lindsten et al., *Science* 244: 339–343 (1989)) in Folge einer erhöhten mRNA-Stabilisierung resultieren (Lindsten et al. (1989), oben). Anti-CD28-mAbs können ebenso inhibierende Wirkungen haben, d. h., sie können autologe gemischte Lymphozytenreaktionen (Damle et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 5096–6001(1981)) und die Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellklone blockieren (Lesslauer et al., *Eur. J. Immunol.* 16: 1289–1296 (1986)).

[0007] Einige Studien haben gezeigt, daß das CD28 ein Gegenrezeptor für das B-Zell-Aktivierungsantigen, B7/BB-1, ist (Linsley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5031–5035 (1990)). Das B7/BB-1-Antigen wird nachstehend als „B7-Antigen“ bezeichnet. Die B7-Liganden sind ebenso Mitglieder der Immunoglobulin-Überfamilie, haben jedoch im Gegensatz zu CD28 zwei Ig-Domänen in ihrer extrazellulären Region, eine N-terminale variable (V)-artige Domäne, gefolgt von einer konstanten (C)-artigen Domäne.

[0008] Die Abgabe eines nicht-spezifischen co-stimulierenden Signals an die T-Zelle erfordert mindestens zwei homologe Mitglieder der B7-Familie, die auf APCs, B7-1 (auch B7, B7.1 oder CD80 genannt) und B7-2 (auch B7.2 oder CD86 genannt) zu finden sind, von denen beide co-stimulierende Signale an T-Zellen via CD28 abgeben können. Die Co-Stimulierung durch CD28 fördert die T-Zell-Aktivierung.

[0009] Unter Verwendung genetischer Fusionen der extrazellulären Teile des B7-Antigens und des CD28-Rezeptors und Immunoglobulin (Ig) C.gamma.1 (konstante Schwere-Kette-Region) sind Interaktionen zwischen dem CD28- und B7-Antigen charakterisiert worden (Linsley et al., *J. Exp. Med.* 173: 721–730 (1991)). Ein immobilisiertes B7Ig-Fusionsprotein sowie B7-positive CHO-Zellen co-stimulieren die T-Zellproliferation.

[0010] Die T-Zellstimulierung mit B7-positiven CHO-Zellen stimuliert spezifisch auch erhöhte Konzentrationen von Transkripten für IL-2. Zusätzliche Studien haben gezeigt, daß der Anti-CD28 MAb die IL-2-Produktion, die in bestimmten T-Zell-Leukämie-Zelllinien durch zelluläre Interaktionen mit einer B-Zell-Leukämieinie induziert wird, inhibiert (Kohno et al., *Zelle. Immunol.* 131-1-10 (1990)).

[0011] CD28 hat eine einzelne extrazelluläre variable Region (V)-artige Domäne (Aruffo and Seed, oben). Ein homologes Molekül, CTLA-4, ist durch Differential-Screening einer Maus-zytolytischen-T-Zell-cDNA-Bibliothek identifiziert worden (Brunet (1987) *Nature* 328: 267–270).

[0012] Das CTLA-4 ist ein T-Zelloberflächenmolekül, das ursprünglich durch Differential-Screening einer Maus-zytolytischen T-Zell-cDNA-Bibliothek identifiziert worden ist (Brunet et al., *Nature* 328: 267–270 (1987)). Das CTLA-4 ist auch ein Mitglied der Immunoglobulin-Überfamilie (Ig-Überfamilie); das CTLA-4 umfaßt eine einzelne extrazelluläre Ig-Domäne. CTLA-4-Transkripte sind in T-Zellpopulationen mit zytotoxischer Aktivität gefunden worden, was darauf schließen läßt, daß CTLA-4 an der zytolytischen Antwort beteiligt sein könnte (Brunet et al., oben; Brunet et al., *Immunol. Rev.* 103-21-36 (1988)). Forscher haben über das Klonen und Mapping eines Gens für den humanen Gegenpart von CTLA-4 (Dariavach et al., *Eur. J. Immunol.* 18: 1901–1905 (1988)) an dieselbe chromosomale Region (2q33-34) wie CD28 berichtet (Lafage-Pochitaloff et al., *Immunogenetics* 31: 198–201 (1990)). Ein Sequenzvergleich zwischen dieser humanen CTLA-4-DNA und der, die CD28-Proteine kodiert, deckte eine signifikante Sequenzhomologie mit dem höchsten Grad von Homologie in den Juxtamembran- und Zytoplasmaregionen auf (Brunet et al., 1988, oben; Dariavach et al., 1988, oben).

[0013] Einige Studien ließen darauf schließen, daß CTLA-4 eine analoge Funktion als ein sekundärer Co-Stimulator hat (Linsley et al., *J. Exp. Med.* 176: 1595–1604 (1992); Wu et al., *J. Exp. Med.* 185: 1327–1335 (1997), Linsley, P. et al., US-Patente Nr. 5,977,318; 5,968,510; 5,885,796 und 5,885,579). Andere haben jedoch berichtet, daß CTLA-4 eine gegenteilige Rolle als ein Dämpfer der T-Zell-Aktivierung spielt (Krummel (1995) *J. Exp. Med.* 182: 459–465); Krumme) et al., *Int'l Immunol.* 8: 519–523 (1996); Chambers et al., *Immunity.* 7: 885–895 (1997)). Es ist berichtet worden, daß Mäuse, denen das CTLA-4 fehlt, unter massiver Lymphoproliferation leiden (Chambers et al., oben). Es ist berichtet worden, daß die CTLA-4-Blockade T-Zell-Antworten in vitro (Walunas et al., *Immunity.* 1: 405–413 (1994)) und in vivo (Kearney (1995) *J. Immunol.* 155: 1032–1036) verstärkt, die Antitumorimmunität (Leach (1996) *Science.* 271: 1734–1736) verstärkt und eine induzierte Autoimmunkrankheit (Luhder (1998) *J. Exp. Med.* 187: 427–432) bessert. Es ist ebenso berichtet worden, daß CTLA-4 einen alternativen oder weiteren Einfluß auf den Ursprungscharakter der T-Zell-Immunantwort hat (Chambers (1997) *Curr. Opin. Immunol.* 9: 396–404; Bluestone (1997) *J. Immunol.* 158: 1989–1993; Thompson (1997) *Immunity* 7: 445–450). Dies stimmt mit der Beobachtung überein, daß einige Autoimmunpatienten

Autoantikörper gegen CTLA-4 haben. Es ist möglich, daß CTLA-4 blockierende Antikörper eine pathogene Rolle bei diesen Patienten spielen (Matsui (1999) J. Immunol. 162: 4328–4335).

[0014] In den verschiedenen oben erörterten Studien sind nicht-humane CTLA-4-Antikörper verwendet worden. WO98/42752 offenbart außerdem Maus- und humanisierte Anti-CTLA-4-Antikörper. WO95/33770 beschreibt monoklonale Anti-CTLA-4-Maus-Antikörper und humanisierte und chimäre Formen dieser Mausantikörper. WO96/34096 beschreibt Antikörper, die aus immunisierten „Xenomäusen“ stammen, die zur Expression humaner variabler Antikörperregionen erzeugt werden. CTLA-4 ist als eines von vielen potentiellen Antigenen, gegen die Antikörper erzeugt werden können, angegeben. WO00/37504 wurde am 26. Juni 2000 veröffentlicht und beansprucht das Prioritätsdatum vom 23. Dezember 2005. Es beschreibt Anti-CTLA-4-Antikörper, erzeugt durch Immunisierung einer transgenen Maus, die humane Antikörperantigene exprimiert. WO00/32231 wurde am 8. Juni 2000 veröffentlicht und beansprucht das Prioritätsdatum vom 3. Dezember 1998. Es beschreibt Hamster- und Maus-Antikörper gegen CTLA-4 und Verfahren zur Produktion humanisierter Anti-CTLA-4-Antikörper.

[0015] Eines der Haupthindernisse, vor denen die Entwicklung in vivo therapeutischer und diagnostischer Anwendungen für Antikörper in Menschen steht, ist jedoch die angeborene Immunogenität nicht-humaner Immunoglobuline. Wenn beispielsweise immunkompetenten menschlichen Patienten therapeutische Dosen rodenter monoklonaler Antikörper verabreicht werden, produzieren die Patienten Antikörper gegen die rodenten Immunoglobulinsequenzen; diese humanen Anti-Maus-Antikörper (HAMA) neutralisieren die therapeutischen Antikörper und können akute Toxizität verursachen.

[0016] Diese und andere Mängel bei den vorstehenden Antikörpern werden durch die Bereitstellung humaner Antikörper gegen CTLA-4 mit der vorliegenden Erfindung überwunden.

Zusammenfassung der Erfindung

[0017] Die vorliegende Erfindung liefert einen therapeutisch wirksamen humanen Antikörper oder Antigen-bindenden Teil davon, welcher an CTLA-4 auf der Oberfläche humaner T-Zellen mit einer Bindungsaffinität von etwa 10^8 M⁻¹ oder größer bindet, wobei der Antikörper umfaßt:

- (a) einen variablen Schwere-Ketten-Bereich eines humanen VH 3-30.3 Gens, und
- (b) einen variablen Leichte-Ketten-Bereich eines humanen VK A-27 Gens.

[0018] Andere Aspekte der Erfindung sind in den anhängenden Ansprüchen dargestellt.

[0019] Der therapeutisch wirksame Humansequenz-Antikörper bindet an CTLA-4 auf der Zelloberfläche normaler humaner T-Zellen. Die T-Zellsubpopulationen, markiert durch die CD-Antigene CD4, CD8, CD25 und CD69, können während und nach der Verabreichung des therapeutisch wirksamen Humansequenz-Antikörpers stabil bleiben. Der Humansequenz-Antikörper kann von einem Patienten gut toleriert werden.

[0020] Hierin wird auch eine Zusammensetzung aus polyklonalen Antikörpern, umfassend eine Vielzahl von Humansequenz-Antikörpern, die spezifisch an das humane CTLA-4 binden, offenbart. Die Zusammensetzung aus polyklonalen Antikörpern kann mindestens etwa 2, 5, 10, 50, 100, 500 oder 1000 unterschiedliche Humansequenz-Antikörper, die spezifisch an das humane CTLA-4 binden, umfassen.

[0021] Hierin werden Humansequenz-Antikörper offenbart, die spezifisch an das humane CTLA-4 binden, und die das Binden von humanem CTLA-4 an das humane B7 blockieren oder das Binden von humanem CTLA-4 an das humane B7 nicht blockieren.

[0022] Die Erfindung liefert Humansequenz-Antikörper, die an humanes CTLA-4 mit einer Gleichgewichtsassoziationskonstante (K_a) von mindestens 10^8 M⁻¹ binden. Ebenso werden Humansequenz-Antikörper bereitgestellt, die an humanes CTLA-4 mit einer Gleichgewichtsassoziationskonstante (K_a) von mindestens 10^9 M⁻¹ binden.

[0023] Die Erfindung liefert ebenso Humansequenz-Antikörper, die spezifisch an humanes CTLA-4 binden, die das Binden von humanem CTLA-4 an das humane B7 zu mindestens etwa 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 % oder 100 % blockieren.

[0024] Die Erfindung liefert ebenso Humansequenz-Antikörper, die spezifisch an humanes CTLA-4 mit einer Antikörperschwerkette von IgG oder IgM binden. Die IgG-Antikörperschwerkette kann IgG1, IgG2, IgG3 oder

IgG4 sein. Hierin werden Humansequenz-Antikörper offenbart, in denen die Antikörperleichtkette eine kappa-Leichtkette ist. Ein Humansequenz-Antikörper kann durch humane IgG-Schwerketten- und humane kappa-Leichtketten-Nukleinsäuren, die Nukleotidsequenzen in ihren variablen Bereichen umfassen, wie jeweils in SEQ ID Nr.: 2 bis SEQ ID Nr.: 23 angegeben, kodiert sein.

[0025] Es wird ebenso ein Humansequenz-Antikörper offenbart, wobei der Humansequenz-Antikörper durch humane IgG-Schwerketten- und humane kappa-Leichtketten-Nukleinsäuren kodiert ist, die Nukleotidsequenzen in ihren variablen Bereichen umfassen, wie in SEQ ID Nr.: 16 bzw. SEQ ID Nr.: 6 angegeben.

[0026] Es wird ebenso ein Humansequenz-Antikörper offenbart, wobei der Humansequenz-Antikörper durch humane IgG-Schwerketten- und humane kappa-Leichtketten-Nukleinsäuren kodiert ist, die Nukleotidsequenzen in ihren variablen Bereichen umfassen, wie in SEQ ID Nr.: 18 bzw. SEQ ID Nr.: 8 angegeben.

[0027] Es wird ebenso ein Humansequenz-Antikörper offenbart, wobei der Humansequenz-Antikörper durch humane IgG-Schwerketten- und humane kappa-Leichtketten-Nukleinsäuren kodiert ist, die Nukleotidsequenzen in ihren variablen Bereichen umfassen, wie in SEQ ID Nr.: 22 bzw. SEQ ID Nr.: 12 angegeben.

[0028] Die Erfindung liefert ebenso einen Humansequenz-Antikörper, wobei der Humansequenz-Antikörper durch Aminosäuresequenzen des variablen Schwere-Ketten- und Leichte-Ketten-Bereichs kodiert ist, wie in SEQ ID Nr.: 17 bzw. SEQ ID Nr.: 7 angegeben.

[0029] Die Erfindung liefert ebenso einen Humansequenz-Antikörper, wobei der Humansequenz-Antikörper durch Aminosäuresequenzen des variablen Schwere-Ketten- und Leichte-Ketten-Bereichs kodiert ist, wie in SEQ ID Nr.: 19 bzw. SEQ ID Nr.: 9 angegeben.

[0030] Es wird ebenso ein Humansequenz-Antikörper offenbart, wobei der Humansequenz-Antikörper durch Aminosäuresequenzen des variablen Schwere-Ketten- und Leichte-Ketten-Bereichs kodiert ist, wie in SEQ ID Nr.: 23 bzw. SEQ ID Nr.: 13 angegeben.

[0031] Es wird ebenso ein Humansequenz-Antikörper offenbart, wobei der Humansequenz-Antikörper durch humane IgG-Schwerketten- und humane kappa-Leichtketten-Nukleinsäuren kodiert ist, die variable Schwerketten- und Leichtkettensequenzen aus den V-Gensegmenten VH 3-30.3 bzw. VK A-27 umfassen.

[0032] Es wird ebenso ein Humansequenz-Antikörper offenbart, wobei der Humansequenz-Antikörper durch humane IgG-Schwerketten- und humane kappa-Leichtketten-Nukleinsäuren kodiert ist, die variable Schwerketten- und Leichtkettensequenzen aus den V-Gensegmenten VH 3-33 bzw. VK L-15 umfassen.

[0033] Einige Humansequenz-Antikörper der Erfindung umfassen Schwerketten-CDR1-, -CDR2- und -CDR3-Sequenzen, SYTMH (SEQ ID Nr.: 27), FISYDGNNKYYADSVKG (SEQ ID Nr.: 32) bzw. TGWLGPFDY (SEQ ID Nr.: 37), und Leichtketten-CDR1-, -CDR2- und -CDR3-Sequenzen, RASQSVGSSYLA (SEQ ID Nr.: 24), GAFSRAT (SEQ ID Nr.: 29) bzw. QQYGSSPWT (SEQ ID Nr.: 35).

[0034] Einige Humansequenz-Antikörper der Erfindung umfassen Schwerketten-CDR1-, -CDR2- und -CDR3-Sequenzen, SYTMH (SEQ ID Nr.: 27), FISYDGSNKHYADSVKG (SEQ ID Nr.: 33) bzw. TGWLGPFDY (SEQ ID Nr.: 38), und Leichtketten-CDR1-, -CDR2- und -CDR3-Sequenzen, RASQSVSSFLA (SEQ ID Nr.: 25), GASSRAT (SEQ ID Nr.: 30) bzw. QQYGSSPWT (SEQ ID Nr.: 35).

[0035] Andere hierin offenbarte Humansequenz-Antikörper umfassen Schwerketten-CDR1-, -CDR2- und -CDR3-Sequenzen, SYGMH (SEQ ID Nr.: 28), VIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID Nr.: 34) bzw. APNYIGAFDV (SEQ ID Nr.: 39), und Leichtketten-CDR1-, -CDR2- und -CDR3-Sequenzen, RASQGISSWLA (SEQ ID Nr.: 26), AASSLQS (SEQ ID Nr.: 31) bzw. QQYNSYPPT (SEQ ID Nr.: 36).

[0036] Hierin werden ebenso Humansequenz-Antikörper offenbart, die spezifisch an humanes CTLA-4 binden, wobei der Humansequenz-Antikörper von einem transgenen nicht-humanen Lebewesen produziert wird. Das transgene nicht-humane Lebewesen kann eine Maus sein.

[0037] Hierin wird ebenso ein Humansequenz-Antikörper offenbart, der spezifisch an humanes CTLA-4 bindet und ein Fab-Fragment ist.

[0038] Es wird ebenso ein mehrwertiger Komplex offenbart, der mindestens zwei Humansequenz-Antikörper

umfaßt, von denen jeder spezifisch an humanes CTLA-4 bindet. Die zwei unterschiedlichen Antikörper können kovalent oder nicht-kovalent miteinander verknüpft werden.

[0039] Es wird ebenso eine Nukleinsäure, die eine schwere Kette eines Humansequenz-Antikörpers kodiert, offenbart. Die Nukleinsäure kann eine Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID Nr.: 1 angegeben, umfassen.

[0040] Es wird ebenso ein transgenes nicht-humanes Lebewesen mit einem Genom, umfassend ein Humansequenz-Schwerketten-Transgen und ein Humansequenz-Leichtketten-Transgen, offenbart, wobei das Lebewesen mit einem humanen CTLA-4, oder einem Fragment oder einem Analogon davon, immunisiert worden ist, wobei das Lebewesen Humansequenz-Antikörper gegen das humane CTLA-4 exprimiert. Das transgene nicht-humane Lebewesen kann eine transgene Maus sein. Die transgene Maus kann HCo7 oder HCo12 umfassen.

[0041] Es wird ebenso eine Hybridomzelllinie, umfassend eine B-Zelle, die aus einem transgenen nicht-humanen Lebewesen mit einem Genom, umfassend ein Humansequenz-Schwerketten-Transgen und ein Humansequenz-Leichtketten-Transgen, erhalten wurde, offenbart, wodurch das Hybridom einen Humansequenz-Antikörper produziert, der spezifisch an humanes CTLA-4 bindet. Das Hybridom kann einen Humansequenz-Antikörper, der spezifisch humanes CTLA-4 oder ein bindendes Fragment davon bindet, sekretieren, wobei der Antikörper aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus: einem Humansequenz-Antikörper, umfassend Schwerketten-CDR1-, -CDR2- und -CDR3-Sequenzen, SYTMH (SEQ ID Nr.: 27), FISYDGNKYYADSVKG (SEQ ID Nr.: 32) bzw. TGWLGPFDY (SEQ ID Nr.: 37), und Leichtketten-CDR1-, -CDR2- und -CDR3-Sequenzen, RASQSVGSSYLA (SEQ ID Nr.: 24), GAFSRAT (SEQ ID Nr.: 29) bzw. QQYGSSPWT (SEQ ID Nr.: 35) und Aminosäuresequenzen des variablen Schwere-Kette- und Leichte-Kette-Bereichs, wie in SEQ ID Nr.: 17 bzw. SEQ ID Nr.: 7 angegeben; einem Humansequenz-Antikörper, umfassend Schwerketten-CDR1-, -CDR2- und -CDR3-Sequenzen, SYTMH (SEQ ID Nr.: 27), FISYDGSNKHYADSVKG (SEQ ID Nr.: 33) bzw. TGWLGPFDY (SEQ ID Nr.: 38) und Leichtketten-CDR1-, -CDR2- und -CDR3-Sequenzen, RASQSVSSSFLA (SEQ ID Nr.: 25), GASSRAT (SEQ ID Nr.: 30) bzw. QQYGSSPWT (SEQ ID Nr.: 35) und Aminosäuresequenzen des variablen Schwere-Kette- und Leichte-Kette-Bereichs, wie in SEQ ID Nr.: 19 bzw. SEQ ID Nr.: 9 angegeben; oder einem Humansequenz-Antikörper nach Anspruch 1, umfassend Schwerketten-CDR1-, -CDR2- und -CDR3-Sequenzen, SYGMH (SEQ ID Nr.: 28), VIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID Nr.: 34) bzw. APNYIGAFDV (SEQ ID Nr.: 39), und Leichtketten-CDR1-, -CDR2- und -CDR3-Sequenzen, RASQGISSWLA (SEQ ID Nr.: 26), AASSLQS (SEQ ID Nr.: 31) bzw. QQYNSYPPT (SEQ IDNO: 36) und Aminosäuresequenzen des variablen Schwere-Kette- und Leichte-Kette-Bereichs, wie in SEQ ID Nr.: 23 bzw. SEQ ID Nr.: 13 angegeben.

[0042] Die Erfindung liefert ebenso eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend einen Antikörper der Erfindung und einen pharmazeutisch verträglichen Träger. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann ferner ein Mittel, das wirksam eine Immunantwort gegen ein Targetantigen induziert, umfassen. Zudem werden chemotherapeutische Mittel bereitgestellt. Überdies werden Antikörper gegen immunosuppressive Moleküle offenbart.

[0043] Die Erfindung liefert die Verwendung eines Antikörpers der Erfindung zur Herstellung eines Medikaments zum Induzieren, Steigern oder Verlängern einer Immunantwort auf ein Antigen in einem Patienten. Das Medikament kann eine wirksame Dosis eines Humansequenz-Antikörpers, der spezifisch an humanes CTLA-4 bindet, umfassen, wobei der Antikörper das Binden von humanem CTLA-4 an humanes B7 blockiert. Das Antigen kann ein Tumor-Antigen sein, oder das Antigen kann aus einem Krankheitserreger stammen. Das Tumor-Antigen kann ebenso eine Telomerase sein. Der Krankheitserreger kann ein Virus, ein Bakterium, ein Pilz oder ein Parasit sein. Der Krankheitserreger kann ebenso HIV sein. Das Medikament kann ferner das Antigen oder ein Fragment oder ein Analogon davon umfassen, wobei das Antigen in Kombination mit dem Humansequenz-Antikörper die Immunantwort induziert, steigert oder verlängert. Das Antigen kann ein Tumor-Antigen oder eine Komponente der Amyloidbildung in dem Patienten, wie einem Patienten, der an der Alzheimer-Krankheit leidet, sein, und das Antigen ist ein A β -Peptid. Das Medikament kann ferner ein Zytokin umfassen.

[0044] Hierin wird ebenso ein Verfahren zur Unterdrückung einer Immunantwort in einem Patienten offenbart, umfassend die Verabreichung einer wirksamen Dosis eines mehrwertigen Präparats, umfassend mindestens zwei Humansequenz-Antikörper gegen humanes CTLA-4, die miteinander verknüpft sind, an einen Patienten. Hierin wird ebenso ein Verfahren zur Unterdrückung einer Immunantwort in einem Patienten offenbart, umfassend die Verabreichung einer wirksamen Dosis eines polyklonalen Präparats, umfassend mindestens zwei Humansequenz-Antikörper gegen humanes CTLA-4, an einen Patienten.

[0045] Hierin werden ebenso isolierte oder rekombinante Humansequenz-Antikörper und humane monoklonale Antikörper, die spezifisch an humanes CTLA-4 binden, sowie Zusammensetzungen, die einen oder eine Kombination aus solchen Antikörpern enthalten, offenbart. Die Humansequenz-Antikörper der Erfindung sind durch das Binden an humanes CTLA-4 mit hoher Affinität und in einigen Ausführungsformen durch das Blockieren der Interaktion von humanem CTLA-4 mit seinem Liganden, den humanen B7-1- und B7-2-Molekülen, charakterisiert. Demgemäß können der Humansequenz-Antikörper und die humanen monoklonalen Antikörper der Erfindung als diagnostische oder therapeutische Mittel in vivo und in vitro verwendet werden.

[0046] Die Humansequenz-Antikörper der Erfindung können verschiedene Antikörperisotypen oder Gemische davon umfassen, wie IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD und IgE. Typischerweise umfassen sie IgG1- (z. B. IgG1k) und IgM-Isotypen. Die Humansequenz-Antikörper können von voller Länge sein (z. B. ein IgG1- oder IgG4-Antikörper) oder können nur einen Antigen-bindenden Teil (z. B. ein Fab-, F(ab')₂-, Fv- oder ein Einzelketten-Fv-Fragment) umfassen. Einige Humansequenz-Antikörper sind rekombinante Humansequenz-Antikörper. Einige Humansequenz-Antikörper werden von einem Hybridom, das eine B-Zelle, erhalten aus einem transgenen nicht-humanen Lebewesen, z. B. einer transgenen Maus, mit einem Genom, das ein humanes Schwerekettentransgen und ein humanes Leichtkettentransgen umfaßt, erzeugt werden. Das Hybridom kann beispielsweise durch die Fusion der B-Zelle an eine sich unbegrenzt vermehrende Zelle erzeugt werden. Einige der hierin offenbarten Humansequenz-Antikörper werden von Hybridomen erzeugt, die als 4C8, 4E10, 4E10.5, 5A8, 5C4, 5C4.1.3, 5D7, 5D7.1, 5E10, 5E10.12, 5G1, 5G1.4, 6A10, 6C9, 6C9.6, 6D9, 6D9.7, 6G4, 7E4, 7E4.4, 7E8, 7H8, 8E8, 8E8.4, 8F8, 8F8.19, 8H1, 9810, 9A10.1, 9B9, 9C1, 9G5, 105B, 10B5.8, 10B9, 10B9.2, 10D1, 10D1.3, 10E11, 10E4, 10E4.5, 11B4, 11D10, 11E4, 11E4.1, 11E8, 11F10, 11F11, 11F9, 11G1, 11G1.5, 1C7, 1H8.8, 2A7, 2A7.6, 2E2, 2E2.7, 2E7, 2E7.2, 2G1, 2G1.2, 3C12, 3E10, 3E10.5, 3E6, 3E6.0, 3F10, 4A1, 4B6 und 4B6.12. Anhänge nach dem Dezimalpunkt zeigen unterschiedliche klonale Isolate derselben Hybridomzelllinie an.

[0047] Einige der hierin offenbarten Humansequenz-Anti-CTLA-4-Antikörper können durch eine oder mehrere der folgenden Eigenschaften gekennzeichnet sein: a) Spezifität für humanes CTLA-4 (spezifisches Binden an humanes CTLA-4); b) eine Bindungsaffinität zu humanem CTLA-4 mit einer Gleichgewichtsassoziationskonstante (K_a) von mindestens etwa 10^7 M^{-1} oder etwa 10^9 M^{-1} oder etwa 10^{10} M^{-1} bis 10^{11} M^{-1} oder höher; c) eine kinetische Assoziationskonstante (k_a) von mindestens etwa 10^3 , etwa 10^4 oder etwa $10^5 \text{ m}^{-1}\text{s}^{-1}$ und/oder d) eine kinetische Dissoziationskonstante (k_d) von mindestens etwa 10^3 , etwa 10^4 oder etwa $10^5 \text{ m}^{-1}\text{s}^{-1}$.

[0048] In einem anderen Aspekt liefert die Erfindung Nukleinsäuremoleküle, die die Humansequenz-Antikörper, oder Antigen-bindende Teile, der Erfindung kodieren. Demgemäß werden rekombinante Expressionsvektoren, die die Antikörper-kodierenden Nukleinsäuren der Erfindung und Wirts-T-Zellen, die mit solchen Vektoren transfiziert sind, ebenfalls von der Erfindung erfaßt wie Verfahren zur Erzeugung der Antikörper der Erfindung durch das Kultivieren dieser Wirts-T-Zellen.

[0049] Hierin werden ebenso isolierte B-Zellen aus einem transgenen nicht-humanen Lebewesen, z. B. einer transgenen Maus, offenbart, die verschiedene Isotypen (z. B. IgG, IgA und/oder IgM) humaner monoklonaler Antikörper, die spezifisch an humanes CTLA-4 binden, exprimieren können. Die isolierten B-Zellen können aus einem transgenen nicht-humanen Lebewesen, z. B. einer transgenen Maus, die mit einem gereinigten oder angereicherten Präparat aus humanem CTLA-4-Antigen (oder Antigenfragment davon) und/oder Zellen, die humanes CTLA-4 exprimieren, immunisiert wurde, erhalten werden. Das transgene nicht-humane Lebewesen, z. B. eine transgene Maus, kann ein Genom, umfassend ein humanes Schwerekettentransgen und ein humanes Leichtkettentransgen, aufweisen. Die isolierten B-Zellen können sich unbegrenzt vermehrende sein, um so eine Quelle (z. B. ein Hybridom) für humane monoklonale Antikörper gegen humanes CTLA-4 bereitzustellen.

[0050] Demgemäß wird hierin ein Hybridom offenbart, das humane monoklonale Antikörper, die spezifisch an humanes CTLA-4 binden, erzeugen kann. Das Hybridom kann eine B-Zelle, erhalten aus einem transgenen nicht-humanen Lebewesen, z. B. einer transgenen Maus, mit einem Genom, umfassend ein humanes Schwerekettentransgen und ein humanes Leichtkettentransgen, fusioniert an eine sich unbegrenzt vermehrende Zelle, umfassen. Das transgene nicht-humane Lebewesen kann mit einem gereinigten oder angereicherten Präparat aus humanem CTLA-4-Antigen und/oder Zellen, die humanes CTLA-4 exprimieren, immunisiert werden, um so Antikörperproduzierende Hybridome zu erzeugen.

[0051] Hierin wird ebenso ein transgenes nicht-humane Lebewesen, wie eine transgene Maus, offenbart, die humane monoklonale Antikörper (hierin auch als eine „HuMAb-Maus“TM bezeichnet), die spezifisch an humanes CTLA-4 binden, exprimiert. Das transgene nicht-humane Lebewesen kann eine transgene Maus mit einem Genom, das ein humanes Schwerekettentransgen und ein humanes Leichtkettentransgen umfaßt, sein. Das

transgene nicht-humane Lebewesen kann mit einem gereinigten oder angereicherten Präparat aus CTLA-4-Antigen (oder einem Antigenfragment davon) und/oder Zellen, die das humane CTLA-4 exprimieren, immunisiert werden. Das transgene nicht-humane Lebewesen, z. B. die transgene Maus, kann mehrere Isotypen humaner monoklonaler Antikörper gegen humanes CTLA-4 (z. B. IgG, IgA und/oder IgM) produzieren, indem es einer V-D-J-Rekombination und einem Isotypwechsel unterzogen wird. Der Isotypwechsel kann beispielsweise durch klassischen oder nicht-klassischen Isotypwechsel stattfinden.

[0052] Hierin werden ebenso Verfahren zur Produktion von Humansequenz-Antikörpern und monoklonalen Humansequenz-Antikörpern, die spezifisch mit humanem CTLA-4 reagieren, offenbart. Einige Verfahren umfassen die Immunisierung eines transgenen nicht-humanen Lebewesens, z. B. einer transgenen Maus, mit einem Genom, das ein humanes Schwerekettentransgen und ein humanes Leichtkettentransgen umfaßt, mit einem gereinigten oder angereicherten Präparat aus humanem CTLA-4-Antigen und/oder Zellen, die humanes CTLA-4 exprimieren. B-Zellen (z. B. Milz-B-Zellen) des Lebewesens können dann erhalten und mit Myelomzellen fusioniert werden, um unsterbliche Hybridomzellen zu bilden, die humane monoklonale Antikörper gegen humanes CTLA-4 sekretieren.

[0053] Die Anti-humanen-CTLA-4-humanen monoklonalen Antikörper der Erfindung oder Antigen-bindende Teile davon (z. B. Fab) können derivatisiert oder an ein anderes funktionales Molekül, z. B. ein anderes Peptid oder Protein (z. B. ein Fab'-Fragment), geknüpft werden. Beispielsweise kann ein Antikörper oder ein Antigen-bindender Teil der Erfindung funktional (z. B. durch chemische Kopplung, genetische Fusion, nicht-kovalente Assoziation oder anderweitig) an eines oder mehrere andere molekulare Gebilde geknüpft werden. Zum Beispiel kann der Humansequenz-Anti-CTLA-4-Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment davon an eine therapeutische Einheit, z. B. ein zytotoxisches Arzneimittel, ein enzymatisch aktives Toxin oder ein Fragment davon, ein Radioisotop oder ein niedermolekulares Antikrebsarzneimittel, konjugiert werden. Die Antikörper der Erfindung können auch an zytotoxische Pharmazeutika, z. B., radioaktiv markiert mit einem zytotoxischen Mittel wie beispielsweise ¹³¹I (z. B. Shen (1997) *Cancer* 80 (12 Suppl): 2553–2557), Kupfer-67 (z. B. Deshpande (1988) *J. Nucl. Med.* 29: 217–225) konjugiert werden, oder z. B. Konjugation an das Ribosom-aktivierende Protein Gelonin (z. B. Boyle (1996) *J. of Immunol.* 18: 221–230).

[0054] In einem anderen Aspekt liefert die vorliegende Erfindung Zusammensetzungen, z. B. pharmazeutische und diagnostische Zusammensetzungen, umfassend einen pharmazeutisch verträglichen Träger und mindestens einen humanen monoklonalen Antikörper der Erfindung oder einen Antigen-bindenden Teil davon, der spezifisch an humanes CTLA-4 bindet. Die Zusammensetzungen können eine Kombination aus dem Humansequenz-Antikörper oder Antigen-bindenden Teilen davon, von denen bevorzugt jeder an ein anderes Epitop bindet, umfassen. Zusammensetzungen, z. B. pharmazeutische Zusammensetzungen, die eine Kombination aus mindestens einem Humansequenz-Antikörper oder mindestens einem humanen monoklonalen Antikörper der Erfindung oder Antigen-bindende Teile davon, und mindestens ein bispezifisches oder multispezifisches Molekül der Erfindung umfassen, werden hierin ebenso offenbart.

[0055] Für In-vivo-Verfahren kann der Antikörper oder ein Antigen-bindender Teil davon (oder ein bispezifisches oder multispezifisches Molekül) einem humanen Individuum, das an einer T-Zell-bezogenen Krankheit oder einer Krankheit, die durch die Steigerung oder Unterdrückung oder Verlängerung einer Immunantwort gelindert oder verhindert werden kann, verabreicht werden.

[0056] Die Zusammensetzungen aus monoklonalem Humansequenz-Antikörper und Humansequenz-Antikörper können auch in Kombination mit anderen Therapien, z. B. einer Antikrebstherapie, verabreicht werden. Demgemäß wird ebenso ein Verfahren zur Behandlung von Krebs bei einem Individuum offenbart, umfassend die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge einer pharmazeutischen Zusammensetzung aus einem Humansequenz-Antikörper zusammen mit einem pharmazeutischen Träger an das Individuum. Einige dieser Verfahren umfassen einen Impfstoff. Einige dieser Impfstoffe umfassen einen Tumorzellimpfstoff, einen GM-CSF-modifizierten Tumorzellimpfstoff oder einen Antigen-beladenen dendritischen Zellimpfstoff. In einigen dieser Verfahren ist der Krebs Prostatakrebs, ein Melanom oder Epithelkarzinom.

[0057] Humansequenz-Antikörper gegen humanes CTLA-4 können in Behandlungsverfahren, die entweder die Stimulierung von Immunantworten oder deren Unterdrückung erfordern, verwendet werden. Die erste Indikation wird unter Verwendung von Antikörpern, die das Binden von humanem CTLA-4 an humanes B7 blockieren, behandelt. Krankheiten, die durch die Stimulierung, Steigerung oder Verlängerung von Immunantworten behandelt werden können, umfassen Krebs, einschließlich Prostata-, Nieren- oder Darm-Krebsarten, pathogene Infektionen, Krankheiten, die mit Autoantigenen assoziiert sind, z. B. Amyloidosen, einschließlich der Alzheimer-Krankheit, und Krankheiten mit entzündlichen und allergischen Komponenten. Immunosuppression

wird unter Verwendung mehrwertiger Präparate, umfassend mindestens zwei unterschiedliche Antikörper gegen humanes CTLA-4, die miteinander verknüpft sind, erreicht. Krankheiten, die behandelt werden können, umfassen die Graft-versus-host-Krankheit, die Host-versus-graft-Krankheit, Autoimmunkrankheiten und Entzündungen.

[0058] Die Antikörper der Erfindung können zur In-vitro- oder In-vivo-Detektion eines humanen CTLA-4-Antigens in einer Probe, z. B. zur Diagnose einer humanen CTLA-4-bezogenen Krankheit, verwendet werden. In einigen Verfahren wird dies durch das Kontaktieren einer zu testenden Probe zusammen mit einer Kontrollprobe mit einem Humansequenz-Antikörper oder einem humanen monoklonalen Antikörper der Erfindung oder einem Antigen-bindenden Teil davon (oder einem bispezifischen oder multispezifischen Molekül) unter Bedingungen, die die Bildung eines Komplexes zwischen dem Antikörper und humanem CTLA-4 ermöglichen, erreicht. Die Komplexbildung wird dann (z. B. unter Verwendung eines ELISA) in beiden Proben detektiert, und ein statistisch signifikanter Unterschied bei der Bildung von Komplexen zwischen den Proben ist kennzeichnend für die Gegenwart eines humanen CTLA-4-Antigens in der Testprobe.

[0059] Ein weiteres Verständnis des Wesens und der Vorteile der vorliegenden Erfindung kann anhand der verbleibenden Teile der Beschreibung, der Figuren und der Ansprüche erlangt werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0060] Die Figuren, die sich nicht speziell auf die beanspruchte Erfindung beziehen, sind nur zur Veranschaulichung enthalten.

[0061] **Fig. 1** zeigt eine schematische Darstellung, die die angestrebte Insertion einer Neokassette in die Smal-Stelle des $\mu 1$ -Exons veranschaulicht. **Fig. 1A)** Schematische Darstellung der genomischen Struktur des μ -Lokus. Die ausgefüllten Kästchen stellen die μ -Exons dar; **Fig. 1B)** Schematische Darstellung des CmD-Targetingvektors. Die gepunkteten Linien kennzeichnen die genomischen μ -Sequenzen, die in dem Konstrukt enthalten sind. Plasmidsequenzen sind nicht gezeigt; **Fig. 1C)** Schematische Darstellung des angestrebten μ -Lokus, in den die Neokassette in $\mu 1$ inseriert worden ist. Der Kasten an der unteren rechten Seite zeigt die RFLP-Diagnose der homologen Rekombination zwischen dem Targetingkonstrukt und dem μ -Lokus. Die RFLPs wurden durch Southern-Blot-Hybridisierung unter Verwendung von Sonde A detektiert, das 915 bp SacI-Fragment ist in **Fig. 1C** gezeigt.

[0062] **Fig. 2** zeigt die Ergebnisse aus Experimenten, die demonstrieren, daß lösliche Humansequenz-Antikörper gegen humanes CTLA-4 das Binden von rekombinantem löslichem humanem CTLA-4 an Zellen, die Maus-B7.1 exprimieren, hemmen, wie nachstehend ausführlich beschrieben.

[0063] **Fig. 3** zeigt die Ergebnisse eines konkurrierenden Bindungsassays zur Identifizierung von Humansequenz-Antikörpern, die nicht-überlappende Epitope auf humanem CTLA-4 erkennen, wie nachstehend ausführlich beschrieben.

[0064] **Fig. 4** zeigt vorläufige Nukleotidsequenzdaten für das Schwereketten- und Leichtkettenfragment des Anti-CTLA-4-Antikörpers 10D1.3.

[0065] **Fig. 5** zeigt die Nukleotidsequenzen der variablen Leichte-Ketten-Bereiche (V_K) der Anti-humanes-CTLA-4-Antikörper. Die Anti-CTLA-4-Antikörper 10D1 (SEQ ID Nr.: 6) und 4B6 (SEQ ID Nr.: 8) aus der V_K A-27-Keimbahnsequenz (SEQ ID Nr.: 4) werden oben in der Figur dargestellt. Der Anti-CTLA-4-Antikörper 1E2 (SEQ ID Nr.: 12) aus der V_K L-15-Keimbahnsequenz (SEQ ID Nr.: 10) wird unten in der Figur gezeigt. Die V_K -Sequenzen der drei Anti-CTLA-4-Antikörper sind nach ihren Keimbahn-kodierten V_K -Gensequenzen ausgerichtet. Die komplementaritätsbestimmenden Reste (CDR) sind markiert. Striche kennzeichnen Sequenzidentität.

[0066] **Fig. 6** zeigt die Nukleotidsequenzen der variablen Schwere-Kette-Bereiche (V_H) der Anti-humanes CTLA-4-Antikörper. Die Anti-CTLA-4-Antikörper 10D1 (SEQ ID Nr.: 16) und 4B6 (SEQ ID Nr.: 18) aus der V_H 3-30.3-Keimbahnsequenz (SEQ ID Nr.: 14) werden oben in der Figur dargestellt. Der Anti-CTLA-4-Antikörper 1E2 (SEQ ID Nr.: 22) aus der V_H 3-33-Keimbahnsequenz (SEQ ID Nr.: 20) wird unten in der Figur gezeigt. Die V_H -Sequenzen der drei Anti-CTLA-4-Antikörper sind nach ihren Keimbahn-kodierten Sequenzen ausgerichtet. Die komplementaritätsbestimmenden Reste (CDR) sind markiert. Striche kennzeichnen Sequenzidentität.

[0067] **Fig. 7** zeigt vorhergesagte Aminosäuresequenzen der variablen Leichte-Kette-Bereiche von Anti-hu-

manes-CTLA-4-Antikörpern. Die vorhergesagten Aminosäure- V_K -Sequenzen der Anti-CTLA-4-Antikörper, beschrieben in [Fig. 5](#), werden gezeigt. Die Anti-CTLA-4-Antikörper 10D1 (SEQ ID Nr.: 7) und 4B6 (SEQ ID Nr.: 9) aus der V_K A-27-Keimbahnsequenz (SEQ ID Nr.: 5) werden oben in der Figur gezeigt. Der Anti-CTLA-4-Antikörper 1E2 (SEQ ID Nr.: 13) aus der V_K L-15-Keimbahnsequenz (SEQ ID Nr.: 11) wird unten in der Figur gezeigt.

[0068] [Fig. 8](#) zeigt vorhergesagte Aminosäuresequenzen der variablen Schwere-Kette-Bereiche Anti-humanes-CTLA-4-Antikörper. Die vorhergesagten Aminosäure- V_H -Sequenzen der Anti-CTLA-4-Antikörper, beschrieben in [Fig. 6](#), werden gezeigt. Die Anti-CTLA-4-Antikörper 10D1 (SEQ ID Nr.: 17) und 4B6 (SEQ ID Nr.: 19) aus der V_H 3-30.3-Keimbahnsequenz (SEQ ID Nr.: 15) werden oben in der Figur gezeigt. Der Anti-CTLA-4-Antikörper 1E2 (SEQ ID Nr.: 21) aus der V_H 3-33-Keimbahnsequenz (SEQ ID Nr.: 21) wird unten in der Figur gezeigt.

[0069] [Fig. 9](#) zeigt die Ergebnisse aus Bindungsexperimenten von MAb 10D1 an rekombinantes humanes CTLA-4 durch ELISA. MAb 10D1 bindet an gereinigtes rekombinantes CTLA-4 mit dosisabhängigen und sättigenden Kinetiken.

[0070] [Fig. 10](#) zeigt das Binden von 10D1 an eine CTLA-4-exprimierende T-Zelllinie. Diese Daten zeigen, daß MAb 10D1 mit dosisabhängigen und sättigenden Kinetiken an Zellen, die CTLA-4 exprimieren, bindet.

[0071] [Fig. 11](#) zeigt das Hemmen der Bindung von humanem B7.2 Ig an CTLA4-exprimierende T-Zellen. Diese Daten zeigen, daß MAb 10D1 die B7.2-Bindung an CTLA-4 im Vergleich zu einem humanen Kontroll-MAb effektiv blockiert.

[0072] [Fig. 12](#) zeigt die Ergebnisse für die Blockierung der CTLA4-FITC-Bindung an murine B7.1-exprimierende Zellen. Diese Daten zeigen, daß MAb 10D1 die CTLA-4-Bindung an B7.1 im Vergleich zu einem humanen Kontroll-MAb effektiv blockieren kann.

[0073] [Fig. 13](#) zeigt konkurrierende ELISAs von humanen Anti-CTLA-4-MAbs, die die Epitopgruppen-Klassifizierung demonstrieren.

[0074] [Fig. 14](#) zeigt die CTLA-4-Expression an PHA-stimulierten T-Zellen. Aktivierte, nicht aber ruhende T-Zellen, exprimieren geringe, aber detektierbare Konzentrationen von CTLA-4 auf der Zelloberfläche.

[0075] [Fig. 15](#) zeigt Ergebnisse von MAb 10D1 bei der Komplement-abhängigen Lyse aktivierter T-Zellen. Es wird keine Lyse PHA-aktivierter T-Zellen beobachtet.

[0076] [Fig. 16](#) zeigt die Ergebnisse von MAb 10D1 bei der Antikörper-abhängigen Lyse aktivierter T-Zellen. Bei 10D1- und mononuklearen Zellen ist keine Lyse PHA-aktivierter T-Zellen zu beobachten.

[0077] [Fig. 17](#) zeigt Anti-10D1 IgM- und IgG-Antworten in Cynomolgus-Affen, denen 10D1-Antikörper injiziert wurden. Es ist keine Antikörperantwort auf 10D1 zu beobachten.

Ausführliche Beschreibung

[0078] Die vorliegende Erfindung liefert neue Antikörper-basierende Therapien, die zur Behandlung und Diagnose von Krankheiten verwendet werden können, die durch die Expression, insbesondere Überexpression oder Aktivierung, insbesondere Überaktivierung, humaner CTLA-4- und/oder verwandter Moleküle gekennzeichnet sind. Die hierin offenbarten Therapien setzen Humansequenz-Antikörper, monoklonale Humansequenz-Antikörper oder Antigen-bindende Teile davon, die an ein Epitop auf humanem CTLA-4 binden, ein. Diese Humansequenz-anti-CTLA-4-Antikörper können als funktionale Antagonisten (z. B. Hemmung der Fähigkeit von CTLA-4, Liganden zu binden oder die Zelle zu aktivieren, z. B. durch die Hemmung seiner Fähigkeit, ein Signal an die Zelle zu übertragen) oder Agonisten (z. B. zur Stimulierung der Wirkung von Liganden) agieren.

[0079] Die hierin offenbarten Humansequenz-Antikörper können in einem nicht-humanen transgenen Lebewesen, z. B. einer transgenen Maus, produziert werden, die mehrere Isotypen von humanen (z. B. monoklonalen oder polyklonalen) Antikörpern gegen humanes CTLA-4 (z. B. IgG, IgA und/oder IgE) durch Unterziehung einer V-D-J-Rekombination und eines Isotypwechsels produzieren können.

[0080] Demgemäß werden hierin Antikörper und Antikörperfragmente und pharmazeutische Zusammenset-

zungen davon sowie nicht-humane transgene Lebewesen und B-Zellen und Hybridome zur Erzeugung solcher monoklonaler Antikörper offenbart. Verfahren zur Verwendung der Antikörper der Erfindung zur Detektion einer Zelle, die humanes CTLA-4 oder einen ähnlichen kreuzreaktiven Wachstumsfaktorrezeptor exprimiert, oder zur Hemmung des Wachstums, der Differenzierung und/oder Motilität einer Zelle, die humanes CTLA-4 exprimiert, entweder in vitro oder in vivo, werden ebenso offenbart.

[0081] Wenn nicht anders angegeben, werden die Ausdrücke „Patient“ oder „Individuum“ wechselseitig verwendet und beziehen sich auf Säuger wie menschliche Patienten und nicht-humane Primaten, sowie Versuchstiere, wie Kaninchen, Ratten und Mäuse, und andere Lebewesen.

[0082] Der Ausdruck „Behandlung“ umfaßt die Verabreichung der hierin offenbarten Verbindungen oder Mittel zur Verhinderung oder Verzögerung des Ausbruches der Symptome, Komplikationen oder biochemischen Anzeichen einer Krankheit, Abschwächen der Symptome oder Aufhalten oder Hemmen der Weiterentwicklung der Krankheit, des Zustandes oder der Störung (z. B. Autoimmunkrankheit). Eine Behandlung kann prophylaktisch (zur Verhinderung oder Verzögerung des Ausbruches der Krankheit, oder zur Verhinderung einer Manifestierung klinischer oder subklinischer Symptome davon) oder die therapeutische Unterdrückung oder Abschwächung von Symptomen nach der Manifestierung der Krankheit sein.

[0083] Im allgemeinen bezieht sich der Ausdruck „gut vertragen“ auf das Fehlen nachteiliger Veränderungen des Gesundheitszustandes, die als Resultat der Behandlung auftreten und Behandlungsentscheidungen beeinträchtigen können.

[0084] Der Ausdruck „Lymphozyt“, wie hierin verwendet, hat die in der Technik übliche Bedeutung und bezieht sich auf die mononuklearen, nicht-phagozytischen Leukozyten, die im Blut, der Lymphe und in Lymphoidgeweben zu finden sind, d. h. B- und T-Lymphozyten.

[0085] Der Ausdruck „Subpopulationen von T-Lymphozyten“ oder „T-Zellen-Teilmenge(n)“ bezieht sich auf T-Lymphozyten oder T-Zellen, die durch die Expression spezieller Zelloberflächenmarker gekennzeichnet sind (siehe Barclay, A. N. et al., (Hrsg.), 1997, *The Leukocyte Antigen Facts Book*, 2. Auflage, Academic Press, London, United Kingdom). Der Ausdruck „stabil“ in bezug auf T-Zellen bezieht sich auf die Tatsache, daß sich das Vorkommen oder der prozentuale Anteil einer T-Zellen-Teilmenge im Verlauf oder während der Dauer der Verabreichung eines Mittels nicht ändert.

[0086] Die Ausdrücke „zytotoxisches T-Lymphozyt-assoziiertes Antigen-4“, „CTLA-4“, „CTLA4“, „CTLA-4-Antigen“ und „CD152“ (siehe beispielsweise Murata (1999) *Am. J. Pathol.* 155: 453–460) werden wechselseitig verwendet und umfassen Varianten, Isoformen, Spezieshomologa von humanem CTLA-4 und Analoga mit mindestens einem gemeinsamen Epitop mit CTLA-4 (siehe beispielsweise Balzano (1992) *Int. J. Cancer Suppl.* 7: 28–32).

[0087] Die komplette cDNA-Sequenz von humanem CTLA-4 hat die Genbank-Hinterlegungsnummer L15006. Der Bereich der Aminosäuren 1–37 ist das Leader-Peptid; 38–161 ist die extrazelluläre V-ähnliche Domäne; 162–187 ist die Transmembrandomäne, und 188–223 ist die Zytoplasmadomäne. Varianten der Nukleotidsequenz sind berichtet worden, einschließlich einer G-zu-A-Transition an Position 49, einer C-zu-T-Transition an Position 272 und einer A-zu-G-Transition an Position 439. Die komplette DNA-Sequenz von Maus-CTLA-4 hat die EMBL-Hinterlegungsnummer X05719 (Brunet et al., (1987) *Nature* 328: 267–270). Der Bereich der Aminosäuren 1–35 ist das Leader-Peptid.

[0088] Die komplette DNA-Sequenz von humanem B7-1 (CD80) hat die Genbank-Hinterlegungsnummer X60958; die Hinterlegungsnummer für die Mausequenz ist X60958; die Hinterlegungsnummer für die Rattensequenz ist U05593. Die komplette cDNA-Sequenz von humanem B7-2 (CD86) hat die Genbank-Hinterlegungsnummer L25259; die Hinterlegungsnummer für die Mausequenz ist L25606.

[0089] Die Gene, die CD28 kodieren, sind ausführlich charakterisiert worden. Die Huhn-mRNA-Sequenz hat die Genbank-Hinterlegungsnummer X67915. Die Ratten-mRNA-Sequenz hat die Genbank-Hinterlegungsnummer X55288. Die humane mRNA-Sequenz hat die Genbank-Hinterlegungsnummer J02988. Die Maus-mRNA-Sequenz hat die Genbank-Hinterlegungsnummer M34536.

[0090] Unter dem Ausdruck „Epitop“ ist eine Proteindeterminante zu verstehen, die spezifisch an einen Antikörper binden kann. Epitope bestehen für gewöhnlich aus chemisch aktiven Oberflächengruppierungen von Molekülen wie Aminosäuren oder Zuckerseitenketten und haben für gewöhnlich spezielle dreidimensionale

Strukturmerkmale sowie spezielle Ladungsmerkmale. Konformations- und Nicht-Konformationsepitope unterscheiden sich darin, daß die Bindung an ersteres, nicht aber an letzteres in Gegenwart denaturierender Lösungsmittel verloren geht.

[0091] Ein intakter „Antikörper“ umfaßt mindestens zwei schwere (H) Ketten und zwei leichte (L) Ketten, die durch Disulfidbindungen verbunden sind. Jede schwere Kette besteht aus einem variablen Schwere-Kette-Bereich (hierin mit HCVR oder VH abgekürzt) und einen konstanten Schwere-Kette-Bereich. Der konstante Schwere-Kette-Bereich besteht aus drei Domänen, CH1, CH2 und CH3. Jede leichte Kette besteht aus einem variablen Leichte-Kette-Bereich (hierin mit LCVR oder VL abgekürzt) und einem konstanten Leichte-Kette-Bereich. Der konstante Leichte-Kette-Bereich umfaßt einer Domäne, CL. Die VH- und VL-Bereiche können ferner in hypervariable Bereiche unterteilt werden, komplementaritätsbestimmende Bereiche (CDR) genannt, die mit konservierteren Bereichen durchsetzt sind, Gerüstregionen (FR) genannt. Jeder VH und VL besteht aus drei CDRs und vier FRs, die vom Amino-Terminus zum Carboxyl-Terminus wie folgt angeordnet sind: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Die variablen Bereiche der schweren und der leichten Ketten enthalten eine Bindungsdomäne, die mit einem Antigen interagiert. Die konstanten Bereiche der Antikörper können die Bindung des Immunglobulins an Wirtsgewebe oder -faktoren, einschließlich verschiedener Zellen des Immunsystems (z. B. Effektorzellen), und der ersten Komponente (C1q) des klassischen Komplementsystems vermitteln. Der Ausdruck Antikörper umfaßt Antigen-bindende Teile eines intakten Antikörpers, die CTLA-4-Bindungskapazität behalten. Beispiele für das Binden umfassen (i) ein Fab-Fragment, ein einwertiges Fragment, bestehend aus VL-, VH-, CL- und CH1-Domänen; (ii) ein F(ab')₂-Fragment, ein zweiwertiges Fragment, bestehend aus zwei Fab-Fragmenten, die durch eine Disulfidbrücke an der Gelenkregion verknüpft sind; (iii) ein Fd-Fragment, bestehend aus den VH- und CH1-Domänen; (iv) ein Fv-Fragment, bestehend aus den VL- und VH-Domänen eines einzelnen Arms eines Antikörpers, (v) ein dAb-Fragment (Ward et al., (1989) *Nature* 341: 544–546), das aus einer VH-Domäne besteht, und (vi) einen isolierten komplementaritätsbestimmenden Bereich (CDR). Ferner können die zwei Domänen des Fv-Fragments, VL und VH, obgleich sie für separate Gene kodiert sind, unter Verwendung rekombinanter Verfahren durch einen synthetischen Linker, durch den sie eine einzelne Proteinkette bilden können, in der sich die VL- und VH-Regionen unter Bildung einwertiger Moleküle paaren, verbunden werden (bekannt als einkettiges Fv (scFv); siehe beispielsweise Bird et al., (1988) *Science* 242: 423–426, und Huston et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879–5883). Solche einkettigen Antikörper sind durch Verweis in dem Ausdruck „Antikörper“ enthalten. Fragmente können durch rekombinante Techniken oder enzymatische oder chemische Spaltung intakter Antikörper hergestellt werden.

[0092] Ein bispezifischer Antikörper hat zwei unterschiedliche Bindungsspezifitäten, siehe beispielsweise die US-Patente 5,922,845 und 5,837,243; Zeilder (1999) *J. Immunol.* 163: 1246–1252; Somasundaram (1999) *Hum. Antikörper* 9: 47–54; Keler (1997) *Cancer Res.* 57: 4008–4014. Beispielsweise werden hierin bispezifische Antikörper mit einer Bindungsstelle für ein Zelloberflächenantigen, wie humanes CTLA-4, und einer zweiten Bindungsstelle für einen Fc-Rezeptor auf der Oberfläche einer Effektorzelle offenbart. Hierin werden ebenso multispezifische Antikörper offenbart, die mindestens drei Bindungsstellen haben. Der Ausdruck „bispezifische Antikörper“ umfaßt ferner Diabodies. Diabodies sind zweiwertige, bispezifische Antikörper, in denen die VH- und VL-Domänen an einer einzelnen Polypeptidkette, jedoch unter Verwendung eines Linkers, der für die Paarung zwischen den beiden Domänen auf derselben Kette zu kurz ist, exprimiert werden, wodurch sich die Domänen mit komplementären Domänen einer anderen Kette paaren müssen und zwei Antigenbindungsstellen erzeugt werden (siehe beispielsweise Holliger, P., et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444–6448; Poljak, R. J., et al., (1994) *Structure* 2: 1121–1123).

[0093] Der Ausdruck „Humansequenz-Antikörper“ umfaßt Antikörper mit variablen und konstanten Bereichen (sofern vorhanden) aus humanen Keimbahnimmunoglobulinsequenzen. Die hierin offenbarten Humansequenz-Antikörper können Aminosäurereste, die nicht durch humane Keimbahnimmunoglobulinsequenzen kodiert sind, umfassen (z. B. Mutationen, eingeführt durch willkürliche oder ortsspezifische Mutagenese *in vitro* oder durch somatische Mutation *in vivo*). Der Ausdruck „Humansequenz-Antikörper“, wie hierin verwendet, soll jedoch keine Antikörper umfassen, in die CDR-Sequenzen aus der Keimbahn einer anderen Säugerspezies, wie einer Maus, auf humane Gerüstsequenzen (d. h., humanisierte Antikörper) gepfropft worden sind.

[0094] Die Ausdrücke „monoklonaler Antikörper“ oder „monoklonale Antikörperzusammensetzung“ beziehen sich auf ein Präparat aus Antikörpermolekülen einer einzelnen molekularen Zusammensetzung. Eine monoklonale Antikörperzusammensetzung zeigt eine einzelne Bindungsspezifität und -affinität für ein spezielles Epitop. Demgemäß bezieht sich der Ausdruck „humaner monoklonaler Antikörper“ auf Antikörper, die eine einzelne Bindungsspezifität zeigen und variable und konstante Bereiche (sofern vorhanden) aus humanen Keimbahnimmunoglobulinsequenzen aufweisen. Die humanen monoklonalen Antikörper können durch ein Hybridom erzeugt werden, das eine B-Zelle, erhalten aus einem transgenen nicht-humanen Lebewesen, z. B. einer

transgenen Maus, mit einem Genom, umfassend ein humanes Schwerekettentransgen und ein Leichtketten-transgen, fusioniert mit einer sich unbegrenzt vermehrenden Zelle, umfaßt.

[0095] Der Ausdruck „diklonaler Antikörper“ bezieht sich auf ein Präparat aus mindestens zwei Antikörpern gegen humanes CTLA-4. Typischerweise binden die unterschiedlichen Antikörper unterschiedliche Epitope.

[0096] Der Ausdruck „oligoklonaler Antikörper“ bezieht sich auf ein Präparat aus 3 bis 100 unterschiedlichen Antikörpern gegen humanes CTLA-4. Typischerweise binden die Antikörper in einem solchen Präparat an einen Bereich unterschiedlicher Epitope.

[0097] Der Ausdruck „polyklonaler Antikörper“ bezieht sich auf ein Präparat aus mehr als einem (zwei oder mehr) unterschiedlichen Antikörpern gegen humanes CTLA-4. Solch ein Präparat umfaßt Antikörper, die an einen Bereich unterschiedlicher Epitope binden.

[0098] Die Erfindung liefert Humansequenz-Antikörper gegen humanes CTLA-4, die Signale, transduziert durch den Humanes-CTLA-4-Rezeptor, blockieren oder antagonisieren. Einige dieser Antikörper können so an Epitope auf humanem CTLA-4 binden, daß die Interaktion von CTLA-4 mit einem humanen B7-Gegenrezeptor gehemmt wird. Da die Interaktion von humanem CTLA-4 mit humanem B7 ein Signal transduziert, das zur Inaktivierung von T-Zellen, die den humanen CTLA-4-Rezeptor tragen, führt, wird die Aktivierung von T-Zellen, die den humanen CTLA-4-Rezeptor tragen, durch den Antagonismus der Interaktion effektiv induziert, gesteigert oder verlängert, wodurch eine Immunantwort verlängert oder gesteigert wird. Ein „blockierender Antikörper“ bezieht sich auf einen Antikörper, der das Binden von löslichem humanem CTLA-4 an Zell-exprimierte humane B7-Liganden um mindestens 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 % oder 99,9 % unter Bedingungen, bei denen das Verhältnis von Antikörperbindungsstellen zu Humanes-CTLA-4-Ligandenbindungsstellen größer als 1 : 1 ist und die Konzentration an Antikörper größer als 10^{-8} M ist.

[0099] Andere Antikörperpräparate, manchmal als mehrwertige Präparate bezeichnet, binden so an humanes CTLA-4, daß mehrere Humanes-CTLA-4-Rezeptoren auf derselben Zelle vernetzen. Die Vernetzung eines Rezeptors hat dieselbe oder eine ähnliche Wirkung wie das Binden von humanem CTLA-4 an humanes B7. Daher agonisiert die Vernetzung von Rezeptoren effektiv die Humanes-CTLA-4-Antwort, was zur Immunsuppression führt.

[0100] Eine Vernetzung kann ebenso durch die Kombination löslicher zweiwertiger Antikörper mit unterschiedlichen Epitopspezifitäten erreicht werden. Diese Präparate aus polyklonalen Antikörpern umfassen mindestens zwei Paare schwerer und leichter Ketten, die an unterschiedliche Epitope auf humanem CTLA-4 binden, so daß als Ergebnis einer Vernetzung von humanem CTLA-4 ein immunsuppressives Signal transduziert werden kann.

[0101] Der Ausdruck „rekombinanter humaner Antikörper“ umfaßt alle hierin offenbarten Humansequenz-Antikörper, die mit rekombinanten Mitteln hergestellt, exprimiert, erzeugt oder isoliert werden, wie Antikörper, isoliert aus einem Lebewesen (z. B. einer Maus), das für humane Immunoglobulingene transgen ist (ausführlich in Abschnitt I, unten beschrieben); Antikörper, exprimiert unter Verwendung eines rekombinanten Expressionsvektors, transfiziert in eine Wirtszelle, Antikörper, isoliert aus einer kombinatorischen Bibliothek für rekombinante humane Antikörper, oder Antikörper, die durch irgendein anderes Mittel, das das Spleißen humaner Immunoglobulingensequenzen an andere DNA-Sequenzen umfaßt, hergestellt, exprimiert, erzeugt oder isoliert wurden. Solche rekombinanten humanen Antikörper weisen variable und konstante Bereiche (sofern vorhanden) auf, die aus humanen Keimbahnimmunoglobulinsequenzen stammen. Solche Antikörper können jedoch einer In-vitro-Mutagenese (oder, wenn ein für humane Ig-Sequenzen transgenes Lebewesen verwendet wird, einer somatischen In-vivo-Mutagenese) unterzogen werden, und somit sind Aminosäuresequenzen der VH- und VL-Bereiche der rekombinanten Antikörper Sequenzen, die, während sie aus humanen Keimbahn-VH- und -VL-Sequenzen stammen und mit diesen verwandt sind, nicht natürlich in dem humanen Antikörperkeimbahnrepertoire in vivo existieren können.

[0102] Ein „heterologer Antikörper“ wird in bezug auf den transgenen nicht-humanen Organismus, der einen solchen Antikörper produziert, definiert. Dieser Ausdruck bezieht sich auf einen Antikörper mit einer Aminosäuresequenz oder einer kodierenden Nukleinsäuresequenz, die der entspricht, die in einem Organismus zu finden ist, der nicht aus dem transgenen nicht-humanen Lebewesen besteht, und im allgemeinen aus anderen Spezies als der des transgenen nicht-humanen Lebewesens.

[0103] Ein „heterohybrider Antikörper“ bezieht sich auf einen Antikörper mit leichten und schweren Ketten un-

terschiedlicher organischer Abstammung. Beispielsweise ist ein Antikörper mit einer humanen schweren Kette, assoziiert mit einer leichten Kette von einer Maus, ein heterohybrider Antikörper. Beispiele für heterohybride Antikörper umfassen chimäre und humanisierte Antikörper, wie oben erörtert.

[0104] Unter dem Ausdruck „im wesentlichen rein“ oder „isoliert“ ist zu verstehen, daß eine Zielspezies (z. B. ein Antikörper der Erfindung) aus einer Komponente in ihrer natürlichen Umgebung identifiziert und separiert und/oder wiedergewonnen worden ist, so daß die Zielspezies die dominierende vorhandene Spezies ist (d. h., auf einer molaren Basis ist sie ergiebiger als irgendeine andere individuelle Spezies in der Zusammensetzung); unter einer „im wesentlichen reinen“ oder „isolierten“ Zusammensetzung ist auch zu verstehen, daß eine Zielspezies mindestens etwa 50 Prozent (auf molarer Basis) aller vorhandenen makromolekularen Spezies umfaßt. Eine im wesentlichen reine oder isolierte Zusammensetzung kann ebenso mehr als etwa 80 bis 90 Gew.-% aller makromolekularen Spezies, die in der Zusammensetzung vorhanden sind, umfassen. Eine isolierte Zielspezies (z. B. Antikörper der Erfindung) kann auch auf essentielle Homogenität (Kontaminationspezies können in der Zusammensetzung durch herkömmliche Detektionsverfahren nicht detektiert werden), bei der die Zusammensetzung im wesentlichen aus Derivaten einer einzelnen makromolekularen Spezies besteht, gereinigt werden. Ein isolierter Antikörper gegen humanes CTLA-4 kann im wesentlichen frei von anderen Antikörpern, die nicht an humanes CTLA-4 und an ein anderes Antigen binden, sein. Ein isolierter Antikörper, der spezifisch an ein Epitop, eine Isoform oder Variante von humanem CTLA-4 bindet, kann jedoch mit anderen ähnlichen Antigenen, z. B. aus anderen Spezies (z. B. CTLA-4-Spezieshomologa) Kreuzreaktivität haben. Überdies kann ein isolierter Antikörper der Erfindung im wesentlichen frei von anderem zellulären Material (z. B. Nicht-Immunglobulin-assoziierten Proteinen) und/oder Chemikalien sein.

[0105] „Spezifisches Binden“ bezieht sich auf die Antikörperbindung an ein vorgegebenes Antigen. Der Ausdruck „bindet spezifisch (oder selektiv)“ an einen Antikörper, bezieht sich auf eine Bindungsreaktion, die für die Gegenwart des Proteins in einer heterogenen Population von Proteinen und anderen biologischen Verbindungen bezeichnend ist. Typischerweise bindet der Antikörper mit einer Assoziationskonstante (K_a) von mindestens etwa $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ oder 10^7 M^{-1} oder etwa 10^8 M^{-1} bis 10^9 M^{-1} oder etwa 10^{10} M^{-1} bis 10^{11} M^{-1} oder höher, und bindet an das vorgegebene Antigen mit einer Affinität, die mindestens um das zweifache größer ist als seine Affinität zum Binden an ein anderes nicht-spezifisches Antigen (z. B. BSA, Kasein) als das vorgegebene Antigen oder ein nahe verwandtes Antigen. Die Ausdrücke „Antikörper, der ein Antigen erkennt“ und „Antikörper, der für ein Antigen spezifisch ist“ werden hierin wechselseitig mit dem Ausdruck „Antikörper, der spezifisch an ein Antigen bindet“ verwendet.

[0106] Der Ausdruck „bindet/binden spezifisch“ oder „bindet/binden spezifisch“ bezieht sich in bezug auf ein Peptid auf ein Peptidmolekül, das eine mittlere oder hohe Bindungsaffinität, ausschließlich oder überwiegend, an ein Zielmolekül aufweist. Der Ausdruck „bindet spezifisch an“ bezieht sich auf eine Bindungsreaktion, die für die Gegenwart eines Zielproteins in Gegenwart einer heterogenen Population von Proteinen und anderen biologischen Verbindungen kennzeichnend ist. Somit binden unter vorgegebenen Assaybedingungen die spezifizierten Bindungseinheiten bevorzugt an ein bestimmtes Zielprotein und nicht in einem signifikanten Ausmaß an andere Komponenten, die sich in einer Testprobe befinden. Die spezifische Bindung an ein Zielprotein unter solchen Bedingungen kann eine Bindungseinheit erfordern, die wegen ihrer Spezifität für ein bestimmtes Zielantigen ausgewählt wurde. Es kann eine Vielzahl von Assayformaten zur Auswahl von Liganden, die spezifisch mit einem bestimmten Protein reaktiv sind, verwendet werden. Beispielsweise werden Festphasen-ELISA-Immunoassays, Immunopräzipitation, Biacore- und Western-Blot zur Identifizierung von Peptiden, die spezifisch mit CTLA-4 reagieren, verwendet. Typischerweise wird eine spezifische oder selektive Reaktion mindestens das zweifache des Hintergrundsignals oder -rauschens oder typischer mehr als das zehnfache des Hintergrunds betragen.

[0107] Der Ausdruck „hohe Affinität“ für einen IgG-Antikörper bezieht sich auf eine Gleichgewichtsassoziationskonstante (K_a) von mindestens etwa 10^7 M^{-1} , mindestens etwa 10^8 M^{-1} , mindestens etwa 10^9 M^{-1} , mindestens etwa 10^{10} M^{-1} , mindestens etwa 10^{11} M^{-1} oder mindestens etwa 10^{12} M^{-1} oder größer, z. B. bis zu 10^{13} M^{-1} oder 10^{14} M^{-1} oder größer. „Hohe Bindungsaffinität“ kann jedoch bei anderen Antikörperisotypen variieren.

[0108] Der Ausdruck „ K_a “, wie hierin verwendet, soll sich auf die Gleichgewichtsassoziationskonstante einer bestimmten Antikörper-Antigen-Interaktion beziehen. Diese Konstante hat die Einheit 1/M.

[0109] Der Ausdruck „ K_d “, wie hierin verwendet, soll sich auf die Gleichgewichtsassoziationskonstante einer bestimmten Antikörper-Antigen-Interaktion beziehen. Diese Konstante hat die Einheit M.

[0110] Der Ausdruck „ k_a “, wie hierin verwendet, soll sich auf die kinetische Assoziationskonstante einer be-

stimmten Antikörper-Antigen-Interaktion beziehen. Diese Konstante hat die Einheit 1/Ms.

[0111] Der Ausdruck „ k_d “, wie hierin verwendet, soll sich auf die kinetische Dissoziationskonstante einer bestimmten Antikörper-Antigen-Interaktion beziehen. Diese Konstante hat die Einheit 1/s.

[0112] „Bestimmte Antikörper-Antigen-Interaktionen“ beziehen sich auf die experimentellen Bedingungen, unter denen die Gleichgewichts- und kinetischen Konstanten gemessen werden.

[0113] „Isotyp“ bezieht sich auf die Antikörperklasse (z. B. IgM oder IgG1), die durch Gene des konstanten Schwere-Kette-Bereiches kodiert sind.

[0114] „Isotypwechsel“ bezieht sich auf das Phänomen, durch das die Klasse oder der Isotyp eines Antikörpers von einer Ig-Klasse zu einer der anderen Ig-Klassen wechselt.

[0115] „Nicht-gewechselter Isotyp“ bezieht sich auf eine Isotypenklasse einer schweren Kette, die erzeugt wird, wenn kein Isotypwechsel stattgefunden hat; das CH-Gen, das den nicht-gewechselten Isotyp kodiert, ist typischerweise das erste CH-Gen stromabwärts von dem funktionell umgeordneten VDJ-Gen. Der Isotypwechsel ist als klassischer oder nicht-klassischer Isotypwechsel klassifiziert worden. Der klassische Isotypwechsel findet durch Rekombinationsevents statt, die mindestens einen Wechselsequenzbereich in dem Transgen umfassen. Der nicht-klassische Isotypwechsel kann beispielsweise durch homologe Rekombination zwischen humanem σ_μ und humanem Σ_μ stattfinden (δ -assoziierte Deletion). Alternativ können nicht-klassische Wechselmechanismen wie unter anderem Intertransgen- und/oder Interchromosomen-Rekombination stattfinden und den Isotypwechsel bewirken.

[0116] Der Ausdruck „Wechselsequenz“ bezieht sich auf die DNA-Sequenzen, die für die switch-Rekombination zuständig sind. Eine „Wechseldonor“-Sequenz, typischerweise eine μ -switch-Region, befindet sich 5' (d. h. stromaufwärts) der Konstruktregion, die während der switch-Rekombination gelöscht werden soll. Die „switch-Akzeptor“-Regionen liegen zwischen der zu löschenden Konstruktregion und der konstanten Ersatzregion (z. B. γ , ϵ usw.). Da es keine spezielle Stelle gibt, an der die Rekombination immer stattfindet, ist die endgültige Gensequenz typischerweise nicht aus dem Konstrukt vorhersagbar.

[0117] „Glykosylierungsmuster“ ist als das Muster von Kohlenhydrateinheiten, die kovalent an ein Protein, genauer gesagt an ein Immunoglobulinprotein, angelagert sind, definiert. Ein Glykosylierungsmuster eines heterologen Antikörpers kann als im wesentlichen ähnlich zu Glykosylierungsmustern charakterisiert werden, die natürlich an Antikörpern vorkommen, die durch die Spezies des nicht-humanen transgenen Lebewesens erzeugt wurden, wenn ein Fachmann erkennt, daß das Glykosylierungsmuster des heterologen Antikörpers dem Muster der Glykosylierung in der Spezies des nicht-humanen transgenen Lebewesens ähnlicher als dem der Spezies, aus der die CH-Gene des Transgens stammen, ist.

[0118] Der Ausdruck „natürlich vorkommend“, wenn für ein Objekt angewendet, bezieht sich auf die Tatsache, daß ein Objekt in der Natur zu finden ist. Beispielsweise ist eine Polypeptid- oder Polynukleotidsequenz, die in einem Organismus (einschließlich Viren) vorhanden ist, der aus einer Quelle in der Natur isoliert werden kann und der im Labor nicht absichtlich von jemandem modifiziert worden ist, natürlich vorkommend.

[0119] Der Ausdruck „umgeordnet“ bezieht sich auf eine Konfiguration des Lokus für die schwere oder leichte Immunoglobulinkette, worin ein V-Segment unmittelbar neben einem D-J- oder J-Segment in einer Konformation positioniert ist, die im wesentlichen eine komplette VH- bzw. VL-Domäne kodiert. Ein umgeordneter Immunoglobulinlokus kann durch den Vergleich mit Keimbahn-DNA identifiziert werden; ein umgeordneter Lokus hat mindestens ein rekombiniertes Heptamer/Nonamer-Homologieelement.

[0120] Der Ausdruck „nicht umgeordnet“ oder „Keimbahnkonfiguration“ bezieht sich in bezug auf ein V-Segment auf die Konfiguration, in der das V-Segment nicht so rekombiniert ist, daß es sich unmittelbar neben einem D- oder J-Segment befindet.

[0121] Der Ausdruck „Nukleinsäure“ soll DNA-Moleküle und RNA-Moleküle umfassen. Eine Nukleinsäure kann einsträngig oder doppelsträngig sein.

[0122] Der Ausdruck „isolierte Nukleinsäure“ soll sich in bezug auf Nukleinsäuren, die Antikörper oder Antikörperteile (z. B., VH, VL, CDR3), die an CTLA-4 binden, kodieren, auf eine Nukleinsäure beziehen, in der die Nukleotidsequenzen, die den Antikörper oder Antikörperteil kodieren, frei von anderen Nukleotidsequenzen

sind, die Antikörper oder Antikörperteile kodieren, die andere Antigene als CTLA-4 binden, wobei die anderen Sequenzen von Natur aus die Nukleinsäure in humaner genomischer DNA flankieren. SEQ ID Nr.: 4–23 umfassen die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen, die die variable Schwere-Kette-(VH) und Leichte-Kette-(VL)-Bereiche der humanen 10D1-, 4B6- und 1E2-Anti-CTLA-4-monoklonalen Antikörper der Erfindung umfassen.

[0123] Der Ausdruck „im wesentlichen identisch“ bezieht sich im Kontext von zwei Nukleinsäuren oder Polypeptiden auf zwei oder mehr Sequenzen oder Teilsequenzen, die mindestens etwa 80 %, etwa 90, etwa 95 % oder mehr Nukleotid- oder Aminosäureresidentität aufweisen, verglichen und ausgerichtet mit der maximalen Übereinstimmung, gemessen unter Verwendung des folgenden Sequenzvergleichsverfahrens und/oder durch visuelle Überprüfung. Beispielsweise liefert die Erfindung Nukleinsäuren mit Sequenzen, die im wesentlichen mit SEQ ID Nr.: 1, SEQ ID Nr.: 2 identisch sind. Solche „im wesentlichen identischen“ Sequenzen werden typischerweise als homolog betrachtet. Die „wesentliche Identität“ kann über einen Bereich der Sequenz, der mindestens etwa 50 Reste lang ist, über einen Bereich von mindestens etwa 100 Resten oder über einen Bereich von mindestens etwa 150 Resten oder über die gesamte Länge der beiden zu vergleichenden Sequenzen existieren. Wie nachstehend beschrieben, können zwei Antikörpersequenzen nur in einer Art und Weise ausgerichtet werden, durch Verwendung des Nummerierungsschemas in Kabat. Daher hat für Antikörper die prozentuale Identität eine einzigartige und genau definierte Bedeutung.

[0124] Aminosäuren aus den variablen Bereichen der reifen schweren und leichten Immunoglobulinketten werden mit Hx bzw. Lx gekennzeichnet, wobei x eine Zahl ist, die die Position einer Aminosäure gemäß dem Schema von Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 und 1991) kennzeichnet. Kabat listet viele Aminosäuresequenzen für Antikörper für jede Teilgruppe und die am verbreitetsten vorkommende Aminosäure für jede Restposition in dieser Teilgruppe auf, um so eine Konsens-Sequenz zu erzeugen. Kabat verwendet ein Verfahren zum Zuordnen einer Restzahl jeder Aminosäure in einer gelisteten Sequenz, und dieses Verfahren zum Zuordnen von Restzahlen ist in diesem Bereich Standard geworden. Kabats Schema kann auf andere Antikörper, die nicht in seinem Kompendium enthalten sind, durch die Ausrichtung des in Frage stehenden Antikörpers mit einer der Konsens-Sequenzen in Kabat durch Verweis auf konservierte Aminosäuren ausgedehnt werden. Durch die Verwendung des Kabat-Numerierungssystems können Aminosäuren an äquivalenten Positionen in unterschiedlichen Antikörpern ohne weiteres identifiziert werden. Beispielsweise nimmt eine Aminosäure an der L50-Position eines humanen Antikörpers die äquivalente Position zu einer Aminosäureposition L50 eines Maus-Antikörpers ein. Dem ähnlich werden Nukleinsäuren, die Antikörperketten kodieren, ausgerichtet, wenn die Aminosäuresequenzen, kodiert durch die jeweiligen Nukleinsäuren, gemäß dem Kabat-Numerierungs-Grundsatz ausgerichtet sind.

[0125] Der Ausdruck „hybridisiert selektiv (oder spezifisch) an“ bezieht sich auf das Binden, die Duplexbildung oder Hybridisierung eines Moleküls an eine bestimmte Nukleotidsequenz unter stringenten Hybridisierungsbedingungen, wenn diese Sequenz in einem Komplexgemisch vorhanden ist (z. B. völlig zelluläre oder Bibliotheks-DNA oder -RNA), wobei die bestimmte Nukleotidsequenz mindestens mit etwa dem zehnfachen Hintergrund detektiert wird. In einer Ausführungsform kann eine Nukleinsäure durch ihre Fähigkeit, unter stringenten Bedingungen an eine Nukleinsäure, die anderweitig als im Umfang dieser Offenbarung liegend bestimmt wurde, zu hybridisieren (wie die hierin beschriebenen exemplarischen Sequenzen), als im Umfang dieser Offenbarung liegend bestimmt werden (z. B. ist sie im wesentlichen mit SEQ ID Nr.: 1 oder SEQ IDNO: 2 identisch).

[0126] Der Ausdruck „stringente Hybridisierungsbedingungen“ bezieht sich auf Bedingungen, unter denen eine Sonde an ihre Zielteilsequenz, typischerweise in einem Komplexgemisch aus Nukleinsäure, jedoch nicht in einem signifikanten Ausmaß an andere Sequenzen hybridisieren wird (ein positives Signal (z. B. Identifizierung einer Nukleinsäure der Erfindung) ist etwa die zehnfache Hintergrundhybridisierung). Stringente Bedingungen sind sequenzabhängig und werden unter unterschiedlichen Umständen unterschiedlich sein. Längere Sequenzen hybridisieren spezifisch bei höheren Temperaturen. Eine ausführliche Übersicht über die Hybridisierung von Nukleinsäuren ist beispielsweise in Sambrook, Hrsg., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2. Aufl.), Bd. 1–3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel, Hrsg. John Wiley & Sons, Inc., New York (1997); LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY: HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, Hrsg. Elsevier, N. Y. (1993), zu finden.

[0127] Im allgemeinen sind stringente Bedingungen etwa 5–10 °C niedriger als der thermische Schmelzpunkt (T_m) für die spezifische Sequenz bei einer definierten Ionenstärke, pH. Der T_m ist die Temperatur (unter definierter Ionenstärke, pH, und Nukleinkonzentration), bei der 50 % der Sonden, komplementär zum Ziel, im Gleichgewicht an die Zielsequenz hybridisieren (sind die Zielsequenzen im Überschuss vorhanden, bei T_m ,

sind im Gleichgewicht 50 % der Sonden beteiligt). Stringente Bedingungen werden die sein, bei denen die Salzkonzentration weniger als etwa 1,0 M Natriumionen-, typischerweise etwa 0,01 bis 1,0 M Natriumionen-konzentration (oder andere Salze) bei pH 7,0 bis 8,3 beträgt und die Temperatur mindestens etwa 30 °C für kurze Sonden (z. B. 10 bis 50 Nukleotide) und mindestens etwa 60 °C für lange Sonden (z. B. mehr als 50 Nukleotide) ist. Stringente Bedingungen können auch unter Zugabe von Destabilisatoren wie Formamid erreicht werden, wie in Sambrook beschrieben (unten angegeben). Für eine hoch stringente Hybridisierung beträgt ein positives Signal mindestens die zweifache Hintergrund-, vorzugsweise die zehnfache Hintergrundhybridisierung. Exemplarische hohe Stringenz oder stringente Hybridisierungsbedingungen umfassen: 50 % Formamid, 5 × SSC und 1 % SDS, inkubiert bei 42 °C, oder 5 × SSC und 1 % SDS, inkubiert bei 65 °C, mit einer Wäsche in 0,2 × SSC und 0,1 % SDS bei 65 °C. Für die selektive oder spezifische Hybridisierung beträgt ein positives Signal (z. B. die Identifizierung einer Nukleinsäure der Erfindung) etwa die zehnfache Hintergrundhybridisierung. Stringente Hybridisierungsbedingungen, die zur Identifikation von Nukleinsäuren im Umfang der Erfindung verwendet werden, umfassen beispielsweise die Hybridisierung in einem Puffer, umfassend 50 % Formamid, 5 × SSC und 1 % SDS bei 42 °C, oder die Hybridisierung in einem Puffer, umfassend 5 × SSC und 1 % SDS bei 65 °C, beide mit einer Wäsche von 0,2 × SSC und 0,1 % SDS bei 65 °C. In der vorliegenden Erfindung können genomische DNA oder cDNA, die die Nukleinsäuren der Erfindung umfassen, in Standard-Southern-Blots unter stringenten Bedingungen unter Verwendung der hierin offenbarten Nukleinsäuresequenzen identifiziert werden. Weitere stringente Bedingungen für solche Hybridisierungen (zur Identifizierung von Nukleinsäuren innerhalb des Umgangs der Erfindung) sind die, die eine Hybridisierung in einem Puffer aus 40 % Formamid, 1 M NaCl, 1 % SDS bei 37 °C umfassen.

[0128] Die Auswahl des Hybridisierungsformats ist jedoch nicht kritisch – die Stringenz der Waschbedingungen gibt die Bedingungen, die bestimmen, ob eine Nukleinsäure im Umfang dieser Offenbarung liegt, vor. Waschbedingungen, die zur Identifizierung von Nukleinsäuren im Umfang dieser Offenbarung verwendet werden, umfassen beispielsweise: eine Salzkonzentration von etwa 0,02 mol bei pH 7 und eine Temperatur von mindestens etwa 50 °C oder etwa 55 °C bis etwa 60 °C; oder eine Salzkonzentration von etwa 0,15 M NaCl bei 72 °C für etwa 15 Minuten; oder eine Salzkonzentration von etwa 0,2 × SSC bei einer Temperatur von mindestens etwa 50 °C oder etwa 55 °C bis etwa 60 °C für etwa 15 bis etwa 20 Minuten; oder der Hybridisierungskomplex wird zweimal mit einer Lösung mit einer Salzkonzentration von etwa 2 × SSC, enthaltend 0,1 % SDS, bei Raumtemperatur für 15 Minuten und dann zweimal mit 0,1 × SSC, enthaltend 0,1 % SDS, bei 68 °C für 15 Minuten gewaschen; oder äquivalente Bedingungen. Für eine Beschreibung des SSC-Puffers und äquivalenter Bedingungen siehe Sambrook, Tijssen und Ausubel.

[0129] Die Nukleinsäuren der Erfindung können in ganzen Zellen, in einem Zellysat oder in teilweise gereinigter oder im wesentlichen reiner Form vorliegen. Eine Nukleinsäure ist „isoliert“ oder „im wesentlichen rein gemacht“, wenn sie von anderen zellulären Komponenten oder anderen Kontaminationen, z. B. anderen zellulären Nukleinsäuren oder Proteinen, durch Standardtechniken, umfassend Alkali-/SDS-Behandlung, Cs-CI-Banding, Säulenchromatographie, Agarosegelelektrophorese und andere, die in der Technik allgemein bekannt sind, gereinigt ist; siehe z. B. Sambrook, Tijssen und Ausubel. Die Nukleinsäuresequenzen der Erfindung und andere Nukleinsäuren, die zur Praktizierung dieser Erfindung verwendet werden, gleichgültig ob RNA, cDNA, genomische DNA oder Hybride davon, können aus einer Vielzahl von Quellen isoliert, genetisch konstruiert, amplifiziert und/oder rekombinant exprimiert werden. Es kann irgendein rekombinantes Expressionssystem verwendet werden, das zusätzlich zu bakteriellen, z. B. Hefe-, Insekten- oder Säugersysteme umfaßt. Alternativ können diese Nukleinsäuren in vitro chemisch synthetisiert werden. Techniken zur Manipulation von Nukleinsäuren wie beispielsweise das Subklonierung in Expressionsvektoren, die Markierung von Sonden, Sequenzierung und Hybridisierung werden in der wissenschaftlichen und Patentreliteratur ausführlich beschrieben, siehe z. B. Sambrook, Tijssen und Ausubel. Nukleinsäuren können mit irgendeinem der zahlreichen, einem Fachmann allgemein bekannten Mittel analysiert und quantifiziert werden. Diese umfassen z. B. biochemische Analyseverfahren wie NMR, Spektrophotometrie, Radiographie, Elektrophorese, Kapillarelektrophorese, Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC), Dünnschichtchromatographie (TLC) und Hyperdiffusionschromatographie, verschiedene immunologische Verfahren wie Fluid- oder Gel-Präzipitinreaktionen, Immunodiffusion (einzeln oder doppelt), Immunoelktrophorese, Radioimmunoassays (RIAs), heterogene Enzymimmuntests (ELISAs), Immunofluoreszenzassays, Southern-Analyse, Northern-Analyse, Dot-Blot-Analyse, Gelelektrophorese (z. B. SDS-PAGE), RT-PCR, quantitative PCR, andere Nukleinsäure- oder Target- oder Signalamplifikationsverfahren, radioaktive Markierung, Szintillationszählung und Affinitätschromatographie.

[0130] Die Nukleinsäurezusammensetzungen der vorliegenden Erfindung, oftmals in einer natürlichen Sequenz (außer bei modifizierten Restriktionsstellen und dergleichen), entweder aus cDNA, genomischer oder Gemischen davon, können gemäß Standardtechniken zum Erhalt von Gensequenzen mutiert werden. Bei kodierenden Sequenzen können diese Mutationen nach Bedarf eine Aminosäuresequenz beeinflussen. Insbe-

sondere werden DNA-Sequenzen, die im wesentlichen homolog zu nativen V-, D-, J-, konstanten, switch- und anderen der hierin beschriebenen Sequenzen sind oder daraus stammen, betrachtet (wobei „stammt“ anzeigt, daß eine Sequenz identisch mit einer anderen Sequenz oder aus dieser modifiziert ist).

[0131] Eine Nukleinsäure ist „funktionsfähig verknüpft“, wenn sie in eine funktionelle Beziehung zu einer anderen Nukleinsäuresequenz gesetzt wird. Beispielsweise ist ein Promoter oder Enhancer funktionsfähig mit einer kodierenden Sequenz verknüpft, wenn er die Transkription der Sequenz beeinflusst. In bezug auf die Transkription regulatorischer Sequenzen ist unter funktionsfähig verknüpft zu verstehen, daß verknüpfte DNA-Sequenzen benachbart sind und, wenn zwei Protein-kodierende Bereiche miteinander verbunden werden müssen, benachbart und in einem Leseraster sind. Für switch-Sequenzen zeigt funktionsfähig verknüpft an, daß die Sequenzen die switch-Rekombination bewirken können.

[0132] Der Ausdruck „Vektor“ soll sich auf ein Nukleinsäuremolekül beziehen, das eine andere Nukleinsäure, an die es geknüpft wurde, transportieren kann. Eine Art von Vektor ist ein „Plasmid“, was sich auf eine zirkuläre doppelsträngige DNA-Schleife bezieht, in die zusätzliche DNA-Segmente ligiert werden können. Eine andere Art von Vektor ist ein viraler Vektor, in den zusätzliche DNA-Segmente in das virale Genom ligiert werden können. Bestimmte Vektoren können sich selbstständig in einer Wirtszelle, in die sie eingeführt wurden, replizieren (z. B. bakterielle Vektoren mit bakteriellem Replikationsursprung und episomale Säugervektoren). Andere Vektoren (z. B. nicht-episomale Säugervektoren) können in das Genom einer Wirtszelle bei der Einführung in die Wirtszelle integriert und dabei zusammen mit dem Wirtsgenom repliziert werden. Überdies können bestimmte Vektoren die Expression von Genen, an die sie funktionsfähig geknüpft sind, dirigieren. Solche Vektoren werden hierin als „rekombinante Expressionsvektoren“ (oder einfach „Expressionsvektoren“) bezeichnet. Im allgemeinen liegen Expressionsvektoren mit einem Nutzen in rekombinanten DNA-Techniken oftmals in Form von Plasmiden vor. In der vorliegenden Beschreibung können „Plasmid“ und „Vektor“ wechselseitig verwendet werden, da das Plasmid die am verbreitetsten verwendete Form eines Vektors ist. Die Erfindung soll jedoch auch andere Formen von Expressionsvektoren wie virale Vektoren (z. B. replikationsdefekte Retroviren, Adenoviren und Adeno-assoziierte Viren), die äquivalente Funktionen bieten, umfassen.

[0133] Der Ausdruck „rekombinante Wirtszelle“ (oder einfach „Wirtszelle“) bezieht sich auf eine Zelle, in die ein rekombinanter Expressionsvektor eingeführt worden ist. Es sollte klar sein, daß sich solche Ausdrücke nicht nur auf die bestimmte Subjektzelle, sondern auch auf Nachkommen einer solchen Zelle beziehen. Da bei nachfolgenden Generationen aufgrund von Mutation oder Umwelteinflüssen bestimmte Modifikationen auftreten können, müssen solche Nachkommen in Wirklichkeit nicht mit der Stammzelle identisch sein, wobei sie jedoch noch immer im Umfang des Ausdruckes „Wirtszelle“, wie hierin verwendet, liegen.

[0134] Der Ausdruck „Minilokustransgen“ bezieht sich auf ein Transgen, das, im Vergleich zu dem natürlich vorkommenden Keimbahn-Ig-Lokus, einen Teil des genomischen Immunoglobulinlokus mit mindestens einer internen (d. h. nicht an einem Ende des Proteins) Deletion eines nicht-essentiellen DNA-Teils (z. B. Intron-Sequenz; Intron oder ein Teil davon) umfaßt.

[0135] Eine „Markierung“ ist eine Zusammensetzung, die durch spektroskopische, photochemische, biochemische, immunochemische oder chemische Mittel detektierbar ist. Nützliche Markierungen umfassen zum Beispiel ³²P, fluoreszierende Farbstoffe, elektronendichte Reagenzien, Enzyme (wie üblicherweise in einem ELSA verwendet), Biotin, Digoxigenin oder Haptene und Proteine, für die Antisera oder monoklonale Antikörper verfügbar sind (z. B. können die Polypeptide der Erfindung beispielsweise durch die Einführung einer radioaktiven Markierung in das Peptid detektierbar gemacht und zur Detektion von Antikörpern, die spezifisch mit dem Peptid reaktiv sind, verwendet werden).

[0136] Der Ausdruck „Sortieren“, im Zusammenhang mit Zellen, bezieht sich, wie hierin verwendet, sowohl auf das physikalische Sortieren der Zellen, wie es unter Verwendung beispielsweise eines Fluoreszenz-aktivierten Zellsorters erreicht werden kann, als auch auf die Analyse von Zellen, basierend auf der Expression von Zelloberflächenmarkern, z. B. FACS-Analyse ohne Sortieren.

[0137] Der Ausdruck „Immunzellantwort“ bezieht sich auf die Antwort von Immunsystemzellen auf externe und interne Stimuli (z. B. Antigen, Zytokine, Chemokine und andere Zellen), die biochemische Veränderungen in den Immunzellen erzeugen, die zur Immunzellmigration, Abtötung von Targetzellen, Phagozytose, Erzeugung von Antikörpern, anderen löslichen Effektoren der Immunantwort und dergleichen führen.

[0138] Die Ausdrücke „T-Lymphozytantwort“ und „T-Lymphozytaktivität“ werden hierin wechselseitig in bezug auf die Komponente der Immunantwort, die von T-Lymphozyten (d. h. der Proliferation und/oder Differenzie-

rung von T-Lymphozyten in Helfer-, zytotoxischen Killer- oder Suppressor-T-Lymphozyten, der Leitung von Signalen durch Helfer-T-Lymphozyten zu B-Lymphozyten, die die Antikörperproduktion verursachen oder verhindern, dem Abtöten spezieller Targetzellen durch zytotoxische T-Lymphozyten und dem Freisetzen löslicher Faktoren wie Zytokine, die die Funktion anderer Immunzellen modulieren) abhängen.

[0139] Der Ausdruck „Immunantwort“ bezieht sich auf die gemeinsame Wirkung von Lymphozyten, Antigen-präsentierenden Zellen, Phagozyten, Granulozyten und löslichen Makromolekülen, erzeugt von den obigen Zellen oder der Leber (einschließlich Antikörper, Zytokinen und Komplements), die in der selektiven Schädigung, Zerstörung oder Eliminierung invasierender Krankheitserreger, von Zellen oder Geweben, die mit Krankheitserregern infiziert sind, Krebszellen oder, in Fällen von Autoimmunität oder pathologischen Entzündungen, von normalen humanen Zellen oder Geweben im/aus dem menschlichen Körper resultiert.

[0140] Die Komponenten einer Immunantwort können in vitro mit verschiedenen Verfahren, die einem Fachmann allgemein bekannt sind, detektiert werden. Zum Beispiel können (1) zytotoxische T-Lymphozyten mit radioaktiv markierten Targetzellen inkubiert und die Lyse dieser Targetzellen durch die Freisetzung der Radioaktivität detektiert werden, (2) Helfer-T-Lymphozyten mit Antigenen und Antigen-präsentierenden Zellen inkubiert und die Synthese und Sekretion von Zytokinen mit Standardverfahren gemessen werden (Windhagen A.; et al., 1995, *Immunity* 2 (4): 373–80), (3) Antigen-präsentierende Zellen mit Vollproteinantigen inkubiert und die Präsentation des Antigens auf MHC entweder durch T-Lymphozytenaktivierungsassays oder biophysikalische Verfahren detektiert werden (Harding et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86: 4230–4), (4) Mastzellen mit Reagenzien, die ihre Fc-Epsilonrezeptoren vernetzen, inkubiert und die Histaminfreisetzung durch Enzymimmunoassays gemessen werden (Siraganian, et al., 1983, *TIPS* 4: 432–437).

[0141] Dem ähnlich können auch Produkte einer Immunantwort entweder einem Modellorganismus (z. B. Maus) oder einem menschlichen Patienten durch verschiedene Verfahren, die einem Fachmann allgemein bekannt sind, detektiert werden. Beispielsweise kann (1) die Produktion von Antikörpern in Folge der Impfung ohne weiteres durch Standardverfahren, die derzeit in klinischen Labors verwendet werden, z. B. einem ELISA, detektiert werden; (2) die Migration von Immunzellen zu Entzündungsstellen durch Abkratzen der Hautoberfläche und Plazieren eines sterilen Behälters zum Einfangen der migrierenden Zellen über der Kratzstelle detektiert werden (Peters et al., 1988, *Blood* 72: 1310–5); (3) die Proliferation peripherer mononukleärer Blutzellen in Folge von Mitogenen oder einer gemischten Lymphozytenreaktion unter Verwendung von ³H-Thymidin gemessen werden; (4) die Phagozytosekapazität von Granulozyten, Makrophagen und anderen Phagozyten in PBMCs durch das Plazieren von PMBCs in Löchern, zusammen mit markierten Teilchen gemessen werden (Peters et al., 1988) und (5) die Differenzierung von Immunsystemzellen durch die Markierung von PBMCs mit Antikörpern gegen CD-Moleküle wie CD4 und CD8 und Messen der Fraktion der PBMCs, die diese Marker exprimieren, gemessen werden.

[0142] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Ausdruck „Signaltransduktionsweg“ oder „Signaltransduktionsereignis“ auf mindestens eine biochemische Reaktion, üblicher jedoch auf eine Reihe biochemischer Reaktionen, die aus der Interaktion einer Zelle mit einer stimulierenden Verbindung oder einem solchen Mittel resultieren. So erzeugt die Interaktion einer stimulierenden Verbindung mit einer Zelle ein „Signal“, das über den Signaltransduktionsweg übertragen wird, was schließlich zu einer zellulären Antwort, z. B. einer oben beschriebenen Immunantwort führt.

[0143] Ein Signaltransduktionsweg bezieht sich auf die biochemische Beziehung zwischen einer Vielzahl von Signaltransduktionsmolekülen, die bei der Übertragung eines Signals von einem Teil einer Zelle zu einem anderen Teil einer Zelle eine Rolle spielen. Die hierin offenbarten Signaltransduktionsmoleküle umfassen zum Beispiel den hierin offenbarten MAb 147.1. Wie hierin verwendet umfaßt der Ausdruck „Zelloberflächenrezeptor“ Moleküle und Komplexe von Molekülen, die ein Signal empfangen und ein solches Signal durch die Plasmamembran einer Zelle übertragen können. Ein Beispiel für einen „Zelloberflächenrezeptor“ der vorliegenden Erfindung ist der T-Zellenrezeptor (TCR) oder die B7-Liganden von CTLA-4.

[0144] Ein Signaltransduktionsweg in einer Zelle kann durch die Interaktion einer Zelle mit einem Stimulator, der sich innerhalb oder außerhalb der Zelle befindet, initiiert werden. Interagiert ein externer (d. h. außerhalb der Zelle) Stimulator (z. B. ein MHC-Antigen-Komplex auf einer Antigen-präsentierenden Zelle mit einem Zelloberflächenrezeptor (z. B. einem T-Zellenrezeptor), kann ein Signaltransduktionsweg ein Signal durch die Membran der Zelle über das Zytoplasma der Zelle und in einigen Fällen in den Kern übertragen. Interagiert ein interner (d. h. in der Zelle) Stimulator mit einem intrazellulären Signaltransduktionsmolekül, kann ein Signaltransduktionsweg zur Übertragung eines Signals durch das Zytoplasma der Zelle und in einigen Fällen in den Zellkern führen.

[0145] Die Signaltransduktion kann beispielsweise mittels der Phosphorylierung eines Moleküls; nicht-kovalenter allosterischer Interaktionen; Komplexierung von Molekülen; die Konformationsänderung eines Moleküls; Calciumfreisetzung; Inositolphosphatproduktion; proteolytische Spaltung; zyklische Nukleotidproduktion und Diacylglyceridproduktion stattfinden. Typischerweise findet die Signaltransduktion mittels Phosphorylierung eines Signaltransduktionsmoleküls statt.

[0146] Der Ausdruck „nicht-spezifische T-Zellaktivierung“ bezieht sich auf die Stimulierung von T-Zellen unabhängig von ihrer Antigenpezifität.

Produktion humaner Antikörper gegen CTLA-4

[0147] Die monoklonalen Antikörper (mAbs) und die Humansequenz-Antikörper der Erfindung können durch verschiedene Techniken produziert werden, einschließlich herkömmlicher monoklonaler Antikörper-Methodologie, z. B. die somatische Standard-Zellhybridisierungstechnik von Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Es kann irgendeine Technik zur Produktion monoklonaler Antikörper eingesetzt werden, z. B. die virale oder onkogenische Transformation von B-Lymphozyten. Ein Tiersystem zur Herstellung von Hybridomen ist das Maussystem. Die Hybridomproduktion in der Maus ist ein überaus anerkanntes Verfahren. Immunisierungsprotokolle und -techniken zur Isolation immunisierter Splenozyten zur Fusion sind in der Technik bekannt. Fusionspartner (z. B. Mausmyelomzellen) und Fusionsverfahren sind ebenso bekannt (siehe z. B. Harlow and Lane (1988), *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York).

[0148] Humane monoklonale Antikörper und Humansequenz-Antikörper, die gegen humanes CTLA-4 gerichtet sind, können unter Verwendung transgener Mäuse, die eher ein humanes Immunsystem als das Maussystem tragen, erzeugt werden. Diese transgenen Mäuse, hierin auch als „HuMAb-MausTM“ bezeichnet, enthalten humane Immunoglobulinminiloki, die nicht-umgeordnete humane Schwereketten- (μ und γ) und κ -Leichtketten-Immunoglobulinsequenzen kodieren, zusammen mit angestrebten Mutationen, die die endogenen μ - und κ -Kettenloki inaktivieren (Lonberg, N. et al., (1994) *Nature* 368 (6474): 856–859, und US-Patent 5,770,429). Demgemäß zeichnen die Mäuse eine reduzierte Expression von Maus-IgM oder κ , und in Folge der Immunisierung unterliegen die eingeführten humanen Schwer- und Leichtkettentransgene dem Klassenwechsel und der somatischen Mutation zur Erzeugung von monoklonalen human IgGk hoher Affinität (Lonberg, N. et al., (1994), oben; zusammengefaßt in Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113: 49–101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Bd. 13: 65–93, und Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci* 764: 536–546). Die Präparation transgener Mäuse wird ausführlich in Abschnitt II unten and in Taylor, L. et al., (1992) *Nucleic Acids Research* 20: 6287–6295; Chen, J. et al., (1993) *International Immunology* 5: 647–656; Tuailon et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90: 3720–3724; Choi et al., (1993) *Nature Genetics* 4: 117–123; Chen, J. et al., (1993) *EMBO J.* 12: 821 – 830; Tuailon et al., (1994), *J. Immunol.* 152: 2912–2920; Lonberg et al., (1994) *Nature* 368 (6474): 856–859; Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113: 49–101; Taylor, L. et al., (1994) *International Immunology* 6: 579–591; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Bd. 13: 65–93; Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci* 764: 536 – 546; Fishwild, D. et al., (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845 – 851, beschrieben. Siehe ferner die US-Patente Nr. 5,625,126 und 5,770,429, beide von Lonberg and Kay, und GenPharm International; US-Patent Nr. 5,545,807, von Surani et al.; die internationalen Veröffentlichungen Nr. WO 98/24884, veröffentlicht am 11. Juni 1998; WO 94/25585, veröffentlicht am 10. November 1994; WO 93/1227, veröffentlicht am 24. Juni 1993; WO 92/22645, veröffentlicht am 23. Dezember 1992; WO 92/03918, veröffentlicht am 19. März 1992. Alternativ können die in den Beispielen 1 und 2 unten beschriebenen CMD- und HCo12-Transgene zur Erzeugung humaner Anti-CTLA-4-Antikörper verwendet werden.

[0149] Ausführliche Verfahren zur Erzeugung vollständiger humaner monoklonaler Antikörper gegen CTLA-4 werden in den nachstehenden Beispielen beschrieben. Die kumulative Erfahrung mit verschiedenen Antigenen hat gezeigt, daß die transgenen Mäuse reagieren, wenn sie zu Beginn intraperitoneal (IP) mit Antigen in komplettem Freundschens-Adjuvans immunisiert wurden, gefolgt von (insgesamt bis zu 6) IP-Immunisierungen aller zwei Wochen mit Antigen in inkomplettem Freundschens-Adjuvans. Andere Adjuvanzen als das Freundschens sind jedoch auch effektiv. Außerdem sind Vollzellen in Abwesenheit eines Adjuvans hochimmunogen. Die Immunantwort kann über den Verlauf des Immunisierungsprotokolls mit Plasmaproben, die durch retroorbitalen Aderlaß erhalten wurden, überwacht werden. Das Plasma kann durch ELISA (wie nachstehend beschrieben) gescreent werden, und die Mäuse mit ausreichenden Titern von humanem Anti-CTLA-4-Immunoglobulin können für die Fusionen verwendet werden. Die Mäuse können 3 Tage vor der Tötung und Entfernung der Milz, intravenös mit Antigen geboostet werden. Es ist zu erwarten, daß 2 bis 3 Fusionen für jede Immunisierung durchgeführt werden müssen. Für jedes Antigen werden typischerweise zwischen 6 und 24 Mäuse immuni-

siert. Für gewöhnlich werden sowohl HCo7- und HCo12-Stämme verwendet. Überdies kann sowohl das HCo7- als auch das HCo12-Transgen zusammen in einer einzelnen Maus mit zwei unterschiedlichen humanen Schwerekettentransgenen herangezogen werden.

[0150] Zur Reinigung humaner Anti-CTLA-4-Antikörper können ausgewählte Hybridome in Zwei-Liter-Schleuder-Kolben für die Reinigung monoklonaler Antikörper wachsen. Die Überstände können vor der Affinitätschromatographie mit Protein-A-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ) filtriert und konzentriert werden. Eluiertes IgG kann durch Gelelektrophorese und Hochdruckflüssigchromatographie zur Sicherstellung der Reinheit überprüft werden. Die Pufferlösung kann gegen PBS ausgetauscht werden, und die Konzentration kann durch OD280 unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten von 1,43 bestimmt werden. Die monoklonalen Antikörper können aliquotiert und bei -80°C gelagert werden.

[0151] Zur Bestimmung, ob die ausgewählten humanen monoklonalen Anti-CTLA-4-Antikörper an einzigartige Epitope binden, kann jeder Antikörper unter Verwendung kommerziell erhältlicher Reagenzien (Pierce, Rockford, IL) biotinyliert werden. Konkurrenzstudien, die nicht-markierte monoklonale Antikörper und biotinylierte monoklonale Antikörper nutzen, können unter Verwendung von CTLA-4-beschichteten ELISA-Platten wie oben beschrieben durchgeführt werden. Das Binden von biotinyliertem MAb kann mit einer Streptavidin-alkalischen Phosphatase-Sonde detektiert werden.

[0152] Zur Bestimmung des Isotyps der gereinigten Antikörper können Isotyp-ELISAs durchgeführt werden. Die Löcher von Mikrotiterplatten können mit $1\ \mu\text{g/ml}$ Antihumanem IgG über Nacht bei 4°C beschichtet werden. Nach der Blockierung mit 1 % BSA wurden die Platten mit $1\ \mu\text{g/ml}$ oder weniger monoklonaler Antikörper oder Kontrollen mit dem gereinigten Isotyp bei Umgebungstemperatur für ein bis zwei Stunden umgesetzt. Die Löcher konnten dann entweder mit für humanes IgG1 oder humanes IgM spezifischen alkalische Phosphatase-konjugierten Sonden umgesetzt werden. Die Platten wurden wie oben beschrieben entwickelt und analysiert.

[0153] Um die Bindung monoklonaler Antikörper an lebende Zellen, die das CTLA-4 exprimieren, zu demonstrieren, kann Durchflußzytometrie verwendet werden. Kurz gesagt, werden Zelllinien, die CTLA-4 exprimieren (gewachsen unter Standardwachstumsbedingungen), mit verschiedenen Konzentrationen monoklonaler Antikörper in PBS, enthaltend 0,1 % BSA und 10 % fetales Kälberserum, gemischt und bei 37°C 1 Stunde inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit Fluoresceinmarkierten anti-humanen IgG-Antikörpern unter denselben Bedingungen wie bei der Primärintikörperfärbung umgesetzt. Die Proben können durch ein FACS-can-Gerät unter Verwendung von Licht und Seitenstreuungseigenschaften, gerichtet auf einzelne Zellen, analysiert werden. Ein alternativer Assay, der Fluoreszenzmikroskopie nutzt, kann (zusätzlich zu oder anstelle des) Durchflußzytometrieassays verwendet werden. Die Zellen können genau wie oben beschrieben gefärbt und mit Fluoreszenzmikroskopie überprüft werden. Dieses Verfahren ermöglicht die Visualisierung einzelner Zellen, kann in Abhängigkeit der Dichte des Antigens jedoch eine geringere Sensibilität haben.

[0154] humane Anti-CTLA-4-IgGs können ferner durch Western-Blotting auf ihre Reaktivität mit dem CTLA4-Antigen getestet werden. Kurz gesagt, können Zellextrakte aus Zellen, die CTLA-4 exprimieren, hergestellt und der Natriumdodecylsulfatpolyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen werden. Nach der Elektrophorese werden die getrennten Antigene zu Nitrozellulosemembranen übertragen, mit 10 % fetalem Kälberserum blockiert und mit den zu testenden monoklonalen Antikörpern sondiert. Das Binden von humanem IgG kann unter Verwendung von Anti-humanem IgG/alkalische Phosphatase detektiert und mit BCIP/NBT-Substrat-tabletten entwickelt werden (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

Produktion transgener, nicht-humaner Lebewesen, die humane, monoklonale Anti-CTLA-4-Antikörper erzeugen

[0155] Hierin werden transgene, nicht-humane Lebewesen, z. B. transgene Mäuse, offenbart, die humane, monoklonale Antikörper exprimieren können, die spezifisch an CTLA-4 binden. Einige transgene, nicht-humane Lebewesen, z. B. die transgenen Mäuse, verfügen über ein Genom, das ein humanes Schwerekettentransgen und ein Leichtkettentransgen umfaßt. Einige transgene, nicht-humane Lebewesen sind mit einem gereinigten oder angereicherten Präparat aus CTLA-4-Antigen und/oder Zellen, die CTLA-4 exprimieren, immunisiert. Einige transgene, nicht-humane Lebewesen können mehrere Isotypen humaner, monoklonaler Antikörper gegen CTLA-4 produzieren (z. B. IgG, IgA und/oder IgE), indem sie der V-D-J-Rekombination und dem Isotypwechsel unterliegen. Der Isotypwechsel kann z. B. durch klassischen oder nicht-klassischen Isotypwechsel stattfinden.

[0156] Bei einem transgenen, nicht-humanen Lebewesen, das auf Fremdanigenstimulation mit einem heterologen Antikörperrepertoire reagiert, müssen die heterologen Immunoglobulintransgene, die in dem transgenen Lebewesen enthalten sind, den gesamten B-Zellenentwicklungsweg hindurch korrekt funktionieren. Bei einigen Mäusen umfaßt die korrekte Funktion eines heterologen Schwerekettentransgens den Isotypwechsel. Demgemäß sind die Transgene der Erfindung so konstruiert, daß sie den Isotypwechsel und eines oder mehreres von folgendem erzeugen: (1) Über- und Zelltypspezifische Expression, (2) funktionale Genumordnung, (3) Aktivierung von und Antwort auf Allelausschluß, (4) Expression eines ausreichenden primären Repertoires, (5) Signaltransduktion, (6) somatische Übermutation und (7) Dominierung des transgenen Antikörperlokus während der Immunantwort.

[0157] Nicht alle der vorstehenden Kriterien müssen erfüllt werden. Beispielsweise muß bei einem transgenen Lebewesen, bei dem die endogenen Immunoglobulinloki der transgenen Lebewesen funktionell gestört sind, das Transgen keinen Allelausschluß aktivieren. Ferner ist bei transgenen Lebewesen, bei denen das Transgen ein funktionell umgeordnetes Schwer- und/oder Leichtketten-Immunoglobulin-Gen umfaßt, das zweite Kriterium der funktionellen Genumordnung unnötig, zumindest für das Transgen, das bereits umgeordnet ist. Für den Hintergrund der molekularen Immunologie siehe z. B. *Fundamental Immunology*, 4. Aufl. (1998), Paul, William E., Hrsg. Lippencott-Raven Press, N. Y.

[0158] Einige transgene, nicht-humane Lebewesen, die zur Erzeugung der humanen, monoklonalen Antikörper der Erfindung verwendet werden, enthalten umgeordnete, nicht-umgeordnete oder eine Kombination aus umgeordneten und nichtumgeordneten heterologen Schwer- und Leichtketten-Immunoglobulintransgenen in der Keimbahn des transgenen Lebewesens. Jedes der Schwerekettentransgene umfaßt mindestens ein CH-Gen. Überdies kann das Schwerekettentransgen funktionelle Isotypwechselfolgen enthalten, die den Isotypwechsel eines heterologen Transgens, das mehrere CH-Gene in den B-Zellen des transgenen Lebewesens kodiert, fördert. Solche switch-Sequenzen können die sein, die natürlich in dem Keimbahn-Immunoglobulin-Lokus aus der Spezies, die als die Quelle für die transgenen CH-Gene dient, vorkommen, oder solche switch-Sequenzen können aus denen stammen, die in der Spezies, die das Transgenkonstrukt empfangen soll, vorkommen (das transgene Lebewesen). Beispielsweise kann ein humanes Transgenkonstrukt, das zur Produktion einer transgenen Maus verwendet wird, eine höhere Häufigkeit an Isotypwechselevents erzeugen, wenn es switch-Sequenzen enthält, die denen, die natürlich in dem Maus-Schwerekettenlokus vorkommen, ähneln, da die Maus-switch-Sequenzen zur Funktion mit dem Maus-switch-Recombinaseenzymssystem wahrscheinlich optimiert sind, während die humanen switch-Sequenzen es nicht sind. Switch-Sequenzen können durch herkömmliche Klonverfahren isoliert und geklont werden oder können de novo aus überlappenden synthetischen Oligonukleotiden, die auf der Grundlage veröffentlichter Sequenzinformationen in bezug auf Immunoglobulin-switch-Regionsequenzen gestaltet wurden, synthetisiert werden (Mills et al., *Nucl. Acids Res.* 15: 7305–7316 (1991); Sideras et al., *Intl. Immunol.* 1: 631–642 (1989)).

[0159] Bei jedem der vorstehenden transgenen Lebewesen sind funktionell umgeordnete heterologe Schwer- und Leichtketten-Immunoglobulin-Transgene in einer signifikanten Fraktion der B-Zellen des transgenen Lebewesens zu finden (mindestens 10 Prozent).

[0160] Die zur Erzeugung der transgenen Lebewesen der Erfindung verwendeten Transgene umfassen ein Schwerekettentransgen, umfassend DNA, die mindestens ein variables Gensegment, ein Diversität-Gensegment, ein Verbindungs-Gensegment und mindestens ein Gensegment des konstanten Bereiches kodiert. Das Immunoglobulin-Leichtkettentransgen umfaßt DNA, die mindestens ein variables Gensegment, ein Verbindungs-Gensegment und mindestens ein Gensegment des konstanten Bereiches kodiert. Die Gensegmente, die die Leicht- und Schwereketten-gensegmente kodieren, sind dahingehend heterolog zu dem transgenen, nicht-humanen Lebewesen, daß sie aus DNA, die Immunoglobulin-Schwer- und Leichtketten-gensegmente aus einer Spezies, die nicht aus dem transgenen, nicht-humanen Lebewesen besteht, kodiert, stammen oder dieser entsprechen. Das Transgen kann so konstruiert sein, daß die einzelnen Gensegmente nicht umgeordnet sind, d. h. nicht so umgeordnet, daß sie eine funktionelle Immunoglobulin-Leicht- oder -Schwerkette kodieren. Solche nicht-umgeordneten Transgene fördern die Rekombination der V-, D- und J-Gensegmente (funktionelle Umordnung) und fördern bevorzugt die Einführung des gesamten oder eines Teils eines D-Region-Gensegments in die resultierende umgeordnete Immunoglobulin-Schwerkette in dem transgenen, nicht-humanen Lebewesen, wenn es CTLA-4-Antigen ausgesetzt wird.

[0161] Solche Transgene umfassen typischerweise einen wesentlichen Teil der C-, D- und J-Segmente sowie eine Teilgruppe der V-Gensegmente. In solchen Transgenkonstrukten umfassen die verschiedenen Regulierungssequenzen, z. B. Promotoren, Enhancer, Klassenwechselregionen, Spleißdonatoren und Spleiß-Akzeptorsequenzen für die RNA-Prozessierung, Rekombinationssignale und dergleichen, entsprechende Sequenzen

zen aus der heterologen DNA. Solche Regulierungssequenzen können in das Transgen aus derselben oder einer ähnlichen Spezies des verwendeten nicht-humanen Lebewesens eingeführt werden. Beispielsweise können humane Immunoglobulingensegmente in einem Transgen mit einer Nagetier-Immunoglobulin-Enhancersequenz zur Verwendung in einer transgenen Maus kombiniert werden. Alternativ können synthetische Regulierungssequenzen in das Transgen eingeführt werden, wobei solche synthetischen Regulierungssequenzen nicht homolog zu einer funktionellen DNA-Sequenz sind, die bekanntermaßen natürlich in den Genomen von Säugern vorkommt. Synthetische Regulierungssequenzen sind gemäß einheitlichen Regeln, wie beispielsweise denen, die zulässige Sequenzen einer Spleiß-Akzeptorstelle oder eines Promoter/Enhancer-Motivs spezifizieren, gestaltet. Das Transgen kann einen Minilokus umfassen.

[0162] Einige transgene Lebewesen, die zur Erzeugung humaner Antikörper gegen CTLA-4 verwendet werden, enthalten mindestens eine, typischerweise 2–10 und manchmal 25–50 oder mehr Kopien des in Beispiel 37 von US-Patent 5,770,429 beschriebenen Transgens, oder des in Beispiel 2 nachstehend beschriebenen Transgens (z. B. HCo12), mindestens eine Kopie eines Leichtkettentransgens, beschrieben in Beispiel 38 von US-Patent 5,770,429, zwei Kopien der Cmu-Deletion, beschrieben in Beispiel 1 unten, und zwei Kopien der Jkappa-Deletion, beschrieben in Beispiel 9 von US-Patent 5,770,429. Den resultierenden Lebewesen werden Antigene injiziert, und sie werden zur Produktion humaner, monoklonaler Antikörper gegen diese Antigene verwendet.

[0163] Einige transgene Lebewesen zeigen Immunoglobulinproduktion mit einem signifikanten Repertoire, das idealerweise dem einer natürlichen Maus im wesentlichen ähnlich ist. Daher liegen beispielsweise bei Lebewesen, in denen die endogenen Ig-Gene inaktiviert worden sind, die Immunoglobulingesamtkonzentrationen im Bereich von etwa 0,1 bis etwa 10 mg/ml Serum.

[0164] Die von transgenen Mäusen exprimierte Immunoglobuline erkennen typischerweise etwa die Hälfte oder mehr stark antigener Proteine, z. B. das Staphylokokkusprotein A. Typischerweise zeigen die Immunoglobuline eine Assoziationskonstante für vorausgewählte Antigene von mindestens etwa 10^7 M^{-1} , 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} , 10^{11} M^{-1} , 10^{12} M^{-1} , 10^{13} M^{-1} oder größer.

[0165] Transgene Mäuse können mit einem gereinigten oder angereicherten Präparat aus humanem CTLA-4-Antigen (oder einem antigenen Fragment davon) und/oder Zellen, die humanes CTLA-4 exprimieren, wie bereits beschrieben, immunisiert werden. Die Mäuse produzieren B-Zellen, die dem Klassenwechsel via Intra-transgen-switch-Rekombination (cis-Wechsel) unterliegen, und exprimieren mit CTLA-4 reaktive Immunoglobuline. Die Immunoglobuline können Humansequenz-Antikörper sein, in denen die Schwer- und Leichtkettenpolypeptide durch humane Transgensequenzen kodiert sind, die Sequenzen, erhalten durch somatische Mutation und rekombinatorische V-Regionverbindungen, sowie Keimbahn-kodierte Sequenzen umfassen; diese Humansequenz-Immunoglobuline können als im wesentlichen identisch mit einer Polypeptidsequenz, kodiert durch ein humanes VL- oder VH-Gensegment und ein humanes JL- oder JH-Segment, bezeichnet werden, obgleich andere Nicht-Keimbahn-Sequenzen als ein Ergebnis der somatischen Mutation und differentialer V-J- und V-D-J-Rekombinationsverbindungen vorhanden sein können. In bezug auf solche Humansequenz-Antikörper sind die variablen Bereiche jeder Kette üblicherweise zu mindestens 80 Prozent durch humane Keimbahn-V-, -J-, und im Falle von schweren Ketten, -D-Gensegmente kodiert; häufig sind mindestens 85 Prozent der variablen Bereiche durch humane Keimbahnsequenzen, die auf dem Transgen vorliegen, kodiert; oftmals sind 90 oder 95 Prozent oder mehr der Sequenzen des variablen Bereichs durch humane Keimbahnsequenzen, die auf dem Transgen vorliegen, kodiert. Da Nicht-Keimbahnsequenzen jedoch durch somatische Mutation und VJ- und VDJ-Joining eingeführt werden, weisen die Humansequenz-Antikörper häufig einige Sequenzen aus dem variablen Bereich (und weniger häufig Sequenzen aus dem konstanten Bereich) auf, die nicht durch humane V-, D- oder J-Gensegmente kodiert sind, wie sie in dem/den humanen Transgen(en) in der Keimbahn der Mäuse zu finden sind. Üblicherweise sind solche Nicht-Keimbahnsequenzen (oder einzelne Nukleotidpositionen) Cluster in oder nahe CDRs, oder in Bereichen, wo somatische Mutationen bekanntermaßen Cluster bilden.

[0166] Die Humansequenz-Antikörper, die an das vorbestimmte Antigen binden, können aus dem Isotypwechsel resultieren, so daß humane Antikörper produziert werden, die eine Humansequenz- γ -Kette (wie $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ oder $\gamma 4$) und eine Humansequenz-Leichtkette (wie kappa oder lambda) umfassen. Solche Isotypge wechselten Humansequenz-Antikörper enthalten oftmals eine oder mehrere somatische Mutation(en), üblicherweise in dem variablen Bereich und oftmals in oder innerhalb etwa 10 Resten einer CDR) als Ergebnis der Affinitätsreifung und Auswahl von B-Zellen durch Antigen-, insbesondere nach der zweiten (oder nach) Antigenprovokation. Einige Humansequenz-Antikörper mit hoher Affinität haben Gleichgewichtsassoziationskonstanten von mindestens etwa $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ oder mindestens etwa $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, oder mehr als etwa $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$,

oder $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ bis $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ oder größer.

[0167] Ein anderer hierin offenbarer Aspekt befaßt sich mit den B-Zellen aus Mäusen, die zur Erzeugung von Hybridomen, die humane, monoklonale Antikörper exprimieren, die mit hoher Affinität (z. B. mit einer Assoziationskonstante größer als 10^7 M^{-1}) an CTLA-4 binden, verwendet werden können. Diese Hybridome werden zur Erzeugung einer Zusammensetzung verwendet, die ein Immunglobulin mit einer Assoziationskonstante (K_a) von mindestens 10^7 M^{-1} zum Binden von CTLA-4 umfaßt. Solch ein Immunglobulin enthält eine Humansequenz-Leichtkette, bestehend aus einem variablen Leichte-Kette-Bereich mit einer Polypeptidsequenz, die mit einer Polypeptidsequenz, kodiert durch ein humanes V κ - oder V λ -Gensegment und ein humanes J κ - oder J λ -Segment, im wesentlichen identisch ist, und einem konstanten Leichte-Kette-Bereich mit einer Polypeptidsequenz, die mit einer Polypeptidsequenz, kodiert durch ein humanes C κ - oder C λ -Gensegment, im wesentlichen identisch ist. Es enthält ebenso eine Humansequenz-Schwerkette, bestehend aus einem variablen Schwere-Kette-Bereich mit einer Polypeptidsequenz, die mit einer Polypeptidsequenz, kodiert durch ein humanes V H -Gensegment, gegebenenfalls ein D-Bereich, und ein humanes J H -Segment, im wesentlichen identisch ist, und einem konstanten Bereich mit einer Polypeptidsequenz, die mit einer Polypeptidsequenz, kodiert durch ein humanes C H -Gensegment, im wesentlichen identisch ist.

[0168] Hierin werden ebenso humane monoklonale Antikörper und Humansequenz-Antikörper gegen humanes CTLA-4 offenbart, die derivatisiert oder an ein anderes funktionales Molekül, z. B. ein anderes Peptid oder Protein geknüpft sind (z. B. ein Zytokin, ein zytotoxisches Mittel, ein immunstimulierendes oder -hemmendes Mittel, ein Fab'-Fragment und dergleichen, wie oben erörtert), um ein bispezifisches oder multispezifisches Molekül zu erzeugen, daß an mehrere Bindungsstellen oder Zielepitope bindet. Beispielsweise kann ein Antikörper oder ein Antigen-bindender Teil der Erfindung funktionell (z. B. durch chemische Kopplung, genetische Fusion, nicht-kovalente Assoziation oder anderweitig) an eines oder mehrere andere Bindungsmoleküle, wie einen anderen Antikörper, ein Antikörperfragment, ein Peptid oder eine Bindungsnachahmung, geknüpft werden.

[0169] Demgemäß werden hierin bispezifische und multispezifische Zusammensetzungen offenbart, die mindestens einen Humansequenz-Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment mit einer ersten Bindungsspezifität für humanes CTLA-4 und einer zweiten Bindungsspezifität für ein zweites Zielepitop umfassen. Das zweite Zielepitop kann ein Fc-Rezeptor sein, z. B. ein humaner Fc γ RI- oder ein humaner Fc γ -Rezeptor. Daher umfaßt die Erfindung bispezifische und multispezifische Moleküle, die sowohl an Fc γ RI-, Fc γ R- oder Fc ϵ R-exprimierende Effektorzellen (z. B. Monozyten, Makrophagen oder Polymorphonuklearzellen (PMNs)) als auch an Targetzellen, die humanes CTLA-4 exprimieren, binden können. Die multispezifischen (z. B. bispezifischen oder multispezifischen) Moleküle richten Humanes-CTLA-4-exprimierende Zellen auf Effektorzellen und lösen Fc-Rezeptor-vermittelte Effektorzellaktivitäten wie die Phagozytose humanes CTLA-4-exprimierender Zellen, die Antikörper-abhängige, Zell-vermittelte Zytotoxizität (ADCC), die Zytokinfreisetzung oder die Erzeugung von Superoxidanionen aus.

[0170] Die bispezifischen und multispezifischen Moleküle können mindestens einen bindungsspezifischen Antikörper oder ein Antikörperfragment davon, einschließlich eines Fab, Fab', F(ab')₂, Fv oder einkettigen Fv, umfassen. Der Antikörper kann auch ein Leichtketten- oder Schwereketten-dimer oder irgendein minimales Fragment davon wie ein Fv oder ein einkettiges Konstrukt sein, wie beispielsweise in Ladner et al., US-Patent Nr. 4,946,778, beschrieben. Die bispezifischen und multispezifischen Moleküle der Erfindung können eine Bindungsspezifität für ein Fc γ R oder Fc γ R auf der Oberfläche einer Effektorzelle und eine zweite Bindungsspezifität für ein Targetzellantigen, z. B. humanes CTLA-4, aufweisen.

[0171] Die Bindungsspezifität für einen Fc-Rezeptor wird von einem monoklonalen Antikörper, dessen Bindung nicht von humanem Immunglobulin G (IgG) blockiert wird, bereitgestellt. Wie hierin verwendet, bezieht sich der Ausdruck „IgG-Rezeptor“ auf irgendeines der acht γ -Kettengene, die an Chromosom 1 lokalisiert sind. Diese Gene kodieren insgesamt zwölf transmembranöse oder lösliche Rezeptorisoformen, die in drei Fc γ -Rezeptorklassen gruppiert werden: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) und Fc γ RIII (CD16). Beispielsweise kann der Fc γ -Rezeptor ein humanes Fc γ RI mit hoher Affinität sein. Das humane Fc γ RI ist ein 72-kDa-Molekül, das eine hohe Affinität für monomeres IgG zeigt (10^8 bis 10^9 M^{-1}).

[0172] Die Produktion und Charakterisierung dieser bevorzugten monoklonalen Antikörper werden von Fanger et al., in der PCT-Anmeldung WO 88/00052 und in US-Patent Nr. 4,954,617 beschrieben. Diese Antikörper binden an ein Epitop von Fc γ RI, Fc γ RII oder Fc γ RIII an einer Stelle, die sich von der Fc γ -Bindungsstelle des Rezeptors unterscheidet, und daher wird ihre Bindung im wesentlichen nicht von physiologischen Konzentrationen von IgG blockiert. Spezifische Anti-Fc γ RI-Antikörper, die in dieser Erfindung nützlich sind, sind MAb 22, MAb 32, MAb 44, MAb 62 und MAb 197. Das Hybridom, das MAb 32 produziert, ist aus der American Type

Culture Collection, ATCC, Hinterlegungsnummer HB9469, erhältlich. Anti-FcγRI-MAb 22, F(ab')₂-Fragmente von MAb 22 sind von Medarex, Inc. (Annandale, N. J.) erhältlich. Der Anti-Fcγ-Rezeptor-Antikörper kann ebenso eine humanisierte Form eines monoklonalen Antikörpers 22 (H22) sein. Die Produktion und Charakterisierung des H22-Antikörpers wird in Graziano (1995) J. Immunol 155: 4996–5002 und PCT/US93/10384 (WO 94/10332) beschrieben. Die H22-Antikörper-produzierende Zelllinie wurde bei der American Type Culture Collection am 4. November 1992 unter der Kennzeichnung HA022CL1 hinterlegt und hat die Hinterlegungsnummer CRL 11177.

[0173] Die Bindungsspezifität für einen Fc-Rezeptor kann auch von einem Antikörper bereitgestellt werden, der an einen Rezeptor für humanes IgA, z. B. einen Fc-alpha-Rezeptor (FcαR (CD89)), bindet. Bevorzugt bindet der Antikörper an einen Rezeptor für humanes IgA an einer Stelle, die nicht von endogenem IgA blockiert wird. Der Ausdruck „IgA-Rezeptor“ soll das Genprodukt von einem α-Gen (FcαRI) an Chromosom 19 umfassen. Dieses Gen kodiert bekanntermaßen mehrere alternativ gespleißte Transmembranisoformen von 55 bis 110 kDa. FcαRI (CD89) wird konstitutiv auf Monozyten/Makrophagen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, jedoch nicht auf Nicht-Effektorzellpopulationen exprimiert. FcαRI hat eine mittlere Affinität ($\approx 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) sowohl für IgA1 als auch IgA2, die sich bei der Aussetzung zu Zytokinen wie G-CSF oder GM-CSF erhöht (Morton (1996) Critical Reviews in Immunology 16: 423–440). Vier FcαRI-spezifische monoklonale Antikörper, identifiziert als A3, A59, A62 und A77, die FcαRI außerhalb der IgA-Liganden-bindenden Domäne bindet, sind beispielsweise von Monteiro (1992) J. Immunol. 148: 1764 beschrieben worden.

[0174] Bispezifische und multispezifische Moleküle können ferner eine Bindungsspezifität umfassen, die ein Targetzellantigen, z. B. humanes CTLA-4, erkennt, beispielsweise daran bindet. Die Bindungsspezifität wird von einem Humansequenz-Antikörper oder einem humanen monoklonalen Antikörper der vorliegenden Erfindung geliefert.

[0175] Ein „Effektorzellen-spezifischer Antikörper“, wie hierin verwendet, bezieht sich auf einen Antikörper oder ein funktionelles Antikörperfragment, der/das den Fc-Rezeptor von Effektorzellen bindet. Bevorzugte Antikörper zur Verwendung in Verbindung mit der vorliegenden Erfindung binden den Fc-Rezeptor von Effektorzellen an einer Stelle, die nicht durch endogenes Immunoglobulin gebunden ist.

[0176] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Ausdruck „Effektorzelle“ auf eine Immunzelle, die in die Effektorphase einer Immunantwort involviert ist, im Gegensatz zu kognitiven und Aktivierungsphasen einer Immunantwort. Exemplarische Immunzellen umfassen eine Zelle myeloiden oder lymphoiden Ursprungs, z. B. Lymphozyten (z. B. B-Zellen und T-Zellen, einschließlich zytolytischer T-Zellen (CTLs)), Killerzellen, natürliche Killerzellen, Makrophagen, Monozyten, Eosinophile, Neutrophile, polymorphonukleäre Zellen, Granulozyten, Mastzellen und Basophile. Effektorzellen exprimieren spezifische Fc-Rezeptoren und üben spezifische Immunfunktionen aus. Eine Effektorzelle kann antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) induzieren, z. B. ein Neutrophil, das ADCC induzieren kann. Beispielsweise sind Monozyten, Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile und Lymphozyten, die FcαR exprimieren, in die spezifische Tötung von Targetzellen und das Präsentieren von Antigenen an andere Komponenten des Immunsystems oder die Bindung an Zellen, die Antigene präsentieren, involviert. Eine Effektorzelle kann auch ein Zielantigen, eine Targetzelle oder einen Mikroorganismus phagozytieren.

[0177] Die Expression eines bestimmten FcR auf einer Effektorzelle kann durch humorale Faktoren wie Zytokine reguliert werden. Beispielsweise ist herausgefunden worden, daß die Expression von FcγRI durch Interferon gamma (IFN-γ) hochreguliert wird. Diese verstärkte Expression steigert die zytotoxische Aktivität (einschließlich z. B. die Phagozytose) durch FcγRI-tragende Zellen gegen Targetzellen.

[0178] Unter „Targetzelle“ ist irgendeine unerwünschte Zelle in einem Individuum (z. B. einem Menschen oder einem Tier), die mit einer Zusammensetzung anvisiert werden kann (z. B. einem Humansequenz-Antikörper oder einem humanen monoklonalen Antikörper der Erfindung, einem bispezifischen oder einem multispezifischen Molekül der Erfindung), zu verstehen. Die Targetzelle kann eine Zelle sein, die humanes CTLA-4 exprimiert oder überexprimiert. Zellen, die humanes CTLA-4 exprimieren, können Tumorzellen, z. B. Lymphome, umfassen.

[0179] Zusätzlich zu den Humansequenz-Antikörper und humanen monoklonalen Antikörpern der Erfindung können auch andere Antikörper in den bispezifischen oder multispezifischen Molekülen eingesetzt werden, die beispielsweise Maus-, chimäre und humanisierte monoklonale Antikörper umfassen.

[0180] Chimäre Maus-humane monoklonale Antikörper (d. h., chimäre Antikörper) können durch rekombinan-

te DNA-Techniken, die in der Technik bekannt sind, hergestellt werden. Beispielsweise wird ein Gen, das den konstanten Bereich von Fc eines monoklonalen Antikörpermoleküls einer Maus (oder einer anderen Spezies) kodiert, mit Restriktionsenzymen digeriert, um den Bereich, der das Maus-Fc kodiert, zu entfernen, und der äquivalente Teil eines Gens, das den konstanten Bereich eines humanen Fc kodiert, wird substituiert. (Siehe z. B. Robinson et al., internationale Patentveröffentlichung PCT/US86/02269 (WO 87/02671); Akira, et al., europäische Patentanmeldung 184,187; Taniguchi, M., europäische Patentanmeldung 171,496; Morrison et al., europäische Patentanmeldung 173,494; Neuberger et al., internationale Anmeldung WO 86/01533; Cabilly et al., US-Patent Nr. 4,816,567; Cabilly et al., europäische Patentanmeldung 125,023; Better (1988) Science 240: 1041–1043; Liu (1987) PNAS 84: 3439–3443; Liu (1987) J. Immunol. 139: 3521–3526; Sun (1987) PNAS 84: 214–218; Nishimura (1987) Canc. Res. 47: 999–1005; Wood (1985) Nature 314: 446–449; Shaw (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80: 1553–1559).

[0181] Der chimäre Antikörper kann ferner durch den Austausch von Sequenzen des variablen Bereiches von Fv, die nicht direkt in die Antigenbindung involviert sind, mit äquivalenten Sequenzen aus variablen Bereichen von humanem Fv humanisiert werden. Allgemeine Überblicke über humanisierte chimäre Antikörper werden von Morrison (1985) Science 229: 1202–1207 und von Oi (1986) Bio Techniques 4: 214 bereitgestellt. Diese Verfahren umfassen die Isolierung, Manipulation und Exprimierung der Nukleinsäuresequenzen, die alle oder einen Teil der variablen Bereiche von Immunoglobulin Fv kodieren, aus mindestens einer von einer schweren oder leichten Kette. Quellen für die Nukleinsäure sind einem Fachmann bekannt und sind beispielsweise aus 7E3, einem Anti-GPII_bIII_a-Antikörper-produzierenden Hybridom erhältlich. Die rekombinante DNA, die den chimären Antikörper oder ein Fragment davon kodiert, kann in einen geeigneten Expressionsvektor geklont werden. Geeignete humanisierte Antikörper können alternativ durch CDR-Substitution produziert werden, US-Patent 5,225,539; Jones (1986) Nature 321: 552–525; Verhoeyan et al., 1988 Science 239: 1534; und Beidler (1988) J. Immunol. 141: 4053–4060.

[0182] Alle CDRs eines bestimmten humanen Antikörpers können mit zumindest einem Teil eines nicht-humanen CDR ausgetauscht werden, oder nur einige der CDRs können mit nicht-humanen CDRs ausgetauscht werden. Man muß lediglich die Anzahl der CDRs, die für das Binden des humanisierten Antikörpers an den Fc-Rezeptor erforderlich ist, austauschen. Ein Antikörper kann durch irgendein Verfahren humanisiert werden, mit dem zumindest ein Teil eines CDR eines humanen Antikörpers mit einem CDR aus einem nicht-humanen Antikörper ausgetauscht werden kann. Winter beschreibt ein Verfahren, das zur Herstellung der humanisierten Antikörper der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann, siehe UK-Patentanmeldung GB 2188638A, eingereicht am 26. März 1987. Die humanen CDRs können mit nicht-humanen CDRs unter Verwendung von ortsgerechter Oligonukleotidmutagenese ausgetauscht werden, wie beispielsweise in WO 94/10332 mit dem Titel „Humanized Antibodies to Fc Receptors for Immunoglobulin G on Human Mononuclear Phagocytes“ beschrieben.

[0183] Chimäre und humanisierte Antikörper, in denen spezifische Aminosäuren substituiert, entfernt oder hinzugefügt worden sind, liegen ebenso im Umfang dieser Offenbarung. Beispielsweise können humanisierte Antikörper Aminosäuresubstitutionen in der Gerüstregion aufweisen, um die Bindung an das Antigen zu verbessern. In einem humanisierten Antikörper mit Maus-CDRs können Aminosäuren, die in der humanen Gerüstregion lokalisiert sind, durch Aminosäuren, die an den entsprechenden Positionen in dem Maus-Antikörper lokalisiert sind, ersetzt werden. Solche Substitutionen verbessern bekanntermaßen in einigen Fällen das Binden humanisierter Antikörper an das Antigen. Antikörper, zu denen Aminosäuren hinzugefügt, daraus entfernt oder die substituiert worden sind, werden hierin als modifizierte Antikörper oder veränderte Antikörper bezeichnet.

[0184] Bispezifische und multispezifische Moleküle, wie hierin offenbart, können ferner eine dritte Bindungsspezifität zusätzlich zu einer Anti-Fc-Bindungsspezifität und einer Anti-humanen-CTLA-4-Bindungsspezifität umfassen. Die dritte Bindungsspezifität kann ein Anti-Verstärkungsfaktor-Teil (EF-Teil) sein, z. B. ein Molekül, das an ein Oberflächenprotein bindet, das in die zytotoxische Aktivität involviert ist, und so die Immunantwort gegen die Targetzelle steigert. Der „Anti-Verstärkungsfaktor-Teil“ kann ein Antikörper, funktionelles Antikörperfragment oder ein Ligand sein, der an ein gegebenes Molekül, z. B. ein Antigen oder einen Rezeptor, bindet und so zu einer Verstärkung der Wirkung der Bindungsdeterminanten für den Fc-Rezeptor oder das Targetzellen-Antigen führt. Der „Anti-Verstärkungsfaktor-Teil“ kann an einen Fc-Rezeptor oder ein Targetzellen-Antigen binden. Alternativ kann der Anti-Verstärkungsfaktorteil an ein Gebilde binden, das sich von dem Gebilde, an das die erste und zweite Bindungsspezifität bindet, unterscheidet. Beispielsweise kann der Anti-Verstärkungsfaktor-Teil beispielsweise über CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 oder andere Immunzellenmoleküle, die in eine gesteigerte Immunantwort gegen die Targetzelle involviert ist, an eine zytotoxische T-Zelle binden.

[0185] Die hierin offenbarten bispezifischen und multispezifischen Moleküle können unter Verwendung chemischer Techniken (siehe z. B. Kranz (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 5807), „Polydom“-Techniken (siehe z. B. US-Patent 4,474,893) oder rekombinanter DNA-Techniken erzeugt werden. Bispezifische und multispezifische Moleküle können auch durch Konjugieren der Konstituent-Bindungsspezifitäten, z. B. der Anti-FcR- und Anti-humanes-CTLA-4-Bindungsspezifitäten, unter Verwendung von Verfahren, die in der Technik bekannt und wie hierin beschrieben sind, hergestellt werden. Beispielsweise kann jede Bindungsspezifität des bispezifischen und multispezifischen Moleküls separat erzeugt und dann an eine andere konjugiert werden. Sind die Bindungsspezifitäten Proteine oder Peptide, kann eine Vielzahl von Kopplungs- oder Vernetzungsmitteln für die kovalente Konjugation verwendet werden. Beispiele für Vernetzungsmittel umfassen Protein A, Carbodimid, N-Succinimidyl-S-acetyl-thioacetat (SATA), N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP) und Sulfo-succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat (Sulfo-SMCC) (siehe z. B. Karpovsky (1984) J. Exp. Med. 160: 1686; Liu (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8648). Andere Verfahren umfassen die von Paulus (Behring Ins. Mitt. (1985) Nr. 78,118–132; Brennan (1985) Science 229: 81–83), Glennie (1987) J. Immunol. 139: 2367–2375) beschriebenen. Andere Konjugationsmittel sind SATA und Sulfo-SMCC, beide erhältlich von Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

[0186] Sind die Bindungsspezifitäten Antikörper (z. B. zwei humanisierte Antikörper), können sie über Sulfhydryl-Binden der C-Terminus-Gelenkregionen der beiden schweren Ketten konjugiert werden. Die Gelenkregion kann so modifiziert sein, daß sie vor der Konjugation eine ungerade Zahl an Sulfhydrylresten, z. B. eins, enthält.

[0187] Alternativ können beide Bindungsspezifitäten in demselben Vektor kodiert und in derselben Wirtszelle exprimiert und vereinigt werden. Dieses Verfahren ist besonders nützlich, wenn das bispezifische und multispezifische Molekül ein MAb × MAb, MAb × Fab, Fab × F(ab')₂ oder Ligand × Fab-Fusionsprotein ist. Ein bispezifisches und multispezifisches Molekül der Erfindung, z. B. ein bispezifisches Molekül, kann ein einkettiges Molekül, wie ein einkettiger bispezifischer Antikörper, ein einkettiges bispezifisches Molekül, umfassend einen einkettigen Antikörper und eine Bindungsdeterminante, oder ein einkettiges bispezifisches Molekül, umfassend zwei Bindungsdeterminanten, sein. Bispezifische und multispezifische Moleküle können ebenso einkettige Moleküle sein oder können mindestens zwei einkettige Moleküle umfassen. Verfahren zur Herstellung bi- und multispezifischer Moleküle werden beispielsweise in US-Patent Nr. 5,260,203; US-Patent Nr. 5,455,030; US-Patent Nr. 4,881,175; US-Patent Nr. 5,132,405; US-Patent Nr. 5,091,513; US-Patent Nr. 5,476,786; US-Patent Nr. 5,013,653; US-Patent Nr. 5,258,498 und US-Patent Nr. 5,482,858 beschrieben.

[0188] Das Binden der bispezifischen and multispezifischen Moleküle an ihre spezifischen Targets kann durch einen heterologen Enzymimmuntest (ELISA), einen Radioimmunassay (RIA) oder einen Western-Blot-Assay bestätigt werden. Jeder dieser Assays detektiert im allgemeinen die Gegenwart von Protein-Antikörper-Komplexen von besonderem Interesse, indem er ein markiertes Reagens (z. B. einen Antikörper), das für den in Frage stehenden Komplex spezifisch ist, einsetzt. Beispielsweise können die FcR-Antikörper-Komplexe unter Verwendung eines enzymgekoppelten Antikörpers oder Antikörperfragments, das die Antikörper-FcR-Komplexe erkennt und spezifisch daran bindet, detektiert werden. Alternativ können die Komplexe unter Verwendung irgendeines einer Vielzahl anderer Immunassays detektiert werden. Beispielsweise kann der Antikörper radioaktiv markiert und in einem Radioimmunassay (RIA) verwendet werden (siehe zum Beispiel Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, März, 1986). Das radioaktive Isotop kann durch solche Mittel wie die Verwendung eines γ -Zählers oder eines Szintillationszählers oder durch Autoradiographie detektiert werden.

[0189] In der vorliegenden Offenbarung ebenso enthalten sind modifizierte Antikörper. Der Ausdruck „modifizierter Antikörper“ umfaßt Antikörper wie monoklonale Antikörper, chimäre Antikörper und humanisierte Antikörper, die beispielsweise durch Deletion, Hinzufügung oder Substitution von Teilen des Antikörpers modifiziert worden sind. Beispielsweise kann ein Antikörper durch Deletion des konstanten Bereiches und Ersetzen dieses durch einen konstanten Bereich, der die Halbwertszeit, z. B. Serum-Halbwertszeit, die Stabilität oder Affinität des Antikörpers verlängern soll, modifiziert werden.

[0190] Die hierin offenbarten Antikörperkonjugate können zur Modifikation einer gegebenen biologischen Antwort oder Erzeugung einer biologischen Antwort (z. B. zur Rekrutierung von Effektorzellen) verwendet werden. Die Arzneimittelereinheit ist nicht auf klassische chemische Therapeutika beschränkt. Beispielsweise kann die Arzneimittelereinheit ein Protein oder Polypeptid sein, das eine gewünschte biologische Aktivität besitzt. Solche Proteine können beispielsweise ein enzymatisch aktives Toxin oder ein aktives Fragment davon, wie Abrin, Ricin A, Pseudomonasexotoxin oder Diphtherietoxin; ein Protein wie Tumor-Nekrose-Faktor oder Interferon-alpha; oder Modifikatoren der biologischen Antwort wie zum Beispiel Lymphokine, Interleukin-1 („IL-1“), Interleu-

kin-2 („IL-2“), Interleukin-6 („IL-6“), Granulozytenmakrophagenkolonie-stimulierenden Faktor („GM-CSF“), Granulozytenkolonie-stimulierenden Faktor („G-CSF“) oder andere Wachstumsfaktoren umfassen.

[0191] Techniken zur Konjugation einer solchen therapeutischen Einheit an Antikörper sind allgemein bekannt, siehe z. B. Arnon et al., „Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy“, in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al., (Hrsg.), S. 243–56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., „Antibodies For Drug Delivery“, in *Controlled Drug Delivery* (2. Aufl.), Robinson et al., (Hrsg.), S. 623–53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, „Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review“, in *Monoclonal Antibodies'84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al., (Hrsg.), S. 475–506 (1985); „Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibodies In Cancer Therapy“, in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al., (Hrsg.), S. 303–16 (Academic Press 1985) und Thorpe et al., „The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates“, *Immunol. Rev.*, 62: 119–58 (1982).

Pharmazeutische Zusammensetzungen

[0192] Die Erfindung liefert pharmazeutische Zusammensetzungen, umfassend einen oder eine Kombination aus humanen monoklonalen Antikörpern und/oder Humansequenz-Antikörpern (intakte oder Bindungsfragmente), die zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger formuliert sind. Einige Zusammensetzungen können eine Kombination aus mehreren (z. B. zwei oder mehr) isolierten humanen Antikörpern und/oder Humansequenz-Antikörpern oder Antigen-bindenden Teilen davon der Erfindung umfassen. In einigen Zusammensetzungen ist jeder der Antikörper oder Antigen-bindenden Teile davon der Zusammensetzung ein monoklonaler Antikörper oder ein Humansequenz-Antikörper, der an ein gesondertes, vorausgewähltes Epitop von humanem CTLA-4 bindet.

A. Wirksame Dosierungen

[0193] Die Dosierregime werden so eingestellt, daß die optimale gewünschte Antwort geliefert wird (z. B. eine therapeutische Antwort). Beispielsweise kann eine einzelne Pille verabreicht werden, es können mehrere geteilte Dosen über eine gewisse Zeit verabreicht werden, oder die Dosis kann proportional reduziert oder erhöht werden, je nachdem, wie es die therapeutische Situation erfordert. Besonders vorteilhaft ist die Formulierung parenteraler Zusammensetzungen in Einheitsdosierungsformen, um die Verabreichung und Einheitlichkeit der Dosierung zu erleichtern. Einheitsdosierungsform bezieht sich, wie hierin verwendet, auf physisch getrennte Einheiten, die als Einheitsdosierungen für die zu behandelnden Individuen geeignet sind; jede Einheit enthält eine vorbestimmte Menge einer aktiven Verbindung, die so kalkuliert ist, daß sie in Verbindung mit dem erforderlichen pharmazeutischen Träger die gewünschte therapeutische Wirkung liefert. Die Beschreibung der Einheitsdosierungsformen der Erfindung wird (a) von einzigartigen Merkmalen der aktiven Verbindung und der bestimmten zu erreichenden therapeutischen Wirkung und (b) den Einschränkungen durch die Technik zum Kompoundieren einer solchen aktiven Verbindung zur Behandlung der Sensibilität in Individuen vorgegeben und ist auch direkt davon abhängig.

[0194] Beispiele für pharmazeutisch verträgliche Antioxidationsmittel umfassen: (1) wasserlösliche Antioxidationsmittel wie Ascorbinsäure, Cysteinhydrochlorid, Natriumbisulfat, Natriummetabisulfit, Natriumsulfit und dergleichen; (2) öllösliche Antioxidationsmittel, wie Ascorbylpalmitat, butyliertes Hydroxyanisol (BHA), butyliertes Hydroxytoluol (BHT), Lezithin, Propylgallat, alpha-Tocopherol und dergleichen; und (3) Metallchelatabbildner wie Zitronensäure, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Sorbitol, Weinsäure, Phosphorsäure und dergleichen.

[0195] Ungeachtet des gewählten Verabreichungsweges werden die Verbindungen der vorliegenden Erfindung, die in einer geeigneten hydratisierten Form verwendet werden können, und/oder die pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung durch herkömmliche, einem Fachmann bekannte Verfahren zu pharmazeutisch verträglichen Dosierungsformen formuliert.

[0196] Die tatsächlichen Dosiskonzentrationen der Wirkstoffe in den pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können so variiert werden, daß eine Menge des Wirkstoffes erhalten wird, mit der die gewünschte therapeutische Antwort für einen bestimmten Patienten, eine Zusammensetzung und einen Verabreichungsmodus, erreicht werden kann, ohne daß sie für den Patienten toxisch ist. Die gewählte Dosiskonzentration hängt von einer Vielzahl pharmakokinetischer Faktoren ab, einschließlich der Aktivität der bestimmten eingesetzten Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung oder des Esters, Salzes oder Amids davon, dem Verabreichungsweg, der Verabreichungszeit, der Exkretionsrate der bestimmten eingesetzten Verbindung, der Dauer der Behandlung, anderer Arzneimittel, Verbindungen und/oder Materialien, die in Kom-

bination mit den bestimmten eingesetzten Zusammensetzungen verwendet werden, dem Alter, Geschlecht, Gewicht, der Verfassung, dem allgemeinen Gesundheitszustand und der medizinischen Vorgeschichte des behandelten Patienten und ähnlichen Faktoren.

[0197] Ein Arzt oder Veterinär kann mit Dosen der Verbindungen der Erfindung, die in der pharmazeutischen Zusammensetzung eingesetzt werden, bei Konzentrationen beginnen, die niedriger sind als die, mit denen die gewünschte therapeutische Wirkung erreicht wird, und die Dosis schrittweise erhöhen, bis die gewünschte Wirkung erreicht ist. Im allgemeinen ist eine geeignete tägliche Dosis der Zusammensetzungen der Erfindung die kleinste Menge der Verbindung, mit der eine therapeutische Wirkung erzeugt wird. Solch eine wirksame Dosis hängt im allgemeinen von den oben beschriebenen Faktoren ab. Die Verabreichung findet bevorzugt intravenös, intramuskulär, intraperitoneal oder subkutan oder proximal zur Zielstelle statt. Nach Bedarf kann die wirksame tägliche Dosis einer therapeutischen Zusammensetzung als zwei, drei, vier, fünf, sechs oder mehr Teildosen separat in geeigneten Abständen über den Tag verteilt, gegebenenfalls in Einheitsdosierungsformen, verabreicht werden. Während eine Verbindung der vorliegenden Erfindung allein verabreicht werden kann, wird die Verbindung bevorzugt als eine pharmazeutische Formulierung (Zusammensetzung) verabreicht.

[0198] Wirksame Dosen der Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung zur Behandlung der hierin beschriebenen immunbezogenen Zustände und Krankheiten variieren in Abhängigkeit vieler unterschiedlicher Faktoren, einschließlich der Verabreichungsmittel, der Zielstelle, des physiologischen Zustandes des Patienten, ob der Patient ein Mensch oder ein Tier ist, anderer verabreichter Medikationen und, ob die Behandlung prophylaktisch oder therapeutisch ist. Die Behandlungsdosierungen müssen zur Optimierung der Sicherheit und Effektivität titriert werden.

[0199] Zur Verabreichung mit einem Antikörper liegt die Dosierung in einem Bereich von etwa 0,0001 bis 100 mg/kg, üblicherweise 0,01 bis 5 mg/kg des Wirts-Körpergewichtes. Beispielsweise können die Dosierungen 1 mg/kg Körpergewicht oder 10 mg/kg Körpergewicht betragen oder in einem Bereich von 1 bis 10 mg/kg liegen. Ein exemplarisches Behandlungsregime umfaßt die Verabreichung einmal alle zwei Wochen oder einmal im Monat oder einmal alle 3 bis 6 Monate. In einigen Verfahren werden zwei oder mehr monoklonale Antikörper mit unterschiedlichen Bindungsspezifitäten gleichzeitig verabreicht, wobei in diesem Fall die Dosierung jedes verabreichten Antikörpers in die angezeigten Bereiche fällt. Der Antikörper wird für gewöhnlich mehrere Male verabreicht. Die Abstände zwischen einzelnen Dosen können wöchentlich, monatlich oder jährlich sein. Die Abstände können auch unregelmäßig sein, wenn durch Messung der Konzentrationen an Antikörper gegen CTLA-4 im Blut des Patienten angezeigt. In einigen Verfahren wird die Dosis so eingestellt, daß eine Plasma-Antikörperkonzentration von 1–1.000 µg/ml und in einigen Verfahren 25–300 µg/ml erreicht wird. Alternativ kann der Antikörper als eine sich verzögert freisetzende Formulierung verabreicht werden, wobei in diesem Fall eine weniger häufige Verabreichung erforderlich ist. Dosierung und Häufigkeit variieren in Abhängigkeit der Halbwertszeit des Antikörpers in dem Patienten. Im allgemeinen zeigen humane Antikörper die längste Halbwertszeit, gefolgt von humanisierten Antikörpern, chimären Antikörpern und nicht-humanen Antikörpern. Die Dosierung und Häufigkeit der Verabreichung kann in Abhängigkeit davon, ob die Behandlung prophylaktisch oder therapeutisch ist, variieren. In prophylaktischen Anwendungen wird eine relativ geringe Dosis in relativ langen Abständen über einen langen Zeitraum verabreicht. Einige Patienten werden den Rest ihres Lebens behandelt. In therapeutischen Anwendungen ist manchmal eine relativ hohe Dosis in relativ kurzen Abständen erforderlich, bis das Fortschreiten der Krankheit verringert oder beendet ist, und bevorzugt bis der Patient eine teilweise oder komplette Besserung der Symptome der Krankheit zeigt. Danach kann dem Patienten ein prophylaktisches Regime verabreicht werden.

[0200] Die Dosen für Nukleinsäuren, die Immunogene kodieren, liegen im Bereich von etwa 10 ng bis 1 g, 100 ng bis 100 mg, 1 µg bis 10 mg oder 30–300 µg DNA pro Patient. Die Dosen für infektiöse virale Vektoren variieren von 10–100 oder mehr Virionen pro Dosis.

[0201] Einige Humansequenz-Antikörper und humane monoklonale Antikörper der Erfindung können so formuliert werden, daß eine geeignete Verteilung in vivo sichergestellt ist. Beispielsweise schließt die Blut-Hirn-Schranke (BBB) viele stark hydrophile Verbindungen aus. Um sicherzugehen, daß die therapeutischen Verbindungen der Erfindung die BBB (wenn gewünscht) überwinden, können sie beispielsweise in Liposomen formuliert werden. Für Verfahren zur Herstellung von Liposomen, siehe z. B. US-Patente 4,522,811; 5,374,548 und 5,399,331. Die Liposome können eine oder mehrere Einheiten umfassen, die selektiv in spezifische Zellen oder Organe transportiert werden und so die angestrebte Arzneimittelabgabe steigern (Siehe z. B. V. V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29: 685). Exemplarische zielführende Einheiten umfassen Folat oder Biotin (siehe z. B. US-Patent 5,416,016, von Low et al.); Mannoside (Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153: 1038); Antikörper (P. G. Bloeman et al., (1995) FEBS Lett. 357: 140; M. Owais

et al., (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 180); oberflächenaktiven Protein A-Rezeptor (Briscoe et al., (1995) *Am. J. Physiol.* 1233: 134), verschiedene Arten, die die Formulierungen der Erfindung sowie Komponenten der erfundenen Moleküle umfassen; S. 120 (Schreier et al., (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 9090); siehe auch K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346: 123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4: 273. In einigen Verfahren werden die therapeutischen Verbindungen der Erfindung in Liposomen formuliert; in einer stärker bevorzugten Ausführungsform umfassen die Liposome eine zielführende Einheit. In einigen Verfahren werden die therapeutischen Verbindungen in den Liposomen durch Bolusinjektion in eine Stelle, proximal zum Tumor oder der Infektion, abgegeben. Die Zusammensetzung sollte so flüssig sein, daß sie leicht gespritzt werden kann. Sie sollte unter Herstellungs- und Lagerbedingungen stabil sein und sollte gegen die Kontaminierung durch Mikroorganismen wie Bakterien oder Pilze geschützt sein.

[0202] Für therapeutische Anwendungen werden die pharmazeutischen Zusammensetzungen einem Patienten, der an einer festgestellten Krankheit leidet, in einer Menge verabreicht, die ausreicht, um die Weiterentwicklung aufzuhalten oder zu hemmen oder die Krankheit, ihre Symptome oder biochemischen Marker umzukehren oder zu eliminieren. Für prophylaktische Anwendungen werden die pharmazeutischen Zusammensetzungen einem Patienten, der für eine Krankheit anfällig oder gefährdet ist, in einer Menge verabreicht, die ausreicht, um die Entwicklung der Krankheit, ihrer Symptome und biochemischen Marker zu verzögern, zu hemmen oder zu verhindern. Eine hierfür adäquate Menge ist als eine „therapeutisch wirksame Dosis“ oder „prophylaktisch wirksame Dosis“ definiert. Die Dosierung hängt von der zu behandelnden Krankheit, der Größe des Individuums, der Schwere der Symptome des Individuums und der jeweils ausgewählten Zusammensetzung oder des Verabreichungsweges ab. Genauer gesagt, kann bei der Behandlung von Tumoren eine „therapeutisch wirksame Dosis“ das Tumorwachstum um mindestens etwa 20 % oder mindestens etwa 40 % oder mindestens etwa 60 % oder mindestens etwa 80 %, bezogen auf unbehandelte Individuen, hemmen. Die Fähigkeit einer Verbindung, Krebs zu hemmen, kann in einem Tiermodellsystem, das auf die Wirksamkeit in humanen Tumoren schließen läßt, bewertet werden. Alternativ kann diese Eigenschaft einer Zusammensetzung durch die Überprüfung der Fähigkeit der Verbindung, zu hemmen, durch herkömmliche Assays *in vitro* bewertet werden. Eine therapeutisch wirksame Menge einer therapeutischen Verbindung kann die Tumorgröße verringern oder anderweitig die Symptome in einem Individuum verbessern.

[0203] Die Zusammensetzung sollte so steril und flüssig sein, daß sie durch eine Spritze abgegeben werden kann. Neben Wasser kann der Träger eine isotonische gepufferte Kochsalzlösung, Ethanol, Polyol (beispielsweise Glycerol, Propylenglykol und flüssiges Polyethylenglykol und dergleichen) und geeignete Gemische davon sein. Die richtige Fluidität kann beispielsweise unter Verwendung einer Beschichtung wie Lecithin, unter Beibehaltung der erforderlichen Teilchengröße im Falle von Dispersion und unter Verwendung oberflächenaktiver Mittel aufrechterhalten werden. In vielen Fällen sind bevorzugt isotonische Mittel, beispielsweise Zucker, Polyalkohole, wie Mannitol oder Sorbitol, und Natriumchlorid in der Zusammensetzung enthalten. Die Langzeitabsorption der injizierbaren Zusammensetzungen kann durch den Einschluß eines Mittels, das die Absorption verzögert, zum Beispiel Aluminiummonostearat oder Gelatine, bewirkt werden.

[0204] Ist die aktive Verbindung geeignet geschützt, wie oben beschrieben, kann sie oral, beispielsweise mit einem inerten Verdünnungsmittel oder einem assimilierbaren eßbaren Träger, verabreicht werden.

B. Verabreichungswege

[0205] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen der Erfindung können auch in Kombinationstherapie, das heißt, kombiniert mit anderen Mitteln, verabreicht werden. Bei der Behandlung von Krebs kann die Kombinationstherapie beispielsweise eine Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung mit mindestens einem Anti-Tumor-Mittel oder einer anderen herkömmlichen Therapie, wie Bestrahlung, umfassen.

[0206] Pharmazeutisch verträgliche Träger umfassen Lösungsmittel, Dispersionsmedien, Beschichtungen, Bakterizide und Fungizide, isotonische und die Absorption verzögernde Mittel und dergleichen, die physiologisch kompatibel sind. Der Träger kann geeigneterweise intravenös, intramuskulär, subkutan, parenteral, spinal oder epidermal verabreicht werden (z. B. durch Injektion oder Infusion). In Abhängigkeit des Verabreichungsweges kann die aktive Verbindung, d. h. der Antikörper, das bispezifische und multispezifische Molekül, in ein Material eingehüllt werden, um die Verbindung vor Säuren und anderen natürlichen Bedingungen, die die Verbindung inaktivieren könnten, zu schützen.

[0207] Ein „pharmazeutisch verträgliches Salz“ bezieht sich auf ein Salz, daß die gewünschte biologische Aktivität der Stammverbindung beibehält und keine unerwünschten toxikologischen Wirkungen hat (siehe z. B. Berge, S. M., et al., (1977) *J. Pharm. Sci.* 66: 1–19). Beispiele für solche Salze umfassen Säureadditionssalze

und Basenadditionssalze. Säureadditionssalze umfassen die aus nicht-toxischen anorganischen Säuren wie Salz-, Salpeter-, Phosphor-, Schwefel-, Bromwasserstoff-, Iodwasserstoff-, Phosphonsäuren und dergleichen, sowie aus nicht-toxischen organischen Säuren wie aliphatischen Mono- und Dicarbonsäuren, Phenyl-substituierten Alkansäuren, Hydroxyalkansäuren, aromatischen Säuren, aliphatischen und aromatischen Sulfonsäuren und dergleichen abgeleiteten. Basenadditionssalze umfassen die aus Erdalkalimetallen wie Natrium, Kalium, Magnesium, Calcium und dergleichen, sowie nicht-toxischen organischen Aminen wie N,N'-Dibenzylethylendiamin, N-Methylglucamin, Chlorprocain, Cholin, Diethanolamin, Ethylendiamin, Procain und dergleichen abgeleiteten.

[0208] Eine Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung kann durch eine Vielzahl von Verfahren, die in der Technik bekannt sind, verabreicht werden. Der Verabreichungsweg und/oder -modus variiert in Abhängigkeit der gewünschten Ergebnisse. Die aktiven Verbindungen können mit Trägern hergestellt werden, die die Verbindung vor schneller Freisetzung schützen, wie eine Formulierung mit kontrollierter Freisetzung, einschließlich Implantate, transdermale Pflaster und mikroeingekapselte Abgabesysteme. Biologisch abbaubare, biokompatible Polymere können verwendet werden, wie Ethylenvinylacetat, Polyanhydride, Polyglycolsäure, Collagen, Polyorthoester und Polymilchsäure. Viele Verfahren zur Herstellung solcher Formulierungen werden beispielsweise von Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, Hrsg., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978, beschrieben. Pharmazeutische Zusammensetzungen werden bevorzugt unter GMP-Bedingungen hergestellt.

[0209] Zur Verabreichung einer Verbindung der Erfindung durch bestimmte Verabreichungswege muß die Verbindung möglicherweise mit einem Material zum Schutz ihrer Inaktivierung beschichtet oder gleichzeitig damit verabreicht werden. Beispielsweise kann die Verbindung an ein Individuum in einem geeigneten Träger, zum Beispiel Liposomen, oder einem Verdünnungsmittel verabreicht werden. Pharmazeutisch verträgliche Verdünnungsmittel umfassen Kochsalzlösung und wäßrige Pufferlösungen. Liposome umfassen Wasser-in-Öl-in-Wasser-CGF-Emulsionen sowie herkömmliche Liposome (Strejan et al., (1984) J. Neuroimmunol. 7: 27).

[0210] Pharmazeutisch verträgliche Träger umfassen sterile wäßrige Lösungen oder Dispersionen und sterile Pulver zur unvorbereiteten Herstellung steriler injizierbarer Lösungen oder Dispersionen. Die Verwendung solcher Medien und Mittel für pharmazeutisch aktive Substanzen ist in der Technik bekannt. Außer dann, wenn alle herkömmlichen Medien oder Mittel mit der aktiven Verbindung inkompatibel sind, wird die Verwendung dieser in den pharmazeutischen Zusammensetzungen der Erfindung empfohlen. Ergänzend können auch aktive Verbindungen in die Zusammensetzungen eingeführt werden.

[0211] Therapeutische Zusammensetzungen müssen für gewöhnlich steril, im wesentlichen isotonisch und unter den Herstellungs- und Lagerbedingungen stabil sein. Die Zusammensetzung kann als eine Lösung, Mikroemulsion, ein Liposom oder eine andere geordnete Struktur, die für eine hohe Arzneimittelkonzentration geeignet ist, formuliert werden. Der Träger kann ein Lösungsmittel oder Dispersionsmedium, enthaltend beispielsweise Wasser, Ethanol, Polyol (zum Beispiel Glycerol, Propylenglykol und flüssiges Polyethylenglykol und dergleichen) und geeignete Gemische davon, sein. Die richtige Fluidität kann beispielsweise durch die Verwendung einer Beschichtung wie Lezithin, durch die Beibehaltung der gewünschten Teilchengröße im Falle einer Dispersion und durch die Verwendung von oberflächenaktiven Mitteln aufrechterhalten werden. In vielen Fällen sind bevorzugt isotonische Mittel, zum Beispiel Zucker, Polyalkohole wie Mannitol, Sorbitol oder Natriumchlorid, in der Zusammensetzung enthalten. Eine verlängerte Absorption der injizierbaren Zusammensetzungen kann durch den Einschluß eines Mittels, das die Absorption verzögert, zum Beispiel Monostearatsalze und Gelatine, in die Zusammensetzung erreicht werden.

[0212] Sterile injizierbare Lösungen können durch die Einführung der aktiven Verbindung in der gewünschten Menge in ein geeignetes Lösungsmittel mit einem oder einer Kombination der oben angegebenen Inhaltsstoffe nach Bedarf hergestellt werden, gefolgt von Sterilisationsmikrofiltration. Im allgemeinen werden Dispersionen durch die Einführung der aktiven Verbindung in ein steriles Vehikel, das ein Basis-Dispersionsmedium und die erforderlichen anderen Inhaltsstoffe der oben angegebenen enthält, hergestellt. Im Falle steriler Pulver zur Herstellung steriler injizierbarer Lösungen sind die bevorzugten Herstellungsverfahren Vakuumtrocknung und Gefriertrocknung (Lyophilisierung), die ein Pulver aus dem Wirkstoff sowie irgendeinen zusätzlichen gewünschten Inhaltsstoff aus einer zuvor steril-filtrierten Lösung davon ergeben. Therapeutische Zusammensetzungen können auch mit medizinischen Vorrichtungen, die in der Technik bekannt sind, verabreicht werden. Beispielsweise kann eine therapeutische Zusammensetzung der Erfindung mit einer nadellosen subkutanen Injektionsvorrichtung verabreicht werden, wie die in den US-Patenten Nr. 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824 oder 4,596,556 offenbarten Vorrichtungen. Beispiele für Implantate und Mo-

dule, die in der vorliegenden Erfindung nützlich sind, umfassen: US-Patent Nr. 4,487,603, das eine implantierbare Mikroinfusionspumpe zur Dispersion der Medikation mit einer kontrollierten Geschwindigkeit offenbart; US-Patent Nr. 4,486,194, das eine therapeutische Vorrichtung zur Verabreichung von Medikamenten durch die Haut offenbart; US-Patent Nr. 4,447,233, das eine Medikationsinfusionspumpe zur Abgabe der Medikation mit einer genauen Infusionsrate offenbart; US-Patent Nr. 4,447,224, das ein fließvariables implantierbares Infusionsgerät für die kontinuierliche Arzneimittelabgabe offenbart; US-Patent Nr. 4,439,196, das ein osmotisches Arzneimittelabgabesystem mit Mehrkammerabschnitten offenbart; und US-Patent Nr. 4,475,196, das ein osmotisches Arzneimittelabgabesystem offenbart. Viele andere dieser Implantate, Abgabesysteme und Module sind bekannt.

C. Formulierung

[0213] Für die therapeutischen Zusammensetzungen umfassen die Formulierungen der vorliegenden Erfindung die, die zur oralen, nasalen, topischen (einschließlich bukkalen und sublingualen), rektalen, vaginalen und/oder parenteralen Verabreichung geeignet sind. Die Formulierungen können günstigerweise in einer Einzeldosierungsform präsentiert und durch irgendein Verfahren, das in der Pharmazie bekannt ist, hergestellt werden. Die Menge an Wirkstoff, die mit einem Trägermaterial kombiniert werden kann, um eine Einzeldosierungsform zu produzieren, variiert in Abhängigkeit des zu behandelnden Individuums und des jeweiligen Verabreichungsmodus. Die Menge an Wirkstoff, die mit einem Trägermaterial kombiniert werden kann, um eine Einzeldosierungsform zu produzieren, ist im allgemeinen die Menge der Zusammensetzung, die zu der therapeutischen Wirkung führt. Im allgemeinen, ausgehend von 100 %, liegt diese Menge im Bereich von etwa 0,01 % bis etwa 99 % Wirkstoff, etwa 0,1 bis etwa 70 % oder etwa 1 bis etwa 30 %.

[0214] Die Formulierungen der vorliegenden Erfindung, die für die vaginale Verabreichung geeignet sind, umfassen ebenso Pessarien, Tampons, Cremes, Gele, Pasten, Schäume oder Sprayformulierungen, die Träger, wie sie in der Technik bekanntermaßen geeignet sind, enthalten. Dosierungsformen für die topische oder transdermale Verabreichung der Zusammensetzungen dieser Erfindung umfassen Pulver, Sprays, Salben, Pasten, Cremes, Lotionen, Gele, Lösungen, Pflaster und Inhalationen. Die aktive Verbindung kann unter sterilen Bedingungen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger und mit anderen Konservierungsstoffen, Puffern oder Treibmitteln, die erforderlich sein können, gemischt werden.

[0215] Die Ausdrücke „parenterale Verabreichung“ und „parenteral verabreicht“ sind andere Verabreichungsmodi als die enterale und topische Verabreichung, für gewöhnlich durch Injektion, und umfassen ohne Einschränkung die intravenöse, intramuskuläre, intraarterielle, intrathekale, intrakapsuläre, intraorbitale, intrakardiale, intradermale, intraperitoneale, transtracheale, subkutane, subkutikuläre, intraartikuläre, subkapsuläre, subarachnoidale, intraspinal, epidurale und intrasternale Injektion und Infusion.

[0216] Beispiele für geeignete wässrige und nicht-wässrige Träger, die in den pharmazeutischen Zusammensetzungen der Erfindung eingesetzt werden können, umfassen Wasser, Ethanol, Polyole (wie Glycerol, Propylenglykol, Polyethylenglykol und dergleichen) und geeignete Gemische davon, Pflanzenöle, wie Olivenöl, und injizierbare organische Ester wie Ethyloleat. Die richtige Fluidität kann beispielsweise durch die Verwendung von Beschichtungsmaterialien wie Lezithin, durch die Beibehaltung der erforderlichen Teilchengröße im Falle von Dispersionen und durch die Verwendung von oberflächenaktiven Mitteln aufrechterhalten werden.

[0217] Diese Zusammensetzungen können auch Adjuvantien wie Konservierungsstoffe, Benetzungsmittel, Emulgatoren und Dispergiermittel enthalten. Die Verhinderung der Gegenwart von Mikroorganismen kann sowohl durch die obigen Sterilisationsverfahren als auch durch den Einschluß verschiedener Bakterizide und Fungizide, beispielsweise Paraben, Chlorbutanol, Phenolsorbinsäure und dergleichen, sichergestellt werden. Nach Bedarf können auch isotonische Mittel wie Zucker, Natriumchlorid und dergleichen in den Zusammensetzungen enthalten sein. Überdies kann eine verlängerte Absorption der injizierbaren pharmazeutischen Form durch den Einschluß von Mitteln, die die Absorption verzögern, wie Aluminiummonostearat und Gelatine, herbeigeführt werden.

[0218] Werden die Verbindungen der vorliegenden Erfindung als Pharmazeutika an Menschen oder Tiere verabreicht, können sie allein oder als eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend zum Beispiel 0,01 bis 99,5 % (oder 0,1 bis 90 %) Wirkstoff in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger, gegeben werden.

[0219] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen werden im allgemeinen als sterile, im wesentlichen isotonische und unter Einhaltung aller Good Manufacturing Practice-Richtlinien (GMP-Richtlinien) der U.S. Food

and Drug Administration formuliert.

Verfahren und Verwendungen der Erfindung

A. Verfahren

[0220] Die hierin offenbarten Zusammensetzungen (z. B. Humansequenz-Antikörper und humane monoklonale Antikörper gegen humanes CTLA-4 und Derivate/Konjugate hiervon) sind diagnostisch und therapeutisch in vitro und in vivo nützlich. Beispielsweise können diese Moleküle an Zellen in Kultur, z. B. in vitro oder ex vivo, oder in einem Individuum, z. B. in vivo, verabreicht werden, um eine Vielzahl von Störungen zu behandeln, zu verhindern oder zu diagnostizieren. Der Ausdruck „Individuum“ umfaßt humane und nicht-humane Lebewesen. Nicht-humane Lebewesen umfassen alle vertebralen, z. B. Säuger und Nicht-Säuger wie nicht-humane Primaten, Schafe, Hunde, Kühe, Hühner, Amphibien und Reptilien. Die Verfahren sind insbesondere für die Behandlung humaner Patienten mit einer Störung, die durch Steigerung oder Reduktion der T-Zellen-vermittelten Immunantwort behandelt werden kann, geeignet.

[0221] Werden Antikörper gegen CTLA-4 zusammen mit einem anderen Mittel verabreicht, können die beiden entweder in beliebiger Reihenfolge oder gleichzeitig verabreicht werden. Die Verfahren können zur Behandlung irgendeiner Art von Krebs, einschließlich Melanom, Darmkrebs, Prostatakrebs und Nierenkrebs, verwendet werden.

[0222] Latexmikrokügelchen, beschichtet mit Anti-CTLA-4 (zur Steigerung der Wertigkeit des Antikörpers), können beispielsweise die T-Zellenproliferation und -aktivierung hemmen. Mittel mit derselben Antikörperbindungsstelle können als ein CTLA-4-Antagonist, wenn sie als ein Fab oder lösliches IgG vorkommen, und als ein CTLA-4-Agonist, wenn sie stark vernetzt sind, agieren. Daher sind mehrwertige Formen von Anti-CTLA-4-Antikörpern nützliche therapeutische Mittel für das Heruntermodulieren von Immunantworten.

[0223] Außer, daß sie an Latexmikrokügelchen oder andere unlösliche Teilchen binden, können die Antikörper miteinander vernetzt oder unter Bildung von Multimeren genetisch konstruiert werden. Die Vernetzung kann durch direkte chemische Bindung oder durch indirekte Bindung wie einen Antikörper-Biotin-Avidin-Komplex stattfinden. Die Vernetzung kann kovalent, wobei chemische Bindungsgruppen eingesetzt werden, oder nicht-kovalent, wobei Protein-Protein- oder andere Protein-Liganden-Interaktionen eingesetzt werden, sein. Ansätze zur genetischen Konstruktion für die Bindung umfassen zum Beispiel die Reexpression der variablen Bereiche von IgG-Antikörpern mit hoher Affinität in IgM-Expressionsvektoren oder irgendeiner Proteineinheit (z. B. Polylysin und dergleichen). Die Umwandlung eines IgG-Antikörpers mit hoher Affinität in einen IgM-Antikörper kann einen zehnwertigen Komplex mit sehr hoher Affinität erzeugen. Die IgA₂-Expressionvektoren können ebenfalls zur Produktion mehrwertiger Antikörperkomplexe verwendet werden. IgA₂ kann zusammen mit der J-Kette und einer sekretorischen Komponente Polymere bilden. IgA₂ hat außerdem den Vorteil, daß es zusätzlich durch einen IgA-Rezeptor CD89, der auf Neutrophilen, Makrophagen und Monozyten exprimiert wird, vernetzt werden kann.

[0224] Agonismus kann auch unter Verwendung einiger Präparate aus polyklonalen Antikörpern gegen CTLA-4, die Antikörper gegen mindestens zwei nicht-überlappende Epitope auf CTLA-4 umfassen, erhalten werden. Ein Antikörper in einem Präparat, das zwei Bindungsstellen enthält, kann unter Bildung eines kleinen Clusters an zwei Moleküle von CTLA-4 binden. Ein zweiter Antikörper mit unterschiedlichen Bindungsstellen kann dann diese kleinen Cluster unter Bildung großer Cluster binden (aggregieren), wobei ein Komplex aus CTLA-4 (auf der Zelloberfläche) gebildet wird, der ein Signal an die T-Zelle zur Hemmung, Reduktion oder Verhinderung der Aktivierung der CTLA-4 tragenden (exprimierenden) T-Zelle transduziert. Daher zeigen einige Präparate aus polyklonalen Antikörpern ähnliche Agonismen wie die oben beschriebenen mehrwertigen Präparate.

[0225] Daher sind mehrwertige oder polyklonale Präparate aus Anti-CTLA-4-Antikörpern für die Agonisierung des CTLA-4-Rezeptors nützlich, wodurch Immunantworten, die andernfalls von T-Zellen, die den CTLA-4-Rezeptor tragen, vermittelt werden, unterdrückt werden. Einige Beispiele von Krankheiten, die unter Verwendung solcher mehrwertigen oder polyklonalen Präparate aus Antikörpern behandelt werden können, umfassen Autoimmunkrankheiten, Transplantatabstoßung and Entzündungen.

B. Verwendungen

1. Aktivieren von Immunantworten

a. Krebs

[0226] In einigen therapeutischen Verfahren werden Krebspatienten behandelt. Die Blockade von CTLA-4 durch Antikörper kann die Immunantwort auf Krebszellen bei einem Patienten verstärken. Gegebenenfalls können Antikörper gegen CTLA-4 mit einem immunogenen Mittel wie Krebszellen, gereinigten Tumorantigenen (einschließlich rekombinanter Proteine, Peptide und Kohlenhydratmoleküle), Zellen und Zellen, die mit Genen transfiziert sind, die immunstimulierende Zytokine kodieren, und Zelloberflächenantigenen wie B7 (siehe z. B. Hurwitz, A. et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 10067–10071) kombiniert werden.

[0227] In experimentellen Maussystemen kann die Implantierung einiger Tumore, gefolgt von der Verabreichung von Anti-CTLA-4-Antikörpern zur Abstoßung der Tumore führen. In einigen Fällen kommt es zur Tumorabstoßung etablierter Tumore; in anderen Fällen wird das Wachstum des Tumors durch die Verwendung von Anti-CTLA-4-Antikörpern verlangsamt. Allgemein ist die CTLA-4-Blockade gegen immunogene Tumore wirksam. Funktionell werden diese als die Tumore definiert, für die die Impfung unter Verwendung des Tumors selbst zur Immunität gegen Tumorprovokation führen kann. Bei Menschen sind einige Tumore als immunogen nachgewiesen worden, wie Melanome. Es wird angenommen, daß wir durch die Anhebung des Grenzwertes der T-Zellenaktivierung durch die CTLA-4-Blockade die Aktivierung von Tumorantworten in einem Wirt erwarten können.

[0228] Die CTLA-4-Blockade ist am wirksamsten, wenn sie mit einem Impfprotokoll kombiniert wird. Es sind viele experimentelle Strategien zur Impfung gegen Tumore vorgeschlagen worden (siehe Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60–62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300–302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414–428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730–738; siehe auch Restifo, N. and Sznol, M., Cancer Vaccines, K. 61, S. 3023–3043 in DeVita, V. et al., (Hrsg.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology, 5. Aufl.). In einer dieser Strategien wird ein Impfstoff unter Verwendung autologer oder allogener Tumorzellen hergestellt. Es ist gezeigt worden, daß diese zellulären Impfstoffe am wirksamsten sind, wenn die Tumorzellen zur Expressierung von GM-CSF transduziert werden. Es ist gezeigt worden, daß GM-CSF ein potentieller Aktivator einer Antigenpräsentation für die Tumoringpfung ist (Dranoff et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90 (80): 3539–43).

[0229] Es ist gezeigt worden, daß die Anti-CTLA-4-Blockade zusammen mit der Verwendung von GM-CSF-modifizierten Tumorzellimpfstoffen in zahlreichen experimentellen Tumormodellen wie dem Brustkarzinom (Hurwitz et al., (1998) oben), primärem Prostatakrebs (Hurwitz A. et al., (2000) Cancer Research 60 (9): 2444–8) und Melanom (van Elsas, A et al., (1999) J. Exp. Med. 190: 355–66) wirksam ist. In diesen Fällen sind nicht-immunogene Tumore, wie das B16-Melanom, anfällig gegen die Zerstörung durch das Immunsystem gemacht worden. Der Tumorzellimpfstoff kann unter anderem auch zur Expression anderer Immunaktivatoren, wie IL2, und co-stimulierender Moleküle, modifiziert werden.

[0230] Die Studie von Genexpressions- und Großmaßstabsexpressionsmustern in verschiedenen Tumoren führte zu der Definition so genannter Tumor-spezifischer Antigene (Rosenberg, SA (1999) Immunity 10: 281–7). In vielen Fällen sind diese Tumor-spezifischen Antigene Differenzierungsantigene, die in Tumoren und in der Zelle, aus der der Tumor wuchs, exprimiert werden, beispielsweise Melanozytenantigene gp 100, MAGE-Antigene, Trp-2. Noch wichtiger ist, daß viele dieser Antigene Ziele für Tumor-spezifische T-Zellen, die im Wirt zu finden sind, darstellen können. Die CTLA-4-Blockade kann in Verbindung mit einer Kollektion rekombinanter Proteine und/oder Peptide, die in einem Tumor exprimiert werden, verwendet werden, um so eine Immunantwort auf diese Proteine zu erzeugen. Diese Proteine werden normalerweise vom Immunsystem als Autoantigene angesehen und sind daher ihnen gegenüber tolerant. Das Tumorantigen kann ebenso die Proteintelomerase umfassen, die für die Synthese der Telomere von Chromosomen erforderlich ist und die in über 85 % der humanen Krebsarten und nur in einer beschränkten Zahl somatischer Gewebe exprimiert wird (Kim, N et al., (1994) Science 266, 2011–2013). (Diese somatischen Gewebe können vor einem Angriff des Immunsystems auf verschiedene Weise geschützt werden). Das Tumorantigen kann ebenso ein „Neoantigen“, das in Krebszellen aufgrund somatischer Mutationen exprimiert wird, die die Proteinsequenz verändern oder Fusionsproteine zwischen zwei unverwandten Sequenzen (d. h. bcr-abl im Philadelphia-Chromosom) erzeugen, oder ein Idiotyp aus B-Zell-Tumoren sein. Andere Tumoringpfstoffe können die Proteine aus Viren, involviert in humanen Krebsarten, wie Human Papilloma-Viren (HPV), Hepatitis-Viren (HBV und HCV) und Kaposi-Herpes-Sarkom-Virus (KHSV), umfassen. Eine andere Form eines Tumorspezifischen Antigens, das in Verbind-

ung mit der CTLA-4-Blockade verwendet werden kann, sind gereinigte Hitzeschockproteine (HSP), die aus dem Tumorgewebe selbst isoliert werden. Diese Hitzeschockproteine enthalten Fragmente von Proteinen aus den Tumorzellen, und diese HSPs sind bei der Abgabe an Antigen-präsentierende Zellen zum Auslösen der Tumorummunität überaus effizient (Suot, R. & Srivastava, P. (1995) *Science* 269: 1585–1588; Tamura, Y. et al., (1997) *Science* 278: 117–120).

[0231] Dendritische Zellen (DC) sind potente Antigen-präsentierende Zellen, die zum Auslösen Antigen-spezifischer Antworten verwendet werden können. DCs können ex-vivo produziert und mit verschiedenen Protein- und Peptidantigenen sowie Tumorzellextrakten beladen werden (Nestle, F. et al., (1998) *Nature Medicine* 4: 328–332). DCs können ebenso durch genetische Mittel transduziert werden, um auch diese Tumorantigene zu exprimieren. DCs sind zum Zwecke der Immunisierung ebenso direkt an Tumorzellen fusioniert worden (Kugler, A. et al., (2000) *Nature Medicine* 6: 332–336). Als ein Verfahren zur Impfung kann die DC-Immunisierung effektiv mit der CTLA-4-Blockade kombiniert werden, um potentere Anti-Tumor-Antworten zu aktivieren.

[0232] Die CTLA-4-Blockade kann auch mit Standard-Krebsbehandlungen kombiniert werden. Die CTLA-4-Blockade kann effektiv mit chemotherapeutischen Regimes kombiniert werden. In diesen Fällen kann möglicherweise die Dosis des verabreichten chemotherapeutischen Reagens verringert werden (Mokyr, M. et al., (1998) *Cancer Research* 58: 5301–5304). Die wissenschaftliche Grundlage hinter der kombinierten Verwendung der CTLA-4-Blockade und der Chemotherapie ist, daß der Zelltod, der eine Konsequenz der zytotoxischen Wirkung der meisten chemotherapeutischen Verbindungen ist, zu erhöhten Konzentrationen an Tumorantigenen in dem Antigen-Präsentationsweg führen sollte. Andere Kombinationstherapien, die zu einer Synergie mit der CTLA-4-Blockade durch den Zelltod führen, sind Bestrahlung, Chirurgie und Hormondeprivation (Kwon, E. et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96 (26): 15074–9. Jedes dieser Protokolle erzeugt eine Quelle für ein Tumorantigen in dem Wirt. Angiogenesehemmer können ebenso mit der CTLA-4-Blockade kombiniert werden. Das Hemmen der Angiogenese führt zum Tumorzelltod, wodurch Tumorantigenen in die Antigenpräsentationswege des Wirts eingeführt werden kann.

[0233] CTLA-4-blockierende Antikörper können ebenso in Kombination mit bispezifischen Antikörpern, die Fc-alpha- oder Fc-gamma-Rezeptor-exprimierende Effektorzellen auf Tumorzellen richten, verwendet werden (siehe z. B. US-Patente Nr. 5,922,845 und 5,837,243). Bispezifische Antikörper können zum Targeting zweier separater Antigene verwendet werden. Beispielweise sind Anti-Fc-Rezeptor/Antitumorantigen(d. h. Her-2/neu) bispezifische Antikörper zum Targeting von Makrophagen auf Tumorstellen verwendet worden. Durch diese Markierung können Tumor-spezifische Antworten effektiver aktiviert werden. Der T-Zellenarm dieser Antworten würde durch die Verwendung der CTLA-4-Blockade verstärkt. Alternativ kann Antigen durch die Verwendung bispezifischer Antikörper, die an Tumorantigenen und einen für eine dendritische Zelle spezifischen Zelloberflächenmarker binden, direkt an DCs abgegeben werden.

[0234] Tumore entgehen der Wirtsimmunüberwachung durch eine große Vielzahl an Mechanismen. Viele dieser Mechanismen können durch die Inaktivierung von Proteinen, die durch die Tumore exprimiert werden und die immunosuppressiv sind, überwunden werden. Diese umfassen unter anderem Tgfb (Kehrl, J. et al., (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037–1050), IL-10 (Howard, M. & O'Garra, A. (1992) *Immunology Today* 13: 198–200) und den Fas-Liganden (Hahne, M. et al., (1996) *Science* 274: 1363–1365). Die Antikörper für jedes dieser Gebilde können in Kombination mit Anti-CTLA-4 verwendet werden, um den Wirkungen des immunosuppressiven Mittels entgegenzuwirken und Tumorummunantworten durch den Wirt zu begünstigen.

[0235] Andere Antikörper, die zur Aktivierung der Immunreaktionsfähigkeit des Wirtes verwendet werden können, können in Kombination mit Anti-CTLA-4 verwendet werden. Diese umfassen Moleküle auf der Oberfläche dendritischer Zellen, die die DC-Funktion und Antigenpräsentation aktivieren. Anti-CD40-Antikörper können die T-Zell-Helferaktivität effektiv ersetzen (Ridge, J. et al. (1998) *Nature* 393: 474–478) und können in Verbindung mit CTLA-4-Antikörpern verwendet werden (Ito, N. et al., (2000) *Immunobiology* 201(5) 527–40). Die Aktivierung von Antikörpern gegen T-Zellen-co-stimulierende Moleküle wie OX-40 (Weinberg, A. et al. (2000) *J. Immunol.* 164: 2160–2169), 4-1BB (Melero, I. et al., (1997) *Nature Medicine* 3: 682–685 (1997) und ICOS (Hutloff, A. et al., (1999) *Nature* 397: 262–266) kann ebenso für erhöhte Niveaus der T-Zellaktivierung sorgen.

[0236] Derzeit wird die Knochenmarkstransplantation zur Behandlung einer Vielzahl von Tumoren hämopoetischen Ursprungs angewandt. Auch wenn die Graft-versus-host-Krankheit eine Folge dieser Behandlung ist, kann aus Graft-vs.-Tumorantworten ein therapeutischer Nutzen gezogen werden. Die CTLA-4-Blockade kann zur Steigerung der Effektivität der Spender-eingepflanzten Tumor-spezifischen T-Zellen verwendet werden (Blazar, B. et al., (1999) *J. Immunol* 162: 6368–6377).

[0237] Es gibt ferner mehrere experimentelle Behandlungsprotokolle, die die Ex-vivo-Aktivierung und Expansion Antigen-spezifischer T-Zellen umfassen und diese Zellen adoptiv in Empfänger übertragen, um Antigen-spezifische T-Zellen gegen Tumor zu erhalten (Greenberg, R. & Riddell, S. (1999) 285: 546–51). Diese Verfahren können auch zur Aktivierung von T-Zellantworten auf infektiöse Mittel wie CMV verwendet werden (siehe unten). Es ist zu erwarten, daß die Ex-vivo-Aktivierung in Gegenwart von Anti-CTLA-4-Antikörpern die Häufigkeit und Aktivität der adoptiv übertragenen T-Zellen erhöht.

b. Infektionskrankheiten

[0238] Andere Verfahren werden zur Behandlung von Patienten verwendet, die speziellen Toxinen oder Krankheitserregern ausgesetzt waren. Ähnlich wie bei ihrer Verwendung gegen Tumore, wie oben erörtert, kann die Antikörper-vermittelte CTLA-4-Blockade allein oder als ein Adjuvans, in Kombination mit Impfstoffen, zur Stimulierung der Immunantwort auf Krankheitserreger, Toxine und Autoantigene verwendet werden. Es ist gezeigt worden, daß die CTLA-4-Blockade in der akuten Phase von Infektionen durch *Nippostrongylus brasiliensis* (McCoy, K. et al., (1997) 186(2): 183–187) und *Leishmania donovani* (Murphy, M. et al., (1998) J. Immunol. 161: 4153–4160) effektiv ist. Beispiele für Krankheitserreger, für die dieser therapeutische Ansatz besonders nützlich sein kann, umfassen Krankheitserreger, für die es derzeit keinen wirksamen Impfstoff gibt, oder Krankheitserreger, für die herkömmliche Impfstoffe weniger als vollständig effektiv sind. Diese umfassen, sind aber nicht beschränkt auf HIV, Hepatitis (A, B, & C), Influenza, Herpes, *Giardia*, Malaria, Leishmanie, *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Die CTLA-4-Blockade ist insbesondere gegen etablierte Infektionen durch Mittel wie HIV, die im Verlauf der Infektion veränderte Antigene präsentieren, nützlich. Diese neuen Epitope werden zum Zeitpunkt der Anti-humanen-CTLA-4-Verabreichung als fremd erkannt, wodurch eine starke T-Zellantwort provoziert wird, die durch negative Signale durch CTLA-4 nicht abgeschwächt wird.

[0239] Einige Beispiele für pathogene Viren, die Infektionen verursachen, die durch die Verfahren der Erfindung behandelt werden können, umfassen Hepatitis (A, B oder C), das Herpes-Virus (z. B. VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II und CMV, Epstein-Barr-Virus), Adenovirus, Influenzavirus, Flaviviren, Echovirus, Rhinovirus, Coxsackievirus, Coronavirus, Respiratory-Syncytial-Virus, Mumpsvirus, Rotavirus, Masernvirus, Rubellvirus, Parvovirus, Vakzine-Virus, HTLV-Virus, Dengue-Virus, Papillomavirus, Molluskum-Virus, Poliovirus, Tollwut-Virus, JC-Virus und Arbovirus-Enzephalitis-Virus.

[0240] Einige Beispiele für pathogene Bakterien, die Infektionen verursachen, die durch die Verfahren der Erfindung behandelt werden können, umfassen Chlamydia, Rickettsia-Bakterien, Mykobakterien, Staphylokokken, Streptokokken, Pneumonokokken, Meningokokken und Gonokokken, Klebsiella, Proteus, Serratia, *Pseudomonas*, Legionella, Diphtheria, Salmonella, Bazillen, Cholera-, Tetanus-, Botulismus-, Anthrax-, Pest-, Lep-tospirose- und Lyme-Krankheit-Bakterien.

[0241] Einige Beispiele für pathogene Pilze, die Infektionen verursachen, die durch die Verfahren der Erfindung behandelt werden können, umfassen *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis* usw.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger* usw.), Genus *Mucorales* (*Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus*), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* und *Histoplasma capsulatum*.

[0242] Einige Beispiele für pathogene Parasiten, die Infektionen verursachen, die durch die Verfahren der Erfindung behandelt werden können, umfassen *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, *Nippostrongylus brasiliensis*.

[0243] In allen der obigen Verfahren kann eine CTLA-4-Blockade mit anderen Formen einer Immuntherapie wie Zytokinbehandlung (z. B. Interferone, GM-CSF, G-CSF, IL-2) oder bispezifischer Antikörpertherapie kombiniert werden, was für eine verstärkte Präsentation von Tumorantigenen sorgt (siehe z. B. Holliger (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444–6448; Poljak (1994) Structure 2: 1121–1123).

c. Förderung nützlicher "Autoimmun"-Reaktionen zur Behandlung einer Krankheit und therapeutischen Intervention.

[0244] Die Fähigkeit von Anti-CTLA-4-Antikörpern, Autoimmunantworten zu provozieren und verstärken, ist in einer Vielzahl experimenteller Systeme dokumentiert worden (EAE – Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, a murine model for MS (Perrin, P. et al. (1996) J. Immunol. 157(4): 1333–1336); Diabetes (Luhder,

F. et al., (1998) oben). Tatsächlich läßt die Induktion von Anti-Tumor-Antworten unter Verwendung von Tumorzellen- und Peptidimpfstoffen erkennen, daß viele Anti-Tumor-Antworten Anti-Autoreaktivitäten (Depigmentierung, beobachtet in Anti-CTLA-4- + GM-CSF-modifiziertem B16-Melanom in van Elsas et al., oben; Depigmentierung in Trp-2-geimpften Mäusen (Overwijk, W. et al., (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 2982–2987); Autoimmunprostatitis, verursacht durch TRAMP-Tumorzellimpfstoffe (Hurwitz, A. (2000) oben), Melanompeptidantigenimpfung und Vitiligo, beobachtet in klinischen Versuchen an Menschen (Rosenberg, SA and White, DE (1996) J. Immunother Emphasis Tumor Immunol 19(1): 81–4).

[0245] Daher kann die Verwendung der Anti-CTLA-4-Blockade in Verbindung mit verschiedenen Autoproteinen im Betracht gezogen werden, um Impfprotokolle für eine effiziente Erzeugung von Immunantworten gegen diese Autoproteine zur Krankheitsbehandlung vorzuschlagen. Beispielsweise umfaßt die Alzheimer-Krankheit die unangebrachte Akkumulation von A β -Peptid in Amyloidablagerungen im Gehirn; Antikörperantworten gegen Amyloid können diese Amyloidablagerungen klären (Schenk et al., (1999) Nature 400: 173–177).

[0246] Andere Autoproteine können ebenso als Ziele verwendet werden, wie IgE zur Behandlung von Allergien und Asthma, und TNF für rheumatoide Arthritis. Schließlich können Antikörperantworten auf verschiedene Hormone durch die Verwendung von Anti-CTLA-4-Antikörpern induziert werden. Neutralisierende Antikörperantworten auf reproduktive Hormone können zur Kontrazeption verwendet werden. Die neutralisierende Antikörperantwort auf Hormone und andere lösliche Faktoren, die für das Wachstum bestimmter Tumore erforderlich sind, können auch als mögliche Impfziele betrachtet werden.

[0247] Analoge Verfahren, wie oben beschrieben, zur Verwendung des Anti-CTLA-4-Antikörpers können zur Induktion therapeutischer Autoimmunantworten zur Behandlung von Patienten mit einer unangemessenen Akkumulation anderer Autoantigene, wie Amyloidablagerungen, umfassend A β bei der Alzheimer-Krankheit, Zytokine wie TNF α und IgE, verwendet werden.

2. Inaktivierung von Immunantworten

[0248] Störungen, verursacht durch Immunantworten, werden Überempfindlichkeitserkrankung genannt. Krankheiten, verursacht durch fehlende Eigentoleranz und darauffolgende Immunantworten gegen Auto- oder autologe Antigene, werden Autoimmunkrankheiten genannt. Überempfindlichkeiten können ebenso aus unkontrollierten oder übermäßigen Antworten gegen Fremdartigene wie Mikroben resultieren.

[0249] Obgleich gezeigt worden ist, daß lösliche Antikörper gegen humanes CTLA-4 die Ausbreitung und Aktivierung von T-Zellen fördern (d. h., wo die CTLA-4-Funktion (z. B. das Binden an einen Liganden) gehemmt wird; in diesem Szenario sind die Antikörper Antagonisten gegen die CTLA-4-Funktion), erzeugt die Steigerung der Wertigkeit dieser Antikörper die gegenteilige Wirkung (wo nunmehr die Antikörper im Gegensatz als Agonisten gegen CTLA-4 die Immunantwort unterdrücken) (siehe z. B. Krummel and Allison, 1996, J. Exp. Med. 183, 2533–2540). Zum Zwecke der Inaktivierung Antigen-spezifischer T-Zellantworten, wie derer, die Ziele pathogener autoreaktiver T-Zellen darstellen, muß das Zielantigen, das für diese T-Zellen spezifisch ist (d. h. Antigen und/oder MHC/Antigen-Komplexe) mit der mehrwertigen Form des Anti-CTLA-4-Antikörpers verabreicht werden.

a. Entzündung

[0250] Eine Entzündung ist die Folge der Kapillardilatation mit der Akkumulation von Fluid und der Migration phagozytischen Leukozyten, wie Granulozyten und Monozyten. Eine Entzündung ist bei der Verteidigung eines Wirts gegen eine Vielzahl von Infektionen wichtig, kann aber auch unerwünschte Folgen bei Entzündungskrankheiten, wie anaphylaktischem Schock, Arthritis, Gicht und Ischämierereperfusion, haben. Aktivierte T-Zellen spielen bei einer Entzündung eine wichtige modulatorische Rolle, durch die Interferon γ und Kolonie-stimulierende Faktoren freigesetzt werden, die wiederum phagozytische Leukozyten aktivieren. Die aktivierten phagozytischen Leukozyten induzieren die Expression einer Vielzahl spezifischer Zelloberflächenmoleküle, die als homing-Rezeptoren bezeichnet werden und die die Phagozyten an Zielendothelzellen anbringen. Entzündungsreaktionen können durch die Behandlung mit den therapeutischen Mitteln der Erfindung reduziert oder eliminiert werden. Beispielsweise blockieren mehrwertige Präparate aus Antikörpern gegen CTLA-4 die Aktivierung aktivierter T-Zellen, wodurch verhindert wird, daß diese Zellen Moleküle freisetzen, die zur Aktivierung phagozytischer Zellarten erforderlich sind.

b. Autoimmunkrankheiten

[0251] Eine weitere Situation, in der die Immunosuppression wünschenswert ist, ist die Behandlung von Autoimmunkrankheiten wie insulinpflichtigem Diabetes mellitus, multiplen Sklerose, Stiff-Man-Syndrom, rheumatoider Arthritis, Myasthenia gravis und Lupus erythematosus. Bei diesen Krankheiten entwickelt der Körper eine zelluläre und/oder humorale Immunantwort gegen eines seiner eigenen Antigene, was zur Zerstörung dieses Antigens und einer möglichen Lähmung und/oder zu tödlichen Folgen führt. Es wird angenommen, daß aktivierte T-Zellen die Hauptrolle bei vielen Autoimmunkrankheiten wie Diabetes mellitus spielen. Autoimmunkrankheiten können durch die Verabreichung eines der hierin offenbarten therapeutischen Mittel, das die Aktivierung von T-Zellen hemmt, behandelt werden. Gegebenenfalls kann das Autoantigen oder ein Fragment davon, gegen das die Autoimmunkrankheit zielt, kurz vor, gleichzeitig mit oder kurz nach dem immunsuppressiven Mittel verabreicht werden. Auf diese Weise kann Toleranz für das Autoantigen unter dem Deckmantel der suppressiven Behandlung induziert werden, wodurch der Bedarf an fortlaufender Immunosuppression ausgeräumt wird. Siehe z. B. Cobbold et al., WO 90/15152 (1990).

c. Graft-versus-host-Krankheit

[0252] Eine ähnliche Verwendung der hierin offenbarten therapeutischen Mittel ist bei der Modulierung der Immunantwort, die in die „Graft-versus-host“-Krankheit (GVHD) involviert ist. GVHD ist eine potentiell tödliche Krankheit, die bei der Übertragung von immunologisch kompetenten Zellen auf einen allogenen Empfänger auftritt. Hierbei können die immunologisch kompetente Zellen des Spenders Gewebe in dem Empfänger angreifen. Gewebe der Haut, des Darmepithels und der Leber sind häufige Ziele und können im Verlauf von GVHD zerstört werden. Die Krankheit stellt ein besonders schweres Problem dar, wenn immunes Gewebe transplantiert wird, wie bei der Knochenmarkstransplantation; weniger schwere GVHD ist aber auch in anderen Fällen berichtet worden, einschließlich bei Herz- und Lebertransplantaten. Die hierin offenbarten therapeutischen Mittel können zur Hemmung der Aktivierung von Spenderleukozyten verwendet werden, wobei ihre Fähigkeit, Targetzellen in dem Wirt zu lysieren, gehemmt wird.

d. Transplantatabstoßung

[0253] In den letzten Jahren gab es eine beträchtliche Verbesserung hinsichtlich der Effizienz chirurgischer Techniken zur Transplantation von Geweben und Organen wie Haut, Niere, Leber, Herz, Lunge, Pankreas und Knochenmark. Möglicherweise ist das prinzipielle ungeklärte Problem der Mangel an zufriedenstellenden Mitteln zur Induzierung von Immuntoleranz im Empfänger für das transplantierte allogene Transplantat oder Organ. Wenn allogene Zellen oder Organe in einen Wirt transplantiert werden (d. h., der Spender und der Empfänger verschiedene Individuen derselben Spezies sind), wird das Immunsystem des Wirts wahrscheinlich eine Immunantwort auf fremde Antigene in dem Transplantat aufbauen (Host-versus-graft-Krankheit), was zur Zerstörung des transplantierten Gewebes führt. CD8⁺-Zellen, CD4⁺-Zellen und Monozyten sind in die Abstoßung von transplantierten Geweben involviert. Die hierin offenbarten therapeutischen Mittel sind zur Hemmung T-Zellen-vermittelter, Alloantigen-induzierter Immunantworten in dem Spender nützlich, wodurch verhindert wird, daß solche Zellen an der Zerstörung des transplantierten Gewebes oder Organs beteiligt sind.

B. Verfahren zur Detektion/Messung der Gegenwart von CTLA-4 in einer Probe

[0254] Hierin werden ebenso Verfahren zur Detektion der Gegenwart von humanem CTLA-4-Antigen in einer Probe, oder Messung der Menge an humanem CTLA-4-Antigen, offenbart, umfassend das Kontaktieren der Probe und einer Kontrollprobe mit einem humanen monoklonalen Antikörper oder einem Antigen-bindenden Teil davon, der spezifisch an humanes CTLA-4 bindet, unter Bedingungen, die die Bildung eines Komplexes zwischen dem Antikörper oder dem Teil davon und humanem CTLA-4 ermöglichen. Die Bildung eines Komplexes wird dann detektiert, wobei eine unterschiedliche Komplexbildung zwischen der Probe im Vergleich zu der Kontrollprobe ein Anzeichen für die Gegenwart von humanem CTLA-4-Antigen in der Probe ist.

C. Kits

[0255] Hierin werden ebenso Kits, umfassend die hierin offenbarten Zusammensetzungen (z. B. Humansequenz-Antikörper, humane Antikörper, multispezifische und bispezifische Moleküle) und Instruktionen zur Verwendung, offenbart. Das Kit kann ferner mindestens ein zusätzliches Reagens oder einen oder mehrere zusätzliche humane Antikörper (z. B. einen humanen Antikörper mit einer komplementären Aktivität, der an ein Epitop in CTLA-4-Antigen bindet und sich von dem ersten humanen Antikörper unterscheidet) enthalten. Die Kits umfassen typischerweise ein Etikett, das die vorgesehene Verwendung der Inhalte des Kits anzeigt. Der

Ausdruck Etikett umfaßt irgendeine Aufschrift oder irgendein Informationsmaterial, das auf oder mit dem Kit geliefert wird oder dem Kit anderweitig beiliegt.

Beispiele

[0256] Aspekte der Beispiele, die sich nicht speziell auf die beanspruchte Erfindung beziehen, wurden nur zum Vergleich aufgenommen.

Beispiel 1. Züchtung Cmu-markierter Mäuse

Konstruktion eines CMD-Targeting-Vektors.

[0257] Das Plasmid pICEmu enthält ein EcoRI/XhoI-Fragment des Maus-Ig-Schwerketten-Lokus, das das mu-Gen überspannt und aus einer Balb/C-lambda-Phage-Genombibliothek erhalten wurde (Marcu et al., Cell 22: 187, 1980). Dieses Genfragment wurde in die XhoI/EcoRI-Stellen des Plasmids pICEMI9H subkloniert (Marsh et al.; Gene 32, 481–485, 1984). Die Schwerkettensequenzen in pICEmu erstrecken sich stromabwärts von der EcoRI-Stelle, die sich genau 3' des mu-intronischen-Enhancers befindet, zu der XhoI-Stelle, die sich ungefähr 1 kb stromabwärts des letzten Transmembranexons des mu-Gens befindet; vieles von der mu-switch-Wederhohlungsregion ist jedoch durch die Passage in *E. coli* gelöscht worden.

[0258] Der Targetingvektor wurde wie folgt konstruiert (siehe [Fig. 1](#)). Ein 1,3 kb HindIII/SmaI-Fragment wurde aus pICEmu exzidiert und in HindIII/SmaI digeriertes pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA) subkloniert. Dieses pICEmu-Fragment erstreckt sich von der HindIII-Stelle, die sich ungefähr 1 kb 5' von Cmu1 befindet, zu der SmaI-Stelle, die sich in Cmu1 befindet. Das resultierende Plasmid wurde mit SmaI/SpeI digeriert, und das ungefähr 4 kb SmaI/XbaI-Fragment aus pICEmu, das sich von der SmaI-Stelle in Cmu1 3' zu der XbaI-Stelle, die sich genau stromabwärts des letzten Cmu-Exons befindet, wurde eingeführt. Das resultierende Plasmid, pTAR1, wurde an der SmaI-Stelle linearisiert und eine Neoexpressionskassette eingeführt. Diese Kassette besteht aus dem Neogen unter der transkriptionalen Kontrolle des Maus-Phosphoglyceratkinase-(pgk)-Promoters (XbaI/TaqI-Fragment; Adra et al., (1987) Gene 60: 65–74) und enthält die pgk-Polyadenylierungsstelle (PvuII/HindIII-Fragment; Boer et al., (1990) Biochemical Genetics 28: 299–308). Diese Kassette wurde aus dem Plasmid pKJ1 erhalten (beschrieben von Tybulewicz et al., (1991) Cell 65: 1153–1163), aus dem die Neokassette als ein EcoRI/HindIII-Fragment exzidiert und in EcoRI/HindIII digeriertes pGEM-7Zf(+) zur Erzeugung von pGEM-7(KJ1) subkloniert wurde. Die Neokassette wurde aus pGEM-7 (KJ1) durch EcoRI/SalI-Digestion exzidiert, abgestumpft und in die SmaI-Stelle des Plasmids pTAR1 in die entgegengesetzte Richtung zu den genomischen Cmu-Sequenzen subkloniert. Das resultierende Plasmid wurde mit NotI linearisiert, und eine Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase-(tk)-Kassette wurde eingeführt, wodurch ES-Klontragende homologe Rekombinanten angereichert werden können, wie von Mansour et al., (1988) Nature 336: 348–352, beschrieben. Diese Kassette besteht aus kodierenden Sequenzen des tk-Gens, eingefaßt von dem Maus-pgk-Promoter und der Polyadenylierungsstelle, wie von Tybulewicz et al., (1991) Cell 65: 1153–1163, beschrieben. Der resultierende CMD-Targetingvektor enthält insgesamt ungefähr 5,3 kb Homologie zum Schwerkettenloкус und erzeugt ein mutantes mu-Gen, in das eine Neoexpressionskassette in die einzige SmaI-Stelle des ersten Cmu-Exons eingeführt worden ist. Der Targetingvektor wurde mit PvuII linearisiert, das vor der Elektroporation in ES-Zellen in Plasmidsequenzen schneidet.

Erzeugung und Analyse markierter ES-Zellen.

[0259] AB-1 ES-Zellen (McMahon, A. P. and Bradley, A., (1990) Cell 62: 1073–1085), wuchsen auf mitotisch inaktiven SNL76/7 Feeder-Zellen (ebenda) im wesentlichen so, wie (Robertson, E. J. (1987) in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach (E. J. Robertson, Hrsg.) Oxford: IRL Press, S. 71–112) beschrieben. Der linearisierte CMD-Targetingvektor wurde durch die von Hasty et al., (Hasty, P. R. et al., (1991) Nature 350: 243–246) beschriebenen Verfahren in AB-1-Zellen elektroporiert. Die elektroporierten Zellen wurden in 100-mm-Schalen bei einer Dichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/Schale plattiert. Nach 24 Stunden wurden G418 (200 Mikrogramm/ml aktiver Komponente) und FIAU (5×10^{-7} M) zu dem Medium gegeben, und Arzneimittel-resistente Klone konnten sich über 8 bis 9 Tage entwickeln. Die Klone wurden sortiert, trypsinisiert, in zwei Teile geteilt und weiter expandiert. Die Hälfte der Zellen aus jedem Klon wurde gefroren, und die andere Hälfte wurde hinsichtlich der homologen Rekombination zwischen Vektor und Targetsequenzen analysiert.

[0260] Die DNA-Analyse wurde durch Southern-Blot-Hybridisierung durchgeführt. Die DNA wurde aus den Klonen isoliert, wie von Laird et al., (Laird, P. W. et al., (1991) Nucleic Acids Res. 19: 4293) beschrieben. Die isolierte genomische DNA wurde mit SpeI digeriert und mit einem 915 bp SacI-Fragment, Sonde A ([Fig. 1](#)),

sondiert, die an eine Sequenz zwischen dem mu-intronischen Enhancer und der mu-Wechselregion hybridisiert. Sonde A detektiert ein 9,9 kb Spel-Fragment aus dem Wildtyplokus und eine diagnostische 7,6 kb Bande aus einem mu-Lokus, die homolog mit dem CMD-Targetingvektor rekombiniert worden ist (die Neoexpressionskassette enthält eine Spel-Stelle). Von 1132 G418- und FIAU-resistenten Klonen, die durch die Southern-Blot-Analyse gescreent wurden, zeigten 3 die 7,6 kb Spel-Bande, die indikativ für die homologe Rekombination am mu-Lokus ist. Diese 3 Klone wurden weiter mit den Enzymen BglII, BstXI und EcoRI digeriert, um zu verifizieren, daß der Vektor homolog in das mu-Gen integriert worden ist. Bei der Hybridisierung mit Sonde A produzieren Southern-Blots von Wildtyp-DNA, digeriert mit BglII, BstXI oder EcoRI, Fragmente von 15,7, 7,3 bzw. 12,5 kb, wohingegen die Gegenwart eines gezielten mu-Allels von Fragmenten von 7,7, 6,6 bzw. 14,3 kb angezeigt wurde. Alle 3 positiven Klone, die von dem Spel-Digest detektiert wurden, zeigten die erwarteten BglII-, BstXI- und EcoRI-Restriktionsfragmente, die für die Einführung der Neokassette in das Cmul-Exon symptomatisch sind.

Züchtung von Mäusen, die das mutierte mu-Gen tragen.

[0261] Die drei markierten ES-Klone, gekennzeichnet mit den Zahlen 264, 272 und 408, wurden aufgetaut und in C57BL/6J-Blastozysten injiziert, wie von Bradley (Bradley, A. (1987) in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach*. (E. J. Robertson, Hrsg.) Oxford: IRL Press, S. 113–151) beschrieben. Die Injizierten Blastozysten wurden zur Züchtung chimärer Mäuse, die ein Gemisch aus Zellen aus den Input-ES-Zellen und dem Wirtsblastozysten präsentieren, in die Uteri scheinsschwangerer Weibchen übertragen. Das Ausmaß der ES-Zellenbildung gegenüber der Chimäre kann visuell durch die Menge der Agouti-Hüllfärbung, erhalten aus der ES-Zelllinie, auf schwarzem C57BL/6J-Hintergrund bewertet werden. Die Klone 272 und 408 produzierten nur geringe Prozentsätze an Chimären (d. h. einen geringen Prozentsatz an Agouti-Pigmentierung), Klon 264 produzierte jedoch einen hohen Prozentsatz männlicher Chimäre. Diese Chimäre wurden mit C57BL/6J-Weibchen gekreuzt, und es wurde eine Agouti-Nachkommenschaft erzeugt, die die Keimbahntransmission des ES-Zellgenoms anzeigt. Das Screening für das gezielte mu-Gen wurde durch Southern-Blot-Analyse von BglII-digierter DNA aus Schwanzbiopsien (wie oben für die Analyse von ES-Zell-DNA beschrieben) durchgeführt. Ungefähr 50 % der Agouti-Nachkommenschaft zeigte eine hybridisierende BglII-Bande von 7,7 kb zusätzlich zu der Wildtypbande von 15,7 kb, was eine Keimbahntransmission des gezielten mu-Gens demonstriert.

Analyse transgener Mäuse hinsichtlich der funktionellen Inaktivierung des mu-Gens.

[0262] Um zu bestimmen, ob die Einführung der Neokassette in Cmul das Ig-Schwerkettengen inaktiviert hat, wurde eine Klon-264-Chimäre mit einer Maus, homozygot für die JHD-Mutation, die die Schwerkettenexpression als ein Ergebnis der Deletion der JH-Gensegmente inaktiviert, gekreuzt (Chen et al., (1993) *Immunol.* 5: 647–656). Vier Agouti-Nachkommen wurden erzeugt. Das Serum wurde aus diesen Tieren im Alter von 1 Monat erhalten und durch ELISA auf die Gegenwart von Maus-IgM überprüft. Zwei der vier Nachkommen fehlte IgM vollständig (Tabelle 1). Die Gendiagnose der vier Tiere durch Southern-Blot-Analyse der DNA aus Schwanzbiopsien, durch BglII-Digestion und Hybridisierung mit Sonde A (Fig. 1) und durch StuI-Digestion und Hybridisierung mit einem 475 bp EcoRI/StuI-Fragment (ebenda) demonstrierte, daß die Tiere, die Serum-IgM nicht exprimierten, diejenigen waren, in denen ein Allel des Schwerkettenlokus die JHD-Mutation, das andere Allel die Cmul-Mutation trägt. Mäuse, heterozygot für die JHD-Mutation, zeigen Wildtyp-Konzentrationen von Serum-Ig. Diese Daten demonstrieren, daß die Cmul-Mutation die Expression des mu-Gens inaktiviert.

Maus	Serum-IgM (Mikrogramm/ml)	IgH-Kettengenotyp
42	< 0,002	CMD/JHD
43	196	+/JHD
44	< 0,002	CMD/JHD
45	174	+/JHD
129 x BL6 F1	153	+/+
JHD	< 0,002	JHD/JHD

Tabelle 1. Konzentration an Serum-IgM, detektiert durch ELISA, für Mäuse, die sowohl die CMD- als auch JHD-Mutationen tragen (CMD/JHD), für Mäuse, heterozygot für die JHD-Mutation (+/JHD), für Wildtyp (129Sv x C57BL/6J) F1 Mäuse (+/+) und für B-Zellen-defiziente Mäuse, homozygot für die JHD-Mutation (JHD/JHD).

Beispiel 2. Züchtung HCo12-transgener Mäuse

Das HCo12-humanes-Schwerkettentransgen.

[0263] Das HCo12-Transgen wurde durch die Co-Injektion des 80 kb Inserts von pHc2 (Taylor et al., 1994, *Int. Immunol.*, 6: 579–591) und des 25 kb Inserts von pVx6 erzeugt. Das Plasmid pVx6 wurde, wie nachstehend beschrieben, konstruiert.

[0264] Ein 8,5 kb HindIII/Sall-DNA-Fragment, umfassend das humane Keimbahn-VH1-18-(DP-14)-Gen zusammen mit ungefähr 2,5 kb einer 5'-flankierenden und 5 kb einer 3'-flankierenden Gensequenz, wurde zur Erzeugung des Plasmids p343.7.16 in den Plasmidvektor pSP72 (Promega, Madison, WI) subkloniert. Ein 7 kb BamHI/HindIII-DNA-Fragment, umfassend das humane Keimbahn-VH5-51-(DP-73)-Gen zusammen mit ungefähr 5 kb einer 5'-flankierenden und 1 kb einer 3'-flankierenden Genomsequenz, wurde zur Erzeugung des Plasmids p251f in den pBR322-basierenden Plasmidklonvektor pGPf geklont (Taylor et al., 1992, *Nucleic Acids Res.* 20: 6287–6295). Ein neuer Klonvektor aus pGPf, pGPIk (Seq. ID Nr. 1) wurde mit EcoRV/BamHI digeriert, und an ein 10 kb EcoRV/BamHI-DNA-Fragment, umfassend das humane Keimbahn-VH3-23-(DP47)-Gen zusammen mit ungefähr 4 kb einer 5'-flankierenden und 5 kb einer 3'-flankierenden Gensequenz, ligiert. Das resultierende Plasmid, p112.2RR.7, wurde mit BamHI/Sall digeriert und mit dem 7 kb gereinigten BamHI/Sall-Insert von p251 ligiert. Das resultierende Plasmid, pVx4, wurde mit XhoI digeriert und mit dem 8,5 kb XhoI/Sall-Insert von p343.7.16 ligiert. Ein Klon wurde mit dem VH1-18-Gen in derselben Ausrichtung wie die anderen beiden V-Gene erhalten. Dieser Klon, als pVx6 bezeichnet, wurde dann mit NotI digeriert, und das gereinigte 26-kb-Insert – zusammen mit dem gereinigten 80-kb-NotI-Insert von pHc2 bei einem 1 : 1-Molverhältnis – in die Pronuklei von halbtägigen (C57BL/6J × DBA/2J) F2-Embryos co-injiziert, wie von Hogan et al., (B. Hogan et al., *Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*, 2. Aufl., 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview NY) beschrieben. Drei unabhängige Linien transgener Mäuse, umfassend Sequenzen sowohl aus Vx6 als auch HC2, wurden aus Mäusen, die sich aus den injizierten Embryos entwickelten, etabliert. Diese Linien werden mit (HCo12)14881, (HCo12)15083 und (HCo12)15087 bezeichnet. Jede der drei Linien wurde dann mit Mäusen, umfassend die CMD-Mutation, beschrieben in Beispiel 1, die JKD-Mutation (Chen et al., 1993, *EMBO J.* 12: 811–820) und das (KCo5)9272 Transgen (Fishwild et al., 1996, *Nature Biotechnology* 14: 845–851), gekreuzt. Die resultierenden Mäuse exprimieren humane Schwer- und kappa-Leichtkettentransgene in einem Hintergrund, homozygot für die Zerstörung der endogenen Mäuse-Schwer- und kappa-Leichtkettenloki.

Beispiel 3. Erzeugung humaner IgG-Kappa-Anti-humanes-CTLA-4-monoklonaler Antikörper

Zell-basierendes Antigen

[0265] Ein DNA-Segment, das ein Fusionsprotein, umfassend Sequenzen aus den humanen CTLA-4- und den Maus-CD3zeta-Genen, kodiert, wurde durch PCR-Amplifikation von cDNA-Klonen zusammen mit verbrückenden synthetischen Oligonukleotiden konstruiert. Das kodierte Fusionsprotein enthält die folgenden Sequenzen: i. humanes CTLA-4-kodierende Aminosäuren 1–190 (enthaltend das Signalpeptid, die extrazelluläre Domäne von humanem CTLA-4 und die gesamte mutmaßliche transmembrane Sequenz von humanem CTLA-4) und ii. Maus-CD3zeta von der Aminosäure 52 bis zum Carboxyterminus (Weissman et al., (1988) *Science* 239: 1018–1021). Das amplifizierte PCR-Produkt wurde in einen Plasmidvektor geklont, und die DNA-Sequenz wurde bestimmt. Das geklonte Insert wurde dann zur Erzeugung von pBABE-huCTLA-4/CD3z in den Vektor pBABE (der ein Gen enthält, das für Puromycinresistenz kodiert (Morganstern, JP and Land, H Nucl. Acids Res. 18: 3587–96 (1990)), subklont. pBABE-huCTLA-4/CD3z wurde in die retrovirale Verpackungslinie, ψ -2, transfiziert, und ein Pool aus Puromycin-resistenten Zellen wurde gesammelt. Diese Zellen wurden mit dem Maus-T-Zellenhybridom BW5147 (ATCC#TIB-47) kokultiviert. Nach zwei Tagen der Kokultivierung wurden die nicht-haftenden BW5147-Zellen entfernt und hinsichtlich der Resistenz gegen Puromycin ausgewählt. Der Puromycin-resistente Zellpool wurde durch Grenzwert-Verdünnung subklont und auf die Oberflächenexpression von humanem CTLA-4 durch FACS getestet. Ein Klon, der hohe Konzentrationen von humanem CTLA-4 an der Zelloberfläche exprimiert, wurde ausgewählt.

Lösliches Antigen

[0266] Ein rekombinantes CTLA-4-Fusionsprotein, umfassend die extrazelluläre Domäne von humanem CTLA-4, wurde von R & D Systems (Kat.-Nr. 325-CT-200) erworben. Das extrazelluläre CTLA-4-Fragment wurde durch proteolytische Spaltung des CTLA-4-Fusionsproteins an einer Factor-Xa-Proteasespaltstelle, die sich hinter dem C-Terminus der extrazellulären CTLA-4-Domäne befindet, hergestellt. Das Fusionsprotein wurde

mit Faktor Xa bei einem Verhältnis von 50 : 1 Fusionsprotein zu Faktor Xa behandelt, und das CTLA-4-Fragment wurde mittels Passagieren über Protein-G-Sepharose und Mono Q HPLC isoliert. Die Fraktionen wurden auf die Gegenwart von humanem CTLA-4-Dimer durch SDS-PAGE und durch das Binden an Zellen, die Maus-B7-Moleküle exprimieren (LtkmB7.1: Maus-Ltk(-)-Zellen, die mit einem Maus-B7.1-cDNA-Klonexpressionsvektor transfiziert sind) getestet. Positive Fraktionen wurden gesammelt und in PBS-Puffer dialysiert.

Transgene Mäuse

[0267] Es wurden zwei unterschiedliche Stämme von Mäusen zur Erzeugung CTLA-4-reaktiver monoklonaler Antikörper verwendet. Stamm ((CMD)++; (JKD)++; (HCo7)11952+/+++; (KCoS)9272+/++) und Stamm ((CMD)++; (JKD)++; (HCo12)15087+/+++; (KCo5)9272+/+++). Jeder dieser Stämme ist homozygot für Zerstörungen der endogenen Schwerketten-(CMD) und kappa-Leichtketten-(JKD)-Loki. Beide Stämme umfassen auch ein humanes kappa-Leichtkettentransgen (KCo5), wobei einzelne Tiere sowohl hemizygot oder homozygot für Insertion Nr. 11952 sind. Die beiden Stämme differieren in dem verwendeten humanen Schwerkettentransgen. Die Mäuse waren entweder für das HCo7- oder das HCo12-Transgen hemizygot oder homozygot. Die CMD-Mutation wird oben in Beispiel 1 beschrieben. Die Züchtung von (HCo12)15087-Mäusen wird in Beispiel 2 beschrieben. Die JKD-Mutation (Chen et al., 1993, EMBO J. 12: 811–820) und die (KCo5)9272- (Fishwild et al. 1996, Nature Biotechnology 14: 845–851) und (HCo7)11952-Mäuse in US-Patent Nr. 5,770,429 (Lonberg & Kay, 6/23/98).

Immunisierung

[0268] Die transgenen Mäuse wurden zu Beginn i. p. mit $1-3 \times 10^7$ Zellen in PBS oder mit 10–50 µg löslichem Fusionsprotein in Adjuvans (entweder komplettes Freundsches oder Ribi) immunisiert. Die immunisierten Mäuse wurden dann alle 2 bis 4 Wochen i. p. mit $1-3 \times 10^7$ Zellen in PBS geboostet. Die Tiere wurden 2 bis 5 Monate auf dem Protokoll gehalten. Vor der Fusion wurden die Tiere i. v. an den Tagen –3 und –2 mit ungefähr 10^6 Zellen oder mit 10–20 µg löslichem Antigen geboostet (Fusionsprotein oder Fusionsprotein und extrazelluläres Fragment). Einige Tiere erhielten auch Fusionsprotein i. v. an Tag –4. Erfolgreiche Fusionen, die zu CTLA-4-reaktiven IgG-kappa-monoklonalen Antikörpern führten, wurden bei Mäusen, die mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Protokollen immunisiert wurden, einschließlich nur Zellen, nur lösliches Antigen und Zellimmunisierungen, gefolgt von löslichem Antigen, das i. v. vor der Fusion verabreicht wurde, erhalten.

Fusionen

[0269] Milzzellen wurden an Mausmyelomzellen (Linie P3 X63 Ag8.6.53, ATCC CRL 1580, oder SP2/0-Ag14, ATCC CRL 1581) durch Standardverfahren fusioniert (Harlow and Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York; Kennett et al., 1980, Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analysis. Plenum, New York; Oi and Hertenberg, 1980, Immunoglobulin Producing Hybrid Cell Lines, in Selected Methods In Cellular Immunology, Hrsg. Mishell and Shiigi, S. 357–372; Freeman, San Francisco; Halk, 1984, Methods in Enzymology: Plant Molecular Biology, Hrsg. Weissbach and Weissbach, S. 766–780, Academic Press, Orlando, FL). Die Zellen wurden in DMEM-, 10 % FBS-, OPI- (Sigma O-5003), BME (Gibco 21985-023), 3 % Origen Hybridoma Cloning Factor- (Igen IG50-0615) und 5 % P388d1 (ATCC TIB 63) konditionierten Medien kultiviert. Eine HAT- oder HT-Ergänzung wurde dem Medium während des anfänglichen Wachstums und der Auswahl zugegeben.

Hybridom-Screening

[0270] Zur Identifizierung von Hybridomen, die humane IgG-kappa-Antikörper sekretieren, wurden ELISA-Platten (Nunc MaxiSorp) über Nacht bei 4 °C mit 100 µl/Loch Ziege-Anti-humanem Fc-gamma-spezifischem Antikörper (Jackson Immuno Research Nr. 109-006-098) bei 1 mg/ml in PBS beschichtet. Die Platten wurden gewaschen und mit 100 µl/Loch PBS-Tween, enthaltend 1 % BSA, blockiert. Fünfzig µl Zellkulturüberstand wurden zugegeben, gefolgt von einer 1–2stündigen Inkubation. Die Platten wurden gewaschen und dann für eine Stunde mit 100 ml/Loch Ziege-Antikappa-Leichtkette, konjugiert an alkalische Phosphatase oder Meerrettichperoxidase (Sigma Nr. A-3813, oder Nr. A-7164), inkubiert. Die Platten wurden zwischen jedem Schritt dreimal in PBS-Tween gewaschen. Ein analoger Assay wurde zur Identifizierung von Hybridomen verwendet, die mit humanem CTLA-4 reaktive, humane Antikörper sekretieren. Dieser Assay war identisch, außer daß die ELISA-Platten mit rekombinantem CTLA-4-Fusionsprotein, anstelle von Ziege-Anti-humanem Fc-gamma-Antikörper beschichtet wurden.

Charakterisierung monoklonaler Antikörper

[0271] 72 Hybridome, die gemäß ELISA humanes IgG-kappa, das an humanes CTLA-4 bindet, sekretieren, wurden subkloniert. 47 dieser Subklone wurden zur Bestimmung, ob die sekretierten humanen Antikörper an CTLA-4-exprimierende Zellen binden, und ob die Antikörper das Binden von löslichem CTLA-4 an Zellen, die B7 exprimieren, hemmen, getestet. Das Binden wurde mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Zur Messung der Hemmung wurden 50 Mikroliter jedes Überstandes mit 10^5 LtkmB7.1-Zellen und 25 ng rekombinantem CTLA-4-Fusionsprotein inkubiert. Der Mittelwert der Kanalfluoreszenz wurde dann mittels Durchflußzytometrie bestimmt. [Fig. 2](#) zeigt die Hemmung des Bindens von löslichem CTLA-4 an Zellen, die B7.1 exprimieren. Der Mittelwert der Kanalfluoreszenz (MCF) von LtkmB7.1-Zellen, die mit rekombinantem humanem CTLA-4-Fusionsprotein gefärbt sind, wurde in Gegenwart eines Hybridomüberstandes bestimmt. Hybridome, die blockierende Antikörper sekretieren, führten zu niedrigeren MCF-Werten. BNI3.1 (Kat.-Nr. 34580D, Pharmingen, San Diego, CA) wurde als monoklonalen Maus-Antikörpers zur positive Kontrolle, die das CTLA-4/B7-Binden blockieren, verwendet.

[0272] Ungefähr 40 % der Hybridome hemmen die CTLA-4-Bindung an den B7-Liganden stark.

[0273] Die Antikörper aus den Klonen 10D1.3, 4B6.12 und 11E8 wurden durch BIAcore (Biacore AB, Uppsala, Schweden) zur Bestimmung der Bindungskinetiken überprüft. Das gereinigte, rekombinante, extrazelluläre CTLA-4-Fragment wurde an den CM5-Sensorchip bei 1200 Antworteinheiten (RU) gekoppelt. Das Binden wurde durch die Zugabe des Antikörpers in Konzentrationen von 0,25, 0,5, 1, 2,5 und 5 µg/ml bei einer Fließgeschwindigkeit von 5 µl/min gemessen. Die Bindungskurven wurden an ein Langmuir-Bindungsmodell unter Verwendung der BIA-Auswertungs-Software (Biacore AB, Uppsala, Schweden) angepaßt. Die Antikörper wurden durch Protein-A-Sepharose-Chromatographie gereinigt. Die bestimmten Hin- und Rückgeschwindigkeiten werden in Tabelle 2 gezeigt:

Hybridom	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	k_a (1/M)
10D1.3	$4,1 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{-4}$	4×10^9
4B6.12	$5,1 \times 10^5$	$1,3 \times 10^{-4}$	4×10^9
11E8	$4,3 \times 10^5$	$1,8 \times 10^{-4}$	2×10^9

Tabelle 2. Kinetiken für das Binden humaner IgG-kappa-Antikörper an rekombinantes CTLA-4, immobilisiert auf einer Oberfläche.

[0274] Serienverdünnungen 10 unterschiedlicher humaner IgG-kappa-Anti-humanes-CTLA-4-monoklonaler Antikörper (3A4, 9A5, 2E2, 2E7, 4B6, 4E10, 5C4, 5G1, 11E8 und 11G1) wurden zu Mikrotiterlöchern, beschichtet mit rekombinantem CTLA-4-Fusionsprotein, zugegeben. Nach 2 Stunden Inkubation wurde der biotinylierte Antikörper 11E8 bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml in jedes Loch gegeben. Die Proben wurden 30 Minuten inkubiert, gewaschen und gebundene Antikörper mit alkalischer Phosphatase/Streptavidin-Konjugat detektiert. Die Titrations sind in [Fig. 3](#) gezeigt. Die Antikörper-11E8-Bindung wurde durch sich selbst und 7 andere humane Antikörper blockiert. Das Binden wurde jedoch nicht durch die Antikörper 3A4 oder 9A5 blockiert. Reziproke Bindungsexperimente zeigten, daß die 11E8-Bindung weder die 3A4- noch die 9A5-Bindung an CTLA-4 blockierte.

DNA-Sequenz

[0275] RNA wurde aus ungefähr 2×10^6 Zellen jeder subklonierten Hybridomzelllinie extrahiert und zur Synthese von cDNA unter Verwendung von Reagenzien und Protokollen von Invitrogen verwendet (Micro-Fast-Track and cDNA Cycle: Kat.-Nr. L1310-01, und Nr. K1520-02, Invitrogen, Carlsbad, CA). Humane Immunoglobulin-Schwer- und -kappa-Leichtketten-V-Regionfragmente wurden durch PCR unter Verwendung von pfu-Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA), degenerierten FR1-Primern und einmaligen Primern des konstanten Bereiches, amplifiziert. Die resultierenden PCR-Fragmente wurden in den pCR-Blunt-Vektor (Invitrogen, Carlsbad, CA) geklont und die Sequenz des Inserts bestimmt. Die vorläufigen Sequenzen für das Schwer- und Leichtkettenfragment von Hybridom 10D1.3 werden in [Fig. 4](#) gezeigt. Die bestimmten Sequenzen für das Schwer- und Leichtkettenfragment von Hybridom 10D1.3 werden in [Fig. 5](#) bis [Fig. 8](#) gezeigt.

Tabelle 3. CDR-Sequenzen von leichten und schweren Ketten für MAbs 10D1, 4B6, und 1E2.

Kette	HuMAb	CDR1	Seq ID Nr.:	CDR2	Seq ID Nr.:	CDR3	Seq ID Nr.:
leichte Kette	10D1	RASQSVGSSYLA	24	GAFSRAT	29	QQYGSSPWT	35
	4B6	RASQSVSSSFLA	25	GASSRAT	30	QQYGSSPWT	35
	1E2	RASQGISSWLA	26	AASSLQS	31	QQYNSYPPT	36
schwere Kette	10D1	SYTMH	27	FISYDGNKYYADSVKG	32	TGWLGPFDY	37
	4B6	SYTMH	27	FISYDGSNKHYADSVKG	33	TGWLGPFDY	38
	1E2	SYGMH	28	VIVYDGSNKYYADSVKG	34	AEFYIGAFDV	39

Beispiel 4. Verwendung partieller Antikörpersequenzen zur Expression intakter Antikörper

[0276] Antikörper interagieren mit Zielantigenen vorwiegend durch Aminosäurereste, die sich in den sechs Schwere- und Leichte-Kette-komplementaritätsbestimmenden Bereichen (CDRs) befinden. Aus diesem Grund sind Aminosäuresequenzen in CDRs zwischen einzelnen Antikörpern verschiedener als Sequenzen außerhalb der CDRs. Da CDR-Sequenzen für die meisten Antikörper-Antigen-Interaktionen verantwortlich sind, können rekombinante Antikörper exprimiert werden, die die Eigenschaften spezieller, natürlich vorkommender Antikörper durch die Konstruktion von Expressionsvektoren, die CDR-Sequenzen aus dem speziellen, natürlich vorkommenden Antikörper, verpflanzt auf Gerüstsequenzen aus einem anderen Antikörper mit anderen Eigenschaften, umfassen, nachahmen (Jones et al., 1986, Nature 321, 522–525). Solche Gerüstsequenzen sind aus öffentlichen DNA-Datenbanken erhältlich, die Keimbahn-Antikörper-Gensequenzen umfassen. Diese Keimbahnsequenzen werden sich von den reifen Antikörpergensequenzen unterscheiden, da sie keine komplett zusammengebauten variablen Gene umfassen werden, die während der B-Zellreifung durch V(D)J-Joining gebildet werden. Keimbahn-Gensequenzen werden sich auch von der Sequenz eines Antikörpers des sekundären Repertoires mit hoher Affinität an einzelnen Nukleotiden aufgrund somatischer Mutationen unterscheiden. Somatische Mutationen sind jedoch nicht gleichmäßig über den variablen Bereich verteilt. Beispielsweise sind somatische Mutationen in dem Amino-terminalen Teil der Gerüstregion 1 und in dem Carboxy-terminalen Teil der Gerüstregion 4 relativ selten. Ferner verändern viele somatische Mutationen die Bindungseigenschaften des Antikörpers nicht signifikant. Aus diesem Grund muß nicht die gesamte DNA-Sequenz eines bestimmten Antikörpers zur Nachbildung eines intakten rekombinanten Antikörpers mit ähnlichen Bindungseigenschaften wie denen des ursprünglichen Antikörpers erhalten werden (siehe PCT/US99/05535 (WO 99/45962), eingereicht am 12. März 1999). Für diesen Zweck ist für gewöhnlich eine partielle Schwer- und Leichtkettensequenz, die die CDR-Regionen umfaßt, ausreichend. Die partielle Sequenz wird zur Bestimmung davon verwendet, welche variablen und verbindenden Keimbahngensegmente zu den rekombinierten, variablen Antikörpergenen beitragen. Die Keimbahnsequenz wird dann zum Auffüllen fehlender Teile des variablen Bereiches verwendet. Schwer- und Leichtketten-Leader-Sequenzen werden während der Proteinreifung gespalten und tragen nicht zu den Eigenschaften des endgültigen Antikörpers bei. Aus diesem Grund muß die entsprechende Keimbahn-Leader-Sequenz für Expressionskonstrukte nicht verwendet werden. Für die Hinzufügung fehlender Sequenzen können geklonte cDNA-Sequenzen mit synthetischen Oligonukleotiden durch Ligation oder PCR-Amplifikation kombiniert werden. Alternativ kann der gesamte variable Bereich als eine Gruppe kurzer, überlappender Oligonukleotide synthetisiert und durch PCR-Amplifikation zur Erzeugung eines vollständig synthetischen Klons des variablen Bereiches kombiniert werden. Dieses Verfahren hat bestimmte Vorteile wie die Eliminierung oder den Einfluß bestimmter Restriktionsstellen oder die Optimierung bestimmter Codons.

[0277] Die Nukleotidsequenzen von Schwer- und Leichtkettentranskripten aus einem Hybridom werden zur Gestaltung einer überlappenden Gruppe synthetischer Oligonukleotide verwendet, um synthetische V-Sequenzen mit identischen Aminosäurekodierenden Kapazitäten wie die natürlichen Sequenzen zu erzeugen. Die synthetischen Schwer- und kappa-Leichtkettensequenzen können sich von den natürlichen Sequenzen in drei Arten unterscheiden: Folgen wiederholter Nukleotidbasen werden zur Erleichterung der Oligonukleotidsynthese und PCR-Amplifikation unterbrochen; optimale Translationsinitiationsstellen werden gemäß der Kozak-Richtlinien eingeführt (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266, 19867–19870) und HindIII-Stellen werden stromaufwärts der Translationsinitiationsstellen konstruiert.

[0278] Sowohl für den variablen Schwere- als auch den variablen Leichte-Kette-Bereich werden die optimierten kodierenden und die entsprechenden nicht-kodierenden Strangsequenzen in 30–50 Nukleotidsegmente auf-

gebrochen, so daß die Brüche zwischen den Nukleotiden für die kodierende Strangsequenz ungefähr in der Mitte des entsprechenden nicht-kodierenden Oligonukleotids auftreten. Daher können sich die Oligonukleotide für jede Kette in überlappenden doppelsträngigen Gruppen versammeln, die die gewünschte Sequenz komplett umfassen. Diese Oligonukleotide werden in Pools, die Templates aus 150–400 Nukleotiden überspannen, vereinigt. Die Pools werden dann als Muster zur Produktion von PCR-Amplifikationsprodukten, die 150–400 Nukleotiden überspannen, verwendet. Typischerweise wird eine einzelne Oligonukleotidgruppe des variablen Bereiches in zwei Pools aufgebrochen, die separat amplifiziert werden, um zwei überlappende PCR-Produkte zu erzeugen. Diese überlappenden Produkte werden dann durch PCR-Amplifikation zur Bildung des kompletten variablen Bereiches vereinigt. Nach Bedarf kann auch ein überlappendes Fragment des konstanten Schwere- oder Leichte-Kette-Bereiches (umfassend die BbsI-Stelle der kappa-Leichtkette, oder die AgeI-Stelle der gamma-Schwerkette) in der PCR-Amplifikation enthalten sein, um Fragmente zu erzeugen, die leicht in die Expressionsvektorkonstrukte geklont werden können.

[0279] Die rekonstruierten variablen Schwere- und Leichte-Kette-Bereiche werden dann mit geklonten Promoter-, Translationsinitiations-, Konstanter-Bereich-, 3'-untranslatierten, Polyadenylierungs- und Transkriptionsterminationsequenzen kombiniert, um Expressionsvektorkonstrukte zu bilden. Die Schwer- und Leichtketten-Expressionskonstrukte können in einem einzelnen Vektor kombiniert, in Wirtszellen, die dann zur Bildung einer Wirtszelle, die beide Ketten exprimiert, fusioniert werden, co-transfiziert, seriell transfiziert oder separat transfiziert werden.

[0280] Plasmide zur Verwendung bei der Konstruktion von Expressionsvektoren für humanes IgGk werden nachstehend beschrieben. Die Plasmide wurden so konstruiert, daß PCR-amplifizierte V-Schwere- – und V-Leichte- -kappa-Ketten-cDNA-Sequenzen zur Rekonstruktion kompletter Schwer- und Leichtkettenminigene verwendet werden konnten. Diese Plasmide können zur Expression vollständig humaner oder chimärer IgG1k- oder IgG4k-Antikörper verwendet werden. Ähnliche Plasmide können für die Expression anderer Schwerkettenisotypen oder für die Expression von Antikörpern, die lambda-Leicht-Ketten umfassen, konstruiert werden.

[0281] Das kappa-Leicht-Kette-Plasmid, pCK7-96 (SEQ ID Nr.: 40), umfaßt den konstanten kappa-Bereich und eine Polyadenylierungsstelle, so daß kappa-Sequenzen, amplifiziert mit 5'-Primern, die stromaufwärts des Initiators Methionin HindIII-Stellen umfassen, mit HindIII und BbsI digeriert und in pCK7-96, digeriert mit HindIII und BbsI, geklont werden können, um eine komplette Leichtketten-kodierende Sequenz zusammen mit einer Polyadenylierungsstelle zu rekonstruieren. Diese Kasette kann als ein HindIII/NotI-Fragment isoliert und an Transkriptionspromotersequenzen ligiert werden, um ein funktionelles Minigen für die Transfektion in Zellen zu erzeugen.

[0282] Das Gamma-1-Schwer-Kette-Plasmid, pCG7-96 (SEQ ID Nr.: 41), umfaßt den konstanten humanen gamma-1-Bereich und eine Polyadenylierungsstelle, so daß gamma-Sequenzen, amplifiziert mit 5'-Primern, die stromaufwärts des Initiators Methionin HindIII-Stellen umfassen, mit HindIII und AgeI digeriert und in pCG7-96, digeriert mit HindIII und AgeI, geklont werden können, um eine komplette gamma-1-Schwerkette-kodierende Sequenz zusammen mit einer Polyadenylierungsstelle zu rekonstruieren. Diese Kasette kann als ein HindIII/SalI-Fragment isoliert und an Transkriptionspromotersequenzen ligiert werden, um ein funktionelles Minigen für die Transfektion in Zellen zu erzeugen.

[0283] Das Gamma-4 Schwer-Kette-Plasmid, pG4HE (SEQ ID Nr.: 42), umfaßt den konstanten humanen gamma-4-Bereich und eine Polyadenylierungsstelle, so daß gamma-Sequenzen, amplifiziert mit 5'-Primern, die stromaufwärts des Initiators Methionin HindIII-Stellen umfassen, mit HindIII und AgeI digeriert und in pG4HE, digeriert mit HindIII und AgeI, geklont werden können, um eine komplette gamma-4-Schwer-Kette-kodierende Sequenz zusammen mit einer Polyadenylierungsstelle zu rekonstruieren. Diese Kasette kann als ein HindIII/EcoRI-Fragment isoliert und an Transkriptionspromotersequenzen ligiert werden, um ein funktionelles Minigen für die Transfektion in Zellen zu erzeugen.

[0284] Zur Expression der rekonstruierten Gene der schweren und leichten Kette kann eine Vielzahl unterschiedlicher Promotoren verwendet werden (einschließlich, aber nicht beschränkt auf CMV, Ubiquitin, SRalpha und beta-Actin). Beispielsweise kann der Vektor pCDNA3.1+ (Invitrogen, Carlsbad, CA) mit HindIII und entweder NotI, XhoI oder EcoRI zur Ligation mit den oben beschriebenen kappa-, gamma-1- oder gamma-4-Kassetten gespalten werden, um Expressionsvektoren zu bilden, die direkt in Säugerzellen transfiziert werden können.

Beispiel 5. 10D.1-Bindung an CTLA-4

A. 10D1-Bindung an gereinigtes, rekombinantes humanes CTLA-4

[0285] Das Binden von 10D1 an gereinigtes, rekombinantes humanes CTLA-4 wurde durch ELISA unter Verwendung von Standardverfahren und -vorgehensweisen gezeigt ([Fig. 9](#) und [Fig. 10](#)). Mikrotiterplatten, beschichtet mit gereinigtem CTLA-4, wurden mit variierenden Konzentrationen von 10D1 inkubiert und dann mit Ziege-Antihumanes-IgG-F(ab')₂, konjugiert an alkalische Phosphatase, entwickelt. Die Daten demonstrieren das dosisabhängige Binden von 10D1, das gut an eine 4-Parameterkurve angeglichen ist (Korrelationskoeffizient $-1,0$). Die halbmaximale Bindung bei 15 ng/ml reflektiert die hohe Bindungskapazität von 10D1 an CTLA-4. Eine Sättigung der Bindung wurde bei ungefähr 0,1 µg/ml beobachtet.

B. 10D.1-Bindung an CTLA-4, exprimiert auf der Plasmamembran von T-Zellen

[0286] Zur Demonstration des Bindens von 10D1 an CTLA-4, exprimiert auf der Plasmamembran von T-Zellen, werden die Ergebnisse in [Fig. 10](#) aus einem Durchflußzytometrie-Assay gezeigt. Der Durchflußzytometrie-Assay wurde mit einer T-Zelllinie, transfiziert zur Expression hoher Konzentrationen an humanem CTLA-4 (als 58αβCTLA-4/CD3zeta-Zellen bezeichnet), verwendet. Variierende Konzentrationen an fluoresceiniertem 10D1 (10D1-FITC) wurden mit 58αβCTLA-4-Zellen inkubiert. Die zellassoziierte Fluoreszenz wurde mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Wie bei dem gereinigten CTLA4, band 10D1 dosisabhängig an CTLA4-exprimierende Zellen, was gut in eine 4-Paramatergleichung paßte (Korrelationskoeffizient $-,999$). Die halbmaximale Bindung betrug 190 ng/ml, und die Sättigung war bei 2 µg/ml erreicht. 10D1 band weder an die getesteten CTLA4-negativen Zelllinien, die SKBR-3-, BT474- und MCF10A-Brustepitheltumore und L540-Hodgkin-Tumorzellen umfassen, noch an Zellen, die Maus-CTLA-4 exprimieren. Diese Daten zeigen die Spezifität von 10D1 für humanes CTLA an. Es wurde jedoch gezeigt, daß 10D1 mit Makak-CTLA-4 kreuzreagiert (siehe unten).

C. Kreuzreaktivität von 10D1 mit normalen humanen Geweben

[0287] In dieser Studie wurde eine fluoresceinierte Form des Testgegenstandes (10D1-FITC) zur Bewertung der Bindung verwendet. Das Ziel der Studie war die Bewertung der potentiellen Kreuzreaktivität von 10D1-FITC mit Kryosektionen von normalen humanen Geweben. Es wurde keine unerwartete Kreuzreaktivität beobachtet.

[0288] Die Studie wurde gemäß der Richtlinien der Food and Drug Administration's Good Laboratory Practice (GLP) (21 CFR Part 58) durchgeführt. Die Platte mit humanem Gewebe enthielt alle Gewebe auf der „vorgeschlagenen Liste für humanes Gewebe, das für immunohistochemische Untersuchungen der Kreuzreaktivität in AnnexII der EC CPMP Guideline III/5271/94, „Production and quality control of monoclonal antibodies“ und alle Gewebe, empfohlen in 1997 US FDA/CBER „Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use“.

[0289] Unter Verwendung eines indirekten Immunoperoxidase-Verfahrens, einer 10D1-FITC-spezifisch gefärbten, Positivkontroll-, Humanes-CTLA4-exprimierender, 58abCTLA4CD3zeta-Zellen sowie Positivkontroll-Lymphozyten in einer humanen Mandel war die 10D1-FITC-Reaktivität mäßig bis stark, und es wurden zwei Konzentrationen an Antikörpern überprüft (10 µg/ml und 2,5 µg/ml). Sowohl in den Positivkontroll-58abCTLA4CD3zeta- als auch den Positivkontroll-Humanmandel-Lymphozyten färbte 10D1-FITC spezifisch diskrete, runde Körnchen an der Membran und in Zytoplasma unmittelbar unter der Membran. Die Reaktivität wurde mit gelegentlichen folliculären, interfolliculären und subepithelialen Lymphozyten beobachtet. Weniger als 1 bis 2 % aller Mandellymphozyten waren reaktiv mit 10D1-FITC.

[0290] 10D1-FITC reagierte nicht mit der Negativkontrolle von humanem Gehirn (Cerebellum). Eine Isotyp-matched Antikörper-Negativkontrolle (HulgG1-k-FITC) band nicht spezifisch an die Positivkontrolle humaner CTLA4-exprimierender 58αβCTLA4CD3zeta oder humane Mandel, noch band sie spezifisch an die Negativkontrolle von humanem Gehirn (Cerebellum).

[0291] Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität wurde 10D1-FITC in zwei Konzentrationen (10 µg/ml und 2,5 µg/ml) auf eine Platte mit normalen humanen Geweben aufgebracht. Die spezifische 10D1-FITC-Reaktivität wurde für Lymphozyten in der Mandel (3/3 Spendern), Submukosallymphoidnodulus im Darm (Gastrointestinaltrakt-Darm [1/3 Spendern]) und Blutausschlag (2/3 Spendern) beobachtet.

[0292] Immunoreaktive Zellen wurden als Lymphozyten, basierend auf der typischen Morphologie (runde mo-

lekulare Zellen mit großem Kern: Zytoplasmaverhältnis und wenig Zytoplasma, Mangel an dendritischen Verfahren, 10–15 µm Durchmesser) und Lokation in den Geweben (z. B. typische Lokation in Lymphoidgeweben) identifiziert. In den Mandeln aller drei Spender (Testgewebe), Lymphozyten, färbte 10D1-FITC spezifisch diskrete, runde Körnchen an der Membran und in dem Zytoplasma unmittelbar unter der Membran. Die Reaktivität wurde mit gelegentlichen follikulären, interfollikulären und subepithelialen Lymphozyten beobachtet. Weniger als 1–2 % aller Mandellymphozyten waren mit 10D1-FITC reaktiv.

[0293] In 1/3 geprüften Spendern färbte 10D1-FITC auch spezifisch diskrete Körnchen in gelegentlichen follikulären und interfollikulären Lymphozyten, die sich in Submukosallymphoidnodulen im Darm (Gastrointestinaltrakt-Darm [Dickdarm]) befanden. Wiederum wurden diskrete Membrankörnchen gefärbt.

[0294] In peripheren Blutaussstrichen aus zwei von drei geprüften Spendern färbte 10D1-FITC spezifisch diskrete Körnchen von ungefähr 1 µm Durchmesser, assoziiert mit der Membran seltener Lymphozyten. Die Körnchen waren in einem Ring- oder einem Kurvenmuster angeordnet. Weniger als 1–2 % aller peripheren Blutleukozyten waren mit 10D1-FITC reaktiv.

Tabelle 4. Kreuzreaktivität von MAb 10D1 mit normalen humanen Geweben

	Testgegenstand 10D1-FITC		Negativkontrolle von Antikörper HulgG1-k-FITC			
Gewebe	10 µg/ml	2,5 µg/ml	10 µg/ml	2,5 µg/ml	Assay- kontrolle*	β2-Mikro- globulin
Positivkontrolle von 58αβCTLA4CD 3zeta-Zellen	3-4+	2-4+	Neg	Neg	Neg	Pos
Positivkontrolle von Lymphozy- ten in humaner Mandel	2-3+	2-3+	Neg	Neg	Neg	Pos
Negativkontrolle von humanem Gehirn - Cere- bellum	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Nebennieren	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Blut						Pos
Neutrophile	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Lymphozyten	2+ (selten)	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Eosinophile	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Monozyten	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Blutplättchen	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Blutgefäß (En- tothel), geprüft in allen Gewe- ben	ausgeführt unter einzelnen Geweben					
Knochenmark	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Gehirn - Cere- bellum	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Gehirn - Cere- brum (Kortex)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Brust (Brustdrü- se)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Auge	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Gastrointesti- naltrakt-Darm (Dickdarm) Submukosa- lymphoidnodu- lus (gelegentli- che follikuläre und interfolliku- läre Lymphozy- ten)	2-3+	2-3+	Neg	Neg	Neg	Pos
Gastrointestinal- trakt-Darm (Dickdarm) ande- re Elemente	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Gastrointesti- naltrakt - Ösophagus	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Gastrointesti- naltrakt - Dünn- darm	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos

	Testgegenstand 10D1-FITC		Negativkontrolle von Antikörper HulgG1-k-FITC			
Gewebe	10 µg/ml	2,5 µg/ml	10 µg/ml	2,5 µg/ml	Assay- kontrolle*	β2-Mikro- globulin
Gastrointestinaltrakt - Magen	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Herz	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Niere (Glomerulum, Tubulus)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Leber	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Lunge	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Lymphknoten	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Eierstock	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Eileiter (Ovidukt)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Pankreas	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Nebenschilddrüse	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
periphere Nerven	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Hypophysen	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Plazenta	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Prostata	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Speicheldrüse	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Haut	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Rückenmark	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Milz	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
gestreifter (Skelett-) Muskel	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Testis	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Thymus	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Schilddrüse	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Mandellymphozyten (gelegentliche folliculäre, interfolliculäre und subepitheliale Lymphozyten)	2+	1-2+	Neg	Neg	Neg	Pos
Mandel, andere Elemente	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Harnleiter	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Harnblase	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Uterus-Körper (Endometrium)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Uterus-Hals	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
Testantikörper weggelassen						

D. Spezifische Reaktivität von 10D.1 mit Makaken-CTLA-4

[0295] Die spezifische Reaktivität mit Makaken-CTLA-4 wurde unter Verwendung von T-Zellen, transfiziert zur Expression des Makaken-CTLA-4 bei hohen Konzentrationen, demonstriert (Tabelle 5). Diese Daten suggerieren, daß das CTLA-4-Epitop für 10D1 zwischen Makaken und Menschen konserviert ist, weshalb der Makake ein gutes Modell zur In-vivo-Bewertung der Sicherheit von Anti-CTLA4-HuMAb-10D1 ist.

Tabelle 5

Spezies	Reaktivität des Isotyps (MFI)	Reaktivität von 10D1 (MFI)
humanes CTLA4	3	662
Makaken-CTLA4	4	606
Maus-CTLA4 (Negativkontrolle)	5	5

[0296] MAb 10D1 (10 µg/ml) wurde mit Zelllinien, die rekombinantes CTLA-4 aus verschiedenen Spezies exprimieren, inkubiert und durch FITC-anti-humanes IgG detektiert. Die zellassoziierte Fluoreszenz wurde durch FACScan bestimmt und als die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben. Diese Daten zeigen, daß MAb 10D1 gut mit Makaken- und humanem CTLA-4, aber nicht mit Maus-CTLA-4 reagiert.

Beispiel 6. 10D1-Blockierung von CTLA-4 an B7-Liganden

[0297] Um zu zeigen, daß die 10D1-Bindung an CTLA-4 die Interaktion von CTLA-4 mit CTLA-4-Liganden, B7.1- und B7.2, blockiert, wurden Konkurrenzassays mittels Durchflußzytometrie durchgeführt ([Fig. 11](#) und [Fig. 12](#)). Wie in [Fig. 11](#) gezeigt, wurde das FITC-markierte humane B7.2-Ig-Fusionsprotein mit 58αβCTLA4-T-Zellen und verschiedenen Konzentrationen von 10D1 MAb inkubiert. In [Fig. 12](#) wurde das FITC-markierte CTLA4-Ig-Fusionsprotein mit Maus-B7.1-transfizierten Zellen und verschiedenen Konzentrationen von 10D1 MAb inkubiert.

[0298] Die Konkurrenzassays demonstrieren die Fähigkeit von 10D1, CTLA4-B7-Interaktionen bei geringen Konzentrationen (1–10 µg/ml) effektiv zu hemmen. Die wirksame Konzentration wäre unter physiologischen Bedingungen, die weitaus geringere Konzentrationen von CTLA-4- und B7-Molekülen haben, wahrscheinlich viel geringer. Unter Verwendung biotinylierter Reagenzien in ELISA-Assays wurden ähnliche Daten erhalten.

[0299] Diese In-vitro-Studien demonstrieren, daß MAb 10D1 humanes CTLA-4 mit hoher Affinität und Spezifität bindet, und daß das Binden von 10D1 die Interaktion zwischen co-stimulierenden B7-Molekülen und CTLA-4 aufhebt. Diese Daten für 10D1 stimmen mit In-vitro-Aktivitätsprofilen für Anti-Maus-CTLA-4-Antikörper, die Wirksamkeit in Maus-Tumor-Modellen demonstrieren, überein.

Beispiel 6. Epitop-Mapping von 10D.1

[0300] Konkurrenz-ELISAs wurden mit Biotin-markierten und nicht-markierten Antikörpern zur Bestimmung der CTLA-4-Epitopspezifität durchgeführt. Vier Anti-CTLA-4-Epitopbindungsgruppen wurden unter den humanen Antikörpern identifiziert, und weitere zwei Epitope wurden durch die kommerziellen monoklonalen Maus-Antikörper BNI3 (Pharmingen, San Diego, Ca) und 8H5 (Anzelle Corp. Bayport, Mn) definiert. Die [Fig. 3](#) und [Fig. 13A–Fig. 13G](#) zeigen die Ergebnisse konkurrierender Bindungsassays, die eine unterschiedliche Konkurrenz unter den Antikörpern hinsichtlich des Bindens an CTLA-4 demonstrieren. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

[0301] Die Antikörper in den Anti-CTLA-4-Epitopbindungsgruppen 4a und 4b haben ähnliche Bindungsmerkmale und sind ferner starke Blocker der CTLA-4-Ig-Bindung an Zelloberflächen-exprimiertes B7.1 (Tabelle 6). Beispielsweise zeigt [Fig. 3](#) Ergebnisse mit Biotin-markiertem 11E8-Antikörper und 10 nicht markierten Antikörpern (3A4, 9A5, 2E2, 2E7, 4B6, 4E10, 5C4, 5G1, 11E8 und 11G1). Die Antikörper-11E8-Bindung wurde durch ihn selbst und 7 der anderen humanen Antikörper in den Epitopgruppen 4a und 4b blockiert. Die Bindung von 11E8 wurde jedoch nicht von den Antikörpern 3A4 oder 9A5 (Epitopgruppen 1 und 2) blockiert. Reziproke Bindungsexperimente zeigten, daß die 11E8-Bindung weder die 9A5- noch die 3A4-Bindung an CTLA-4 blockierte ([Fig. 13A](#) und [Fig. 13B](#)). Ähnliche Ergebnisse werden für den Antikörper 10D1 der Epitopgruppe 4a und den Maus-Antikörper 147 gezeigt ([Fig. 13D](#) und [Fig. 13F](#)). Die Antikörper in Epitopgruppe 4b ([Fig. 13E](#)) sind ähnlich den Antikörpern der Gruppe 4a, mit der Ausnahme, daß die Antikörper der Epitopgruppe 4b mit den Antikörpern der Epitopgruppe 2 in reziproken Bindungsexperimenten konkurrieren ([Fig. 13B](#)). Humane Antikörper, die zu den Epitopgruppen 3, 4a und 4b gehören, sind wirksame Blocker der CTLA-4/B7.1-Bindung ([Fig. 3](#) und Tabelle 6).

Tabelle 5. CTLA-4MABs: Epitop- und CTLA-4/B7.1-Blockierung

Eigenschaften

<u>Epitop</u>	<u>monoklonaler Antikörper</u>	<u>Konkurrenz um CTLA-4-Bindung</u>	<u>Blockiert das Binden von CTLA-4-Ig an B7.1 auf LtkmB7.1</u>
1	9A5	keine Konkurrenz aus den Gruppen 3, 4a, 4b, 5 und 6	nein
2	3A4 1E2	schwache Konkurrenz aus Gruppe 2 Einseitige Konkurrenz aus den Gruppen 1, 4b, 5 und 6	nein
3	5A8	keine Konkurrenz mit 4a schwache Konkurrenz aus Gruppe 3 Konkurrenz mit 4a and 4b etwas Konkurrenz mit 2	ja
4a	10D1 147* 11E8 11G1 4E10 5C4 3F10	keine Konkurrenz aus 1 und 5 Kreuzkonkurrenz mit allen Mitgliedern von 4b. Konkurrenz aus 6 (nicht-reziprok) keine Konkurrenz mit 1, 2 und 5. schwache Konkurrenz mit 3.	ja
4b	4B6 4A1 2E2 2E7 2G1	Kreuzkonkurrenz mit allen Mitgliedern von 4a Konkurrenz mit 2 schwache Konkurrenz mit 3. keine Konkurrenz mit 1 und 5. Konkurrenz aus 6 (nicht-reziprok)	ja
5	BNI3**	Konkurrenz mit 6, keine Konkurrenz mit den Gruppen 1 bis 4	ja
6	8H5***	Konkurrenz mit 5, keine Konkurrenz mit den Gruppen 1 bis 4 Konkurrenz mit Gruppe 3 nicht getestet	ja

* monoklonaler Maus-Antikörper

** erhältlich von Pharmingen, BNI3 Katalog-Nr. 34580 D, San Diego CA.

*** erhältlich von Anzelle, ANC152.2/8H5 Katalog-Nr. 359-020, Anzelle Corp. Bayport, Mn.

Beispiel 7. 10D1 bindet an humane aktivierte T-Zellen

[0302] Die Fähigkeit eines 10D1-Antikörpers, an CTLA-4, exprimiert durch normale humane T-Zellen, zu binden, wurde mittels Durchflußzytometrie-Analyse ruhender und aktivierter T-Zellen untersucht ([Fig. 14](#)). Frisch isolierte humane, mononukleäre Zellen aus peripherem Blut bei 2×10^6 /ml wurden in Gegenwart oder Abwesenheit von 2 µg/ml des T-Zellenmitogens, Phytohemagglutinin (PHA), inkubiert. Nach vier Tagen Inkubation wurden die Zellen gewaschen und mit den folgenden Antikörpern gefärbt: 1) kein Antikörper; 2) HulgG1-FITC, ein humaner IgG1-Anti-EGF-Rezeptor-Antikörper; 3) 10D1-FITC, humaner IgG1-Anti-CTLA-4-Antikörper und 4) 147-FITC-Maus-Anti-humanes-CTLA-4-Antikörper. Nach der Inkubation für eine Stunde wurden die Zellen gewaschen und mit Kaninchen-Anti-FITC-IgG, gefolgt von Ziege-Anti-Kaninchen-PE gefärbt. Die Analyse wurde an Lymphozyten, gerichtet durch Vorwärts- vs. Seitenstreuer, durchgeführt. Wie in [Fig. 14](#) gezeigt, binden die ruhenden Lymphozyten 10D1-Antikörper nicht, während PHA-aktivierte T-Zellen geringe Konzentrationen von CTLA-4 an der Zelloberfläche exprimieren.

Beispiel 8. 10D1 vermittelt keine Komplement-abhängige oder Antikörper-abhängige Lyse aktivierter T-Zellen

[0303] Es wurde die Fähigkeit von MAb 10D1, die Komplement-abhängige, zelluläre Zytotoxizität (CDCC) oder die Antikörper-abhängige, zelluläre Zytotoxizität (ADCC) CTLA-4-exprimierender Zellen zu vermitteln, untersucht.

[0304] Für die CDCC-Experimente wurde Kaninchenserum als eine Quelle für das Komplement verwendet, um optimale Bedingungen für die CDCC zu schaffen. Es ist gezeigt worden, daß das Kaninchenkomplement

die CDCC mit humanen IgG₁ wirksamer vermittelt als ein humanes Komplement (Jurianz, Maslak et al., 1999). PHA-stimulierte T-Zellen wurden mit ⁵¹Cr markiert und mit verschiedenen Konzentrationen von Anti-CTLA4-MAb 10D1 oder Anti-CD3-MAb, mit oder ohne Kaninchenserum als eine Quelle für das Komplement inkubiert. Nach einer Stunde Inkubation wurde das von sterbenden Zellen freigesetzte ⁵¹Cr unter Verwendung eines Gammazählers bestimmt. Targetzellen, inkubiert mit 2 % SDS, dienten als 100%-Lysekontrollen. Das Anti-CTLA-4-MAb 10D1 vermittelte die CDCC der aktivierten T-Zellen nicht (Figur 15). Unter denselben Bedingungen führe das Maus-IgG2_a-Anti-CD3-MAb zu einer signifikanten CDCC. Sowohl Maus-IgG2_a als auch humanes IgG₁ fixieren das Kaninchenkomplement effizient; daher spiegeln diese Differenzen höchstwahrscheinlich die stark reduzierte Expression von CTLA-4 im Vergleich zu CD3 auf aktivierten T-Zellen wider.

[0305] Dem ähnlich wurde keine ADCC-Aktivität für MAb 10D1 unter Verwendung autologer, mononukleärer Zellen als Effektorzellen beobachtet (Fig. 16). PHA-stimulierte T-Zellen wurden mit ⁵¹Cr markiert und mit verschiedenen Konzentrationen von Anti-CTLA4-MAb 10D1 oder Anti-CD3-MAb und frischer, autologer, mononukleärer Zellen inkubiert. Das Effektor-zu-Targetzelle-Verhältnis betrug 100 : 1. Nach 4 Stunden Inkubation wurde das durch sterbende Zellen freigesetzte ⁵¹Cr unter Verwendung eines Gammazählers bestimmt. Targetzellen, inkubiert mit 2 % SDS, dienten als 100%-Lysekontrollen. Obgleich Anti-CD3-MAb ein Maus-IgG2_a ist, das ADCC mit humanen Effektorzellen effizient vermitteln kann, waren nur geringe Niveaus an ADCC zu beobachten. Diese Daten stimmten mit den erforderlichen hohen Niveaus an Antigenexpression auf der Oberfläche von Targetzellen für eine effiziente ADCC überein. Da MAb 10D1 ein humanes IgG₁ ist, ein Isotyp, der im allgemeinen CDCC und ADCC vermitteln kann, ist der Mangel dieser Aktivitäten wahrscheinlich der Grund für die sehr geringe Expression von CTLA-4 auf aktivierten T-Zellen. Ferner stimmt die Beobachtung erhöhter Zahlen an aktivierten T-Zellen in den Toxikologiestudien von Primaten (siehe unten) mit der fehlenden ADCC- und CDCC-Aktivität aktivierter T-Zellen durch MAb 10D1 in vivo überein.

Beispiel 9. 10D1 vorklinische Toxizitätsstudien an Cynomolgus-Affen

[0306] Zwei unabhängige Toxikologiestudien von 10D1-Antikörpern und Makaken wurden durchgeführt. Es wurden insgesamt acht Affen analysiert. Vier Affen (zwei männliche und zwei weibliche) tolerierten drei i. v. Bolusdosen von 3 mg/kg humanem Anti-CTLA-4, und vier Affen (zwei männliche und zwei weibliche) tolerierten drei i. v. Bolusdosen von 10 mg/kg humanem Anti-CTLA4 ohne signifikante klinische, immunotoxikologische oder histopathologische Erkenntnisse.

A. 10D1-Toxikologiestudie an Primaten (3,0 mg/kg)

[0307] Für die Untersuchung der Wirkungen von 10D1 in vivo wurde eine Primat-Toxikologiestudie mit zwei Makaken durchgeführt. In einer Mehrfachdosis-Toxizitätsstudie über MAb 10D1 wurde dieser Antikörper via intravenöse Injektion den Makaken verabreicht. Das Ziel dieser Studie war die Bestimmung der Tolerierbarkeit von MAb 10D1 bei zwei Affen, denen eine Dosis verabreicht wurde, und die zeitplankompatibel mit einer effizienten Behandlung in einem Maus-Tumor-Regressionsmodell und der vorgeschlagenen Dosis in klinischen Menschenstudien sind. Zwei weibliche Cynomolgus-Affen (*Macaca fascicularis*) wurden mit drei intravenösen Bolusdosen von 3,0 mg/kg 10D1 an den Tagen 1, 4 und 7 zur Bewertung der Sicherheit und T-Zellenaktivierung in diesen Tieren behandelt. Die Tiere wurden hinsichtlich jeglicher nachteiliger Reaktionen, Gewichtsverlust/-zunahme und Morbidität und Mortalität bis zu 14 Tage nach der Verabreichung der ersten Dosis beobachtet. Sieben Tage nach der letzten Dosis wurden die Tiere getötet und zur Untersuchung ihrer Organe einzeln nekropsiert. Blutproben wurden vor jeder Dosis und vor der Nekropsie zur Überprüfung der T-Zellenpopulationen und Expression der Aktivierungsmarker mittels Durchflußzytometrie gesammelt. Auch Plasma wurde aus den Blutproben gesammelt, um die 10D1-Antikörperkonzentrationen und Anti-10D1-Antikörperantworten durch ELISA zu bestimmen.

[0308] Die Tiere tolerierten die drei Dosen Antikörper 10D1 ohne jegliche klinische Symptome während der Behandlung. Das Gewicht der Tiere veränderte sich nicht signifikant. An 47 Organen/Geweben, die bei der Nekropsie für jedes Tier überprüft wurden, wurden keine makroskopischen Feststellungen dokumentiert.

[0309] Die Histopathologiestudien wurden in den Redfield-Laboren, Redfield, AR, durchgeführt. Die Ergebnisse aus diesen Studien zeigten an, daß die Mehrfachdosen von MAb 10D1 keine akute Toxizität in irgendwelchen der geprüften Organe und Gewebe erzeugte.

[0310] Die pharmakokinetische Analyse ließ die Gegenwart signifikanter Konzentrationen (bis zu 97,3 µg/ml) an 10D1-MAb im Plasma beider Affen erkennen (siehe Tabelle 7). Die Plasmakonzentrationen von 10D1 wurden durch einen Konkurrenzassay mit FITC-10D1 unter Verwendung der Durchflußzytometrie und

58 α CTLA-4-T-Zellen bestimmt.

Tabelle 7. 10D1-Plasmakonzentrationen

Zeitpunkt	Affe 1	Affe 2
vor der 1. Dosis	0,0 (μ g/ml Plasma)	0,0 (μ g/ml Plasma)
Tag 4, vor der 2. Dosis	17,4 (μ g/ml Plasma)	43,6 (μ g/ml Plasma)
Tag 7, vor der 3. Dosis	83,6 (μ g/ml Plasma)	97,3 (μ g/ml Plasma)
Tag 14	90,2 (μ g/ml Plasma)	70,9 (μ g/ml Plasma)

[0311] Die Bewertung der Anti-10D1-Antikörperantwort wurde durch ELISA durchgeführt.

[0312] Es wurde keine signifikante Anti-10D1-Antwort in beiden Tieren im Verlauf der Studie beobachtet (Fig. 17). Mikrotiterplatten wurden mit 10D1 MAb (für den IgM-Assay) oder 10D1 F(ab')₂ (für den IgG-Assay) beschichtet. Die Dilutionen von Plasmaproben von verschiedenen Zeitpunkten wurden mit den Platten inkubiert, und Anti-10D1-Antikörper wurden entweder mit Anti-IgM- oder IgG-Fc-spezifischen alkalische Phosphatase-Reagenzien detektiert. Die IgM-Anti-10D1-Antikörper entwickelten sich scheinbar an Tag 14, die Titer waren jedoch sehr niedrig. Diese Daten demonstrieren, daß die Affen nach drei Dosen des Antikörpers keine Anti-10D1-Antikörperantworten entwickelten.

[0313] Diese Daten demonstrieren, daß die Tiere im Verlauf der Studie keine signifikante Antikörperantwort gegen MAb 10D1 entwickelten.

[0314] Die Immunotoxikologie wurde mittels Durchflußzytometrie-Analyse der Lymphozytenpopulationen im Verlauf der Studie untersucht. Die überprüften Lymphozytenuntergruppen umfaßten CD3 als einen Marker für alle T-Zellen und CD20 als einen Marker für alle B-Zellen. Die T-Zellen wurden hinsichtlich der Expression von CD4 (Helfer-T-Zellenmarker) und CD8 (zytotoxische T-Zellenmarker) sowie hinsichtlich der Aktivierung der Marker CD25, CD29, CD69 und HLA-DR weiter unterteilt. Es waren keine merklichen Veränderungen der T-Zellenpopulationen oder Expression der Aktivierungsmarker zu erkennen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 unten zusammengefaßt.

Tabelle 8. Durchflußzytometrie-Analyse von Lymphozytenpopulationen

Zeitpunkt	Affe #1	Affe #2
vor der 1. Dosis	%CD3 = 61, %CD20 = 16 %CD4 = 43, %CD8 = 50 %CD25 \leq 1, %CD29 = 41 %CD69 \leq 1, %HLA-DR = 4	%CD3 = 54, %CD20 = 22 %CD4 = 59, %CD8 = 36 %CD25 \leq 1, %CD29 = 29 %CD69 \leq 1, %HLA-DR = 1
Tag 4, vor der 2. Dosis	%CD3 = 58, %CD20 = 13 %CD4 = 38, %CD8 = 52 %CD25 \leq 1, %CD29 = 52 %CD69 \leq 1, %HLA-DR = 2	%CD3 = 56, %CD20 = 16 %CD4 = 62, %CD8 = 37 %CD25 \leq 1, %CD29 = 36 %CD69 \leq 1, %HLA-DR \leq 1
Tag 7, vor der 3. Dosis	%CD3 = 59, %CD20 = 15 %CD4 = 47, %CD8 = 59 %CD25 = 2, %CD29 = 44 %CD69 = 1, %HLA-DR = 4	%CD3 = 51, %CD20 = 17 %CD4 = 51, %CD8 = 39 %CD25 = 1, %CD29 = 39 %CD69 = 1, %HLA-DR = 2
Tag 14	%CD3 = 64, %CD20 = 14 %CD4 = 49, %CD8 = 44 %CD25 = 1, %CD29 = 44 %CD69 \leq 1, %HLA-DR = 15	%CD3 = 59, %CD20 = 20 %CD4 = 60, %CD8 = 35 %CD25 \leq 1, %CD29 = 34 %CD69 \leq 1, %HLA-DR = 1

[0315] Heparinisierte Blutproben wurden frisch mittels Durchflußzytometrie unter Verwendung FITC- oder PE-markierter Anti-Lymphozyt-Reagenzien analysiert. %CD3 und %CD20 basieren auf einem Lymphozytengate. Die zusätzlichen T-Zellenmarker und Aktivierungsmarker basieren alle auf CD3-positiven Zellen. Diese Daten zeigen an, daß Mehrfachdosen von MAb 10D1 keine signifikante Wirkung auf die B- und T-Zellenpopulationen oder die T-Zellenaktivierungsmarker haben.

B. 10D1-Primaten-Toxikologiestudie (3,0 und 10,0 mg/kg)

[0316] Sechs Cynomolgus-Affen (vier männliche und zwei weibliche), experimentell nicht-naive und bei Beginn der Studie 2,4 bis 3,8 kg schwer, wurden den in Tabelle 9 unten gezeigten Behandlungsgruppen zugeord-

net.

Tabelle 9

Gruppe Nr.	Anzahl Männchen/Weibchen	Dosiskonzentration (mg/kg)	Dosis-Vol. (ml/kg)	Dosis-Lösung Konz. (mg/ml)
1	2/0	3	0,6	5,0
2	2/2	10	2,0	5,0

[0317] Jedes Tier erhielt eine Dosis an humanem Anti-CTLA-4 (5 mg/ml Konzentration) durch intravenöse Injektion (d. h. „slow-push“-Bolusinjektion) alle drei Tage für eine Woche (d. h. an den Tagen 1, 4 und 7). Ausführliche klinische Untersuchungen wurden mindestens zweimal täglich vorgenommen („Käfig-Beobachtungen“), und eine gründliche physische Überprüfung wurde an jedem Tier vor der Studie und an Tag 12 durchgeführt. Die Körpergewichte wurden wöchentlich gemessen (vor der Studie und an den Tagen 7 und 14), und eine ophthalmoskopische Überprüfung wurde an allen Tieren vor der Studie und an Tag 12 durchgeführt. Blutproben für die Bewertung der Serumchemie-, Hämatologie- und Koagulationsparameter wurden aus allen Tieren vor der Studie und an Tag 14 genommen. Weitere Proben für ausgewählte Hämatologieparameter (Vollblutbild oder weißes Differentialblutbild) wurden vor der Dosierung an jedem Dosiertag (Tage 1, 4 und 7) genommen. Urinproben für die Standardurinalyse wurden durch Drainage aus speziell gestalteten Käfigschüsseln vor der Dosierung und an Tag 13 erhalten. Blutproben wurden auch vor jeder Dosis (Tage 1, 4 und 7) und vor Beendigung (Tag 14) für verschiedene Analysen, die von Medarex durchgeführt wurden, genommen. Diese umfaßten die Analyse der Testgegenstandskonzentration (Pharmakokinetiken), die Bestimmung der Gegenwart von Antikörpern gegen den Testgegenstand und die Durchflußzytometrie-Analyse. Alle Tiere wurden an Tag 14 getötet, wobei zu diesem Zeitpunkt eine komplette makroskopische Nekropsie durchgeführt wurde, die Hauptorgane gewogen und ein kompletter Standardgewebesatz aus jedem Tier gesammelt und zur Überprüfung durch Lichtmikroskopie aufbereitet wurde.

[0318] Die intravenöse Verabreichung von humanem Anti-CTLA-4 bei Dosiskonzentrationen von 3 mg/kg und 10 mg/kg alle drei Tage für insgesamt drei Dosen wurde von den Cynomolgus-Affen gut toleriert. Es gab keine klinischen Anzeichen von Toxizität aus den Käfig-Beobachtungen und physischen Untersuchungen, und keine Auswirkungen auf das Körpergewicht, die okularen Untersuchungserkenntnisse, die klinischen Pathologieparameter, die Feststellungen aus der makroskopischen Nekropsie, die Organgewichte oder die Gewebehistomorphologie.

[0319] Die Ergebnisse der Analyse der Testgegenstandskonzentration in den Serumproben (d. h. durch Konzentrationen, gemessen in Proben, die vor der Dosierung an den Tagen 4 und 7 und vor der Nekropsie an Tag 14 erhalten wurden) zeigten eine Dosis-abhängige Exposition zu dem Testgegenstand. An Tag 7 betragen die durchschnittlichen Vordosiskonzentrationen ungefähr 84 und 240 µg/ml für die 3- bzw. 10-mg/kg-Dosis-Gruppen.

[0320] Ein Potential zur Akkumulation des Testgegenstandes in Serum bei dem Alle-drei-Tage-Dosierplan bei Affen war aus dem Unterschied zwischen Talniveaus an Tag 4 und Tag 7 (d. h., die durchschnittlichen Konzentrationen an Tag 7 waren ungefähr zweimal so hoch wie an Tag 4) sowie aus den hohen Restkonzentrationen an Tag 14 (eine Woche nach der letzten Dosis), die den Talkonzentrationen an Tag 7 ähnelten, ersichtlich. Ein Nachweis für die Antikörperbildung gegen den Testgegenstand wurde in zwei der sechs Studientiere detektiert (eines aus Gruppe 1 und ein anderes aus Gruppe 2). In ersterem Fall schien es, als ob die Antikörperantwort die Clearance des Testgegenstandes aus dem Kreislauf beeinträchtigt hätte. Die Durchflußzytometrie-Analyse der Lymphozyten-Teilgruppen ließ insgesamt einen moderaten Anstieg CD3-positiver Zellen zwischen den Tagen 1 und 14 erkennen, was mit einem Anstieg der CD3/CD4-positiven Zellen und einer entsprechenden Verringerung CD3/CD8-positiver Zellen (nur Gruppe 2) korrelierte. Der Prozentsatz an CD3-Zellen, die CD29 und HLA-DR exprimieren, stieg im Verlauf der Studie mäßig an, was mit vorherigen Erkenntnissen, daß Anti-CTLA-4-Antikörper Antigen-spezifische T-Zellen steigern, übereinstimmt.

[0321] Abschließend ist anzumerken, daß, abgesehen von den geringfügigen Änderungen der zirkulierenden Lymphozytensubpopulationen, die in dieser Studie getestete höchste Dosiskonzentration (d. h. drei Dosen von 10 mg/kg, verabreicht in Abständen von drei Tagen) eine Dosiskonzentration war, die absolut keine Wirkung bei Cynomolgus-Affen zeigte.

Beispiel 10. Ein humaner klinischer Phase-I-Versuch mit MAb 10D1 in Prostatakrebs (MDXCTLA4-01) und Melanom (MDXCTLA4-02)

[0322] MDXCTLA4-01 ist eine informationsoffene Studie des monoklonalen Antikörpers 10D1 (MAb 10D1) gegen Anti-zytotoxisches T-Lymphozyt-assoziierten Antigen-4 (Anti-CTLA-4) an Patienten mit progressivem, metastatischem, Hormon-refraktärem Prostatakrebs. Die Behandlung ist eine Einzeldosis von MAb 10D1, die intravenös, als eine Infusion, mit einer Dosierung von 3,0 mg/kg verabreicht wird.

[0323] Die Ziele dieses Versuches sind die Bestimmung, ob i. die Verabreichung von MAb 10D1 eine nicht-spezifische T-Zellenaktivierung verursacht, ii. die Etablierung eines Sicherheits-/Tolerierbarkeits-Profiles für MAb 10D1 bei diesen Patienten und, iii. die Bestimmung des pharmakokinetischen Profils von MAb 10D1 und Bewertung der Entwicklung einer Wirtsimmunantwort auf MAb 10D1. Überdies wird die Studie versuchen, einen vorläufigen Nachweis für die Effizienz zu identifizieren. Die Studie ist eine Mehrzentren-, informationsoffene Studie einer einzelnen Dosis von MAb 10D1 mit 14 Individuen. Die Studie besteht aus vier Phasen: Screening, Infusion, Nachinfusion und Nachbehandlung (siehe Tabelle 10 unten).

Tabelle 10

Phase	Screening	Infusion	Nach der Infusion											Nachbehandlung			
			Zeit	Tage	-30 bis 0	145 min	160 min	190 min	250 min	370 min	24 h	48 h	72 h		Tag 7	Tag 14	Tag 21

[0324] Patienten mit histologischer Diagnose von primärem Adenokarzinom der Prostata, und progressivem, metastatischem Karzinom der Prostata nach Androgenmangel und mindestens einer systemischen, nicht-hormonalen Manipulation werden für die Teilnahme an dieser Studie gescreent. Die Individuen müssen eine fortschreitende meßbare Krankheit, zunehmendes PSA, PSA > 5 ng/ml, Testosteron < 50 ng/dl, primäre gonadale Androgensuppression, Lebenserwartung > 12 Wochen und einen Karnofsky-Index von $\geq 60\%$ haben.

[0325] Die Individuen werden einer physischen Untersuchung, ECG, Thoraxradiographie, diagnostischen Bildgebung und Blutprobennahme für hämatologische, biochemische und Immunfunktionsbewertungen unterzogen und werden auf Lebenszeichen überwacht. Monatliche telefonische Befragungen werden zur Sammlung und Aufzeichnung von Informationen über eine Teilmenge nachteiliger Ereignisse, einschließlich nachteiliger Autoimmunereignisse nach dem Fortschreiten der Krankheit bis sechs Monate nach der Behandlung vorgenommen. PSA (Rückgang, Dauer des Rückgangs, Fortschreiten, Zeit bis zum Fortschreiten) und Krankheitsreaktion (komplett, teilweise, stabil, progressiv) werden aufgezeichnet. Plasmakonzentrationen an MAb 10D1 werden unmittelbar vor, während und bis zu zwei Monate nach der Infusion bewertet.

[0326] Die Daten aus vier Individuen mit Prostatakrebs, die behandelt worden sind, sind in Tabelle 11 gezeigt. Es sind keine nachteiligen Ereignisse aufgezeichnet worden. Alle behandelten Individuen schienen MAb 10D1 gut zu tolerieren.

[0327] Da die Aufzeichnung des Immunstatus der Patienten in dem Versuch und das spezifische Ziel der Aufzeichnung verallgemeinerter Wirkungen auf die T-Zellenaktivierung durch Anti-CTLA-4-Antikörper wichtig ist, umfaßten die Eintrittskriterien dieser Studie minimale Konzentrationen an CD4- und CD8-T-Zellen von $\geq 500/\text{ml}$ bzw. $\geq 500/\text{ml}$. Zu Beginn der Studie wurde jedoch festgestellt, daß Prostatakrebspatienten signifikant reduzierte T-Zellzahlen aufwiesen, obgleich eindeutig CD4- und CD8-T-Zellen vorhanden sind. Viele Patienten wurden anfangs, basierend auf den obigen Eintrittskriterien, abgelehnt (siehe Tabelle 11). Die scheinbar festgestellten reduzierten T-Zellzählungen sind eine frühere nicht-dokumentierte Beobachtung bei Prostatakrebspatienten, die bei Behandlungen relevant sein kann, die die Krebsimpfung bei diesen Patienten umfassen. Nach diesen Beobachtungen wurden die Eintrittskriterien dahingehend geändert, daß Patienten mit CD4- und CD8-Zählungen von $\geq 300/\text{ml}$ bzw. $\geq 200/\text{ml}$ einbezogen wurden.

[0328] Um zu bewerten, ob die Verabreichung von MAb 10D1 die unerwünschte nicht-spezifische T-Zellaktivierung induzieren kann, wurden periphere Blutlymphozyten der Prostatakrebsindividuen mittels Durchflußzytometrie für jeden der folgenden Marker analysiert: CD4, CD8, CD25, CD44, CD69 und HLA-DR. Die Blutproben wurden zu den in Tabelle 10 angezeigten Zeitpunkten genommen. Im Verlauf der Behandlung jedes der

bisher behandelten Prostatakrebsindividuen war keine signifikante Änderung der Häufigkeit eines dieser Marker zu beobachten. Ein Beispiel für diese Analyse ist in Tabelle 12 gezeigt, das die Häufigkeit CD4-, CD25-, CD69-positiver Zellen und CD8-, CD25-, CD69-positiver Zellen vor, während und nach der MAb-10D1-Verabreichung in zwei der Individuen zeigt. Diese Daten demonstrieren, daß die MAb 10D1-Verabreichung nicht zu einer nicht-spezifischen T-Zellaktivierung führt.

Tabelle 12. Durchflußzytometrie-Analyse von T-Zellen-Aktivierungsmarkern in Prostatakrebsindividuen, behandelt mit 3,0 mg/kg MAb 10D1.

Patientennummer	Zeitpunkt	CD(4+25+69) %	CD (8+25+69) %
3	Screening	1.7	0.8
3	-30MIN (vor der Infusion)	2.6	0.8
3	40 MIN	2.5	0.7
3	130 MIN	1.9	0.9
3	145 MIN	1.7	0.5
3	160 MIN	1.7	1
3	190 MIN	1.5	1.5
3	250 MIN	2.1	1.2
3	370 MIN	1.3	0.9
3	24 H	1.6	1.6
3	48 H	2.7	3
3	72 H	0.9	0.5
3	Tag 7	0.9	0.1
3	Tag 14	0.4	0.5
3	Tag 21	2.3	1.9
4	Screening	1.4	0.8
4	-30 MIN (vor der Infusion)	0.5	0.3
4	40 MIN	0.3	0.1
4	130 MIN	0.3	0.1
4	145 MIN	0.4	0.2
4	160 MIN	0.2	0.2
4	190 MIN	0.8	0.3
4	250 MIN	0.1	0
4	370 MIN	0.3	0.1
4	24 H	0.2	0.3
4	48 H	0.4	0.6
4	72 H	0.8	0.3
4	Tag 7	1	0.7
4	Tag 14	1.1	0.8

[0329] Es ist ebenso ein zweiter klinischer Versuch (MDXCTLA4-02) unter Verwendung von MAb 10D1 in Individuen mit malignem Stufe-IV-Melanom initiiert worden. Eine Einzeldosis von MAb 10D1 wird intravenös, als eine Infusion, in einer Dosierung von 3,0 mg/kg verabreicht. Auch diese Studie besteht aus vier Phasen (Screening, Infusion, Nachinfusion und Nachbehandlung), wie in Tabelle 9 oben beschrieben.

[0330] Die Ziele dieser Studie sind die für die oben beschriebene Studie an Prostatakrebs sowie die spezifische Etablierung eines Sicherheits/Tolerierbarkeits-Profiles für MAb 10D1 bei Patienten mit malignem Stufe-IV-Melanom. In dieser Studie ist ein Patient behandelt worden (siehe Tabelle 13). Wie bei der Prostatakrebsstudie wurde MAb 10D1 scheinbar gut toleriert. Die Durchflußzytometrie-Analyse der T-Zellen-Aktivierungs-

marker bei diesem Individuum, analog zu der für den Prostata-Tumor-Versuch durchgeführten, zeigte ebenfalls keinen Nachweis für eine nicht-spezifische T-Zellaktivierung.

pCK7-96 (SEQ ID Nr.: 40)

AGGAGAATGAATAAATAAAGTGAATCTTTGCACCTGTGGTTTCTCTCTTTCTCAATTTAATAATTATTATCTGT
TGTTTACCACTACTCAATTTCTTTATAAGGGACTAAATATGTAGTCATCCTAAGGCGCATAACCATTATAAAA
AATCATCCTTCATTCTATTTTACCTATCATCTCTGCAAGACAGTCCTCCCTCAAACCCACAAGCCTTCTGTCC
TCACAGTCCCCTGGGCCATGGATCTCACATCCCAATCCGCGGCCGCAATTTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTC
CTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTG
CCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGTGCC
AGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGC

pCG7-96 (SEQ ID Nr. 41)

GAACTCGAGCAGCTGAAGCTTTCTGGGCGAGGCCAGGCTGACCTTGGCTTTGGGGCAGGGAGGGGGCTAAGGTG
AGGCAGGTGGGCGCCAGCCAGGTGCACACCCCAATGCCATGAGCCAGACACTGGACGCTGAACCTCGCGGACAGT
TAAGAACCAGGGGCTCTGCGCCTGGGCCAGCTCTGTCCACACCGCGGTTCACATGGCACCACCTCTCTTGC
AGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGCGACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGACAGCGGCCCT
GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCTGACCAGCGGCGT
GCACACCTTCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAG
CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGGTGA
GAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGTGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCCTGCCTGGACGCATCCCGGCTATG
CAGCCCCAGTCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCGCTCGCCTTTCACCCGGAGGCTCTGCCCGCCCCACTCATGC
TCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTCCCCAGGCTCTGGGCGAGCACAGGCTAGGTGCCCTAACCCAGGCCCTG
CACACAAAGGGGCGAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCTCGCCCTGACCTAAGCC
CACCCCAAAGGGGCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCTTCTCTCTCCAGATTCCAGTAACTCCCAATC
TTCTCTCTGCGAGCCCAAACTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCGCCAGGTAAGCCAGCCAGGCT
CGCCCTCCAGCTCAAGGCGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGTCTGAC
ACGTCCACCTCATCTCTCTCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCC
AAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAG
GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACCGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCAGTACCGTGTGGTCAAGGCTCCTCAGGCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAG
GTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCCCAAGCCAAAGGTGGGACCCCGTGGTGGCA
GGGCCACATGGACAGAGCCCGGCTCGGCCACCCCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTAC
AGGGCAGCCCCGAGAACCCAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCT
GACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGACGCGGAGAACAA
CTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGTCTACCGTGGACAAGAG
CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCGAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGAGTGGCAGCGCCGGCAAGCCCCGCTCCCGGGCTCTCGCGGTGCGCACGAG
GATGCTTGGCAGTACCCCTGTACATACTTCCGGGCGCCAGCATGGAAATAAAGCACCCAGCTGCCCTGG
GCCCTGCGAGACTGTGATGGTTCTTCCAGGGTCAAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGTGGCATGAGGGAGGCAGA
GCGGGTCCCCTGTCACACTGTCACACTGGCCAGGCTGTGCAGGTGTCTGGGGCCCCCTAGGGTGGGGCTCAGCCAGG
GGTGGCTCCGCGAGGCTGGGGATTGGCAGCGTGGCCCTCCCTCCAGCAGCACCTGCCCTGGGCTGGGCCAGG
GGAAGCCCTAGGAGCCCTGGGGACAGACACACAGCCCTGCCTCTGTAGGAGACTGTCTGTTCTGTGAGCGCC
CCTGTCTCCGACCTCCATGCCACTCGGGGGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGC
TCGAATTCATCGATGATATCAGATCTGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTGTATTAAATTCGATAAGCCAGGTTAAC
CTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTCCGCTTCTCTGCTCACT
GACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCCGCTCGGGCGAGCGGATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACA
GAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGACATGTGAGCAAATGCGCCAGCAAAGGCGCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCG
TTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGA
AACCCGACAGGACTATAAAGATAACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTG
CCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCCCTTCCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTAT
CTCAGTTCGGTGTAGGTGCTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTACGCCCGACCGCTGCGCC
TTATCCGGTAACTATCGTCTTGGTCCAACCCGTAAGACAGCACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAC
AGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGA
AGGACAGTATTTGGTATGCTCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACTTCCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGC
AAACAAACCCAGCTGGTGTGCGGTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAA
GAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAAGAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCAATG
AGATTATCAAAAAGGATCTTCACTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATAT
GAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTCA
TCCATAGTTGCCTGACTCCCGTCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCA
ATGATACCGGAGACCCACGCTCACGGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGC
AGAAGTGGTCTGCAACTTATCCGCTCCATCCAGTCTAATAATGTTGCGGGAAAGCTAGAGTAAGTATGCTG
CCAGTTAATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATGTCTACAGGCTCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCT
TCATTCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCC
TTCCGTTCTCCGATCGTTGTCAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAAT

TCTCTACTGTCAATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAG
 TGATGCGCGGACCGAGTTGCTCTTGGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACCTTAAAA
 GTGCTCATCATTTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATG
 TAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGA
 AGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATAT
 TATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATA
 GGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTAT
 AAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGTGACGGTGAACCTCTGACACATGCAG
 CTCCCGGAGACGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGT
 GTTGGCGGGTGTCCGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGGACATA
 TTGTCGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCTTATGTATCATAACACATACGATTTAGGTGACACTATA

pG4HE (SEQ ID Nr. :42)

GAACTCGAGCAGCTGAAGCTTTCTGGGGCAGGCCGGGCTGACTTTGGCTGGGGGCGAGGGAGGGGGCTAAGGTGA
 CGCAGGTGGCGCCAGCCAGGTGCACACCCAAATGCCATGAGCCAGACACTGGACCCTGCATGGACCATCGCGGA
 TAGACAAGAACCAGGGGGCTCTGCGCCCTGGGCCAGCTCTGTCCCACACCGCGGTACATGGCACCACCTCTC
 TTGCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGCTTTCCCCCTGGCGCCCTGTCTCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCG
 CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGGCGCCCTGACCAGCG
 GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCA
 GCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTG
 GTGAGAGGCCAGCACAAGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCCCTCCTGCTGGACGCACCCCGGC
 TGTGCAGCCCCAGCCAGGGCAGCAAGGCATGCCCAATCTGTCTCCTCACCCGAGGCTCTGACCACCCCACTC
 ATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGATTTTCCACCAGGCTCCGGGCGACCACAGGCTGGATGCCCTACCCAGG
 CCCTGCGCATACAGGGGAGGTGTGCGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCTGCCCCCTGACCT
 AAGCCCACCCCAAAGGCCAACTCTCCACTCCCTCAGCTCAGACACCTTCTCTCCTCCAGATCTGAGTAACTCC
 CAATCTTCTCTCTGAGAGTCCAAATATGGTCCCCATGCCATCATGCCAGGTAAGCCAACCCAGGCTCTGCC
 CTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGTGACGCAT
 CCACCTCCATCTCTTCTCAGCACCTGAGTCTCTGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCTCCCAAAACCAAGG
 AACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCC
 AGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGTTCACACAGCA
 CGTACACGTGTGGTCAAGCTCCTCAGCGTCTGACCCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCT
 CCAACAAAGGCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGTGGGACCCACGGGGTGCAGGGC
 CACATGGACAGAGGTGAGCTCGGCCACCCCTCTGCCCTGGGAGTGACCGCTGTGCCAACCTCTGTCCCTACAGGG
 CAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCAGGAGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACC
 TGCTTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTAC
 AAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGG
 TGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTC
 TCCCTGTCTCTGGGTAAATGAGTGCCAGGGCCGGCAAGCCCCGCTCCCGGGCTCTCGGGGTCGCGCGAGGATG
 CTTGGCAGCTACCCGCTACATACTTCCAGCACCAGCATGGAAATAAAGCACCCACCACTGCCCTGGCCCC
 CTGTGAGACTGTGATGTTCTTCCAGGGTCAAGCCAGTCTGAGGCTGAGTGACATGAGGGAGGCAAGCGG
 GTCCCACTGTCCCCACACTGGCCAGGCTGTGCAGGTGTGCCCTGGGCCACCTAGGGTGGGGCTCAGCCAGGGGCT
 GCCCTCGGCAGGGTGGGGATTTGCCAGCGTGGCCCTCCCTCCAGCAGCAGCTGCCCTGGGCTGGGCCACGGGAA
 GCCCTAGGAGCCCTGGGGACAGACACACAGCCCTGCCCTCTGTAGGAGACTGTCTGTCTGTGAGCGCCCTGT
 CCTCCGACCCCATGCCACTCGGGGGATCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCATCGATGATATCAGATCTGCC
 GGTCTCCCTATAGTGAGTCTGATTAATTTTCGATAAGCCAGGTTAACCTGCATTAATGAATCGGCCAACCGCGGG
 GAGAGGCGGTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGCTCGGCTGCG
 GCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACAT
 GTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCTTGTGCTGGCGTTCATAGGCTCCGCCC
 CCTGACGAGCATCAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGC
 GTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCGTTCCGACCCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTCT
 CCTTCGGGAAGCGTGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCTGCTCCAA
 GCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAA
 CCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGG
 TGCTACAGAGTTCTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCT
 GAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTT
 TTTTGTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTCTACGGGGTCT
 TGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGAT
 CCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATG
 CTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTATCCATAGTTGCCCTGACTCCCGTCTGTGTA
 GATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCAGC
 TCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTATCCGCTC

CATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCAACGTTGTTGC
 CATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTAGCTCCGGTCCCAACGATCAAG
 GCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCGATCGTTGTGAGAAATA
 GTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGCATGCCATCCGTAAGATG
 CTTTTCTGTGACTGGTGGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCC
 GCGTCAATAACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGG
 GCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTC
 AGCATCTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAG
 GCGCACAAGAAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCT
 CATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGT
 GCCACCTGACGCTAAGAAACATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCAGGAGGCCCTTTCCG
 TCTCGCGCTTTCCGGTGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTACAGCTTGTCTGTA
 AGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTACGCGGTGTTGGCGGGTGTGGGGCTGGCTTAACTA
 TGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGGACATATTGTGTTAGAACGCGGCTACAATTAATA
 CATAACCTTATGTATCATACACATACGATTTAGGTGACACTATA

10D1 VH (SEQ ID Nr.: 16)

CAGGTGCAGC	TGGTGGAGTC	TGGGGGAGGC	GTGGTCCAGC	CTGGGAGGTC	50
CCTGAGACTC	TCCTGTGCAG	CCTCTGGATT	CACCTTCAGT	AGCTATACTA	100
TGCACTGGGT	CCGCCAGGCT	CCAGGCAAGG	GGCTGGAGTG	GGTGACATTT	150
ATATCATATG	ATGGAACAA	TAAATACTAC	GCAGACTCCG	TGAAGGGCCG	200
ATTCACCATC	TCCAGAGACA	ATTCCAAGAA	CACGCTGTAT	CTGCAAATGA	250
ACAGCCTGAG	AGCTGAGGAC	ACGGCTATAT	ATTACTGTGC	GAGGACCGGC	300
TGGCTGGGGC	CCTTTGACTA	CTGGGGCCAG	GGAACCCCTGG	TCACCGTCTC	350
CTCAG					

10D1 VK (SEQ ID Nr.: 6)

GAAATTGTGT	TGACCCAGTC	TCCAGGCACC	CTGTCTTTGT	CTCCAGGGGA	50
AAGAGCCACC	CTCTCCTGCA	GGGCCAGTCA	GAGTGTGGC	AGCAGCTACT	100
TAGCCTGGTA	CCAGCAGAAA	CCTGGCCAGG	CTCCCAGGCT	CCTCATCTAT	150
GGTGCAITCA	GCAGGGCCAC	TGGCATCCCA	GACAGGTTCA	GTGGCAGTGG	200
GTCTGGGACA	GACTTCACTC	TCACCATCAG	CAGACTGGAG	CCTGAAGATT	250
TTGCAGTGTA	TFACTGTGAG	CAGTATGGTA	GCTCACCGTG	GACGTTCCGC	300
CAAGGGACCA	AGGTGGAAAT	CAAAC			325

4B6 VH (SEQ ID Nr.: 18)

CAGGTGCAGC	TGGTGGAGTC	TGGGGGAGGC	GTGGTCCAGC	CTGGGAGGTC	50
CCTGAGACTC	TCCTGTGCAG	CCTCTGGATT	CACCTTCAGT	AGCTATACTA	100
TGCACTGGGT	CCGCCAGGCT	CCAGGCAAGG	GGCTGGAGTG	GGTGACATTT	150
ATATCATATG	ATGGAAGCAA	TAAACTACTAC	GCAGACTCCG	TGAAGGGCCG	200
ATTCACCGTC	TCCAGAGACA	ATTCCAAGAA	CACGCTGTAT	CTGCAAATGA	250
ACAGCCTGAG	AGCTGAGGAC	ACGGCTATAT	ATTACTGTGC	GAGGACCGGC	300
TGGCTGGGGC	CCTTTGACTA	CTGGGGCCAG	GGAACCCCTGG	TCACCGTCTC	350
CTCAG					

4B6 VK (SEQ ID Nr.: 8)

GAAATTGTGT	TGACCCAGTC	TCCAGGCACC	CTGTCTTTGT	CTCCAGGGGA	50
AAGAGCCACC	CTCTCCTGCA	GGGCCAGTCA	GAGTGTAGC	AGCAGCTTCT	100
TAGCCTGGTA	CCAGCAGAAA	CCTGGCCAGG	CTCCCAGGCT	CCTCATCTAT	150
GGTGCAITCA	GCAGGGCCAC	TGGCATCCCA	GACAGGTTCA	GTGGCAGTGG	200
GTCTGGGACA	GACTTCACTC	TCACCATCAG	CAGACTGGAG	CCTGAAGATT	250
TTGCAGTGTA	TFACTGTGAG	CAGTATGGTA	GCTCACCGTG	GACGTTCCGC	300
CAAGGGACCA	AGGTGGAAAT	CAAAC			325

1E2 VH (SEQ ID Nr.: 22)

CAGGTGCAGC	TGGTGGAGTC	TGGGGGAGGC	GTGGTCCAGC	CTGGGAGGTC	50
CCTGAGACTC	TCCTGTGCAG	CGTCTGGATT	CACCTTCAGT	AGCTATGGCA	100
TGCACTGGGT	CCGCCAGGCT	CCAGGCAAGG	GGCTGGAGTG	GGTGCCAGTT	150

ATATGGTATG ATGGAAGTAA TAAATACTAT GCAGACTCCG TGAAGGGCCG 200
 ATTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA 250
 ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCTGTGT TTTACTGTGC GAGAGCTCCC 300
 AATTATATTG GTGCTTTTGA TGTCTGGGGC CAAGGGACAA TGGTCACCGT 350
 CTCTTCAG

1E2 VK (SEQ ID Nr. : 12)

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCA CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA 50
 CAGAGTCACC ATCACTTGTC GGGCGAGTCA GGGTATTAGC AGCTGGTTAG 100
 CCTGGTATCA GCAGAAACCA GAGAAAGCCC CTAAGTCCCT GATCTATGCT 150
 GCATCCAGTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA AGGTTCAGCG GCAGTGGATC 200
 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATTTTG 250
 CAACTTATTA CTGCCAACAG TATAATAGTT ACCCTCCGAC GTTCGGCCAA 300
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA AC 322

Sequenzprotokoll

<110> MEDAREX, INC.

<120> Humane Antikörper gegen CTLA-4 und deren Verwendungen

<130> P033834EP

<140> EP 00959399.7

<141> 2000-08-24

<150> US 60/150,452

<151> 1999-08-24

<160> 42

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3159

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Klonvektor

pGP1k

<400> 1

```

aattagcggc cgctgtcgac aagcttcgaa ttcagtatcg atgtggggta cctactgtcc 60
cgggattgcg gatccgcgat gatatcggtg atcctcagagt gcggccgcag tatgcaaaaa 120
aaagcccgtc cattaggcgg gctcttggca gaacatatcc atcgcgtccg ccatctccag 180
cagccgcacg cggcgcacat cgggcagcgt tgggtcctgg ccacgggtgc gcatgatcgt 240
gctcctgtcg ttgaggaccc ggctaggctg gcggggttgc cttactggtt agcagaatga 300
atcaccgata cgcgagcgaa cgtgaagcga ctgctgctgc aaaacgtctg cgacctgagc 360
aacaacatga atggctctcg gtttccgtgt ttcgtaaagt ctggaaacgc ggaagtcagc 420
gccctgcacc attatgttcc ggatctgcat cgcaggatgc tgctggctac cctgtggaac 480
acctacatct gtattaacga agcgtggca ttgaccctga gtgatttttc tctgggtccc 540
ccgcatccat accgccagtt gtttaccctc acaacgttcc agtaaccggg catgttcac 600
atcagtaacc cgtatcgtga gcatcctctc tcgtttcatc ggtatcatta cccccatgaa 660
cagaaattcc cccttacacg gaggcacaa gtgaccaaac aggaaaaaac cgccctaac 720
atggcccgtc ttatcagaag ccagacatta acgcttctgg agaaactcaa cgagctggac 780
gcggatgaac aggcagacat ctgtgaatcg cttcacgacc acgctgatga gctttaccgc 840
agctgcctcg cgcgtttcgg tgatgacggg gaaaacctct gacacatgca gctcccggag 900
acggtcacag cttgtctgta agcggatgcc gggagcagac aagcccgtca gggcgcgtca 960
gcgggtgttg gcgggtgtcg gggcgcagcc atgaccagat cacgtagcga tagcggagt 1020
tatactggct taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac catatgcggt 1080
gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgtctt tccgcttct 1140
cgctcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa 1200
aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa 1260
aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcggtt gctggcgttt ttccataggc 1320
tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaccgga 1380
caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc 1440
cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt 1500
ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgtccc aagctgggct 1560
gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg 1620
agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccaggcgc gccttggcct 1680
aagaggccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcgggtgct acagagttct 1740
tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc 1800
tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 1860
ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 1920
aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt 1980

```

```

aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaa 2040
aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggctgac agttaccaat 2100
gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc atagtgcct 2160
gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggcct accatctggc cccagtgcctg 2220
caatgatacc gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag 2280
ccggaagggc cgagcgcaga agtggtcctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta 2340
attggtgccc ggaagctaga gtaagttagt cgccagttaa tagtttgccg aacgttggtg 2400
ccattgctgc aggcatcgtg gtgtcacgct cgctcgttgg tatggcttca ttcagctccg 2460
gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat cccccatggt gtgcaaaaaa gcggttagct 2520
ccttcggctc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtggtatca ctcatggta 2580
tggcagcact gcataattct ctactgtca tgccatccgt aagatgctt tctgtgactg 2640
gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc 2700
cggcgtcaac acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaagtg ctcatcattg 2760
gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgtgaga tccagttcga 2820
tgtaaccacc tcgtgcaccc aactgatctt cagcatctt tactttcacc agcgtttctg 2880
ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat 2940
gttgaatact catactctc ctttttcaat attattgaag cttttatcag ggttattgtc 3000
tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca 3060
catttccccg aaaagtgcc cctgacgtct aagaaacat tattatcatg acattaacct 3120
ataaaaatag gcgtatcacg aggccctttc gctctcaag 3159

```

<210> 2
<211> 349
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> vorläufige Sequenz für Schwerkettenfragment
10D1.3

```

<400> 2
tgggggagggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc tcctgtgcag cctctggatt 60
caccttcagt agctatacta tgcaactgggt ccgccaggct ccaggcaagg ggctggagtg 120
ggtgacattt atatcatatg atggaaacaa taaatactac gcagactccg tgaagggccg 180
attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat ctgcaaatga acagcctgag 240
agctgaggac acggctatat attactgtgc gaggaccggc tggctggggc cctttgacta 300
ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc accaagggc 349

```

<210> 3
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> vorläufige Sequenz für Leichtkettenfragment
10D1.3

```

<400> 3
ctccaggcac cctgtctttg tctccagggg aaagagccac cctctcctgc agggccagtc 60
agagtgttgg cagcagctac ttagcctggg accagcagaa acctggccag gctcccaggc 120
tctcatcta tgggtgcatc agcagggcca ctggcatccc agacagggtc agtggcagtg 180
ggtctgggac agacttcact ctcaccatca gcagactgga gcctgaagat tttgcagtg 240
attactgtca gcagtatggg agctcaccgt ggacgttcgg ccaagggacc aaggtggaaa 300
tcaaacgaac tgtggctgca c 321

```

<210> 4
<211> 2&7
<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Vk A-27 Keimbahnsequenz

<400> 4

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcacc 287

```

<210> 5

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> vorausgesagte Sequenz des variablen Leichte-Kette-Bereiches für die

Vk A-27 Keimbahn

<400> 5

```

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

```

<210> 6

<211> 325

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> variabler Leichte-Kette-Bereich (Vk), 10D1 aus Vk

A-27

<400> 6

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgtg gacgttcggc 300
caagggacca aggtggaat caaac 325

```

<210> 7

<211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>

<223> vorausgesagte Sequenz des variablen Leichte-Kette-Bereiches für
 10D1 aus Vk A-27

<400> 7

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser
 20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 8
 <211> 325
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>

<223> variabler Leichte-Kette-Bereich (Vk) 4B6 aus Vk A-27

<400> 8

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agcagcttct tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgtg gacgttcggc 300
 caagggacca aggtggaat caaac 325

<210> 9
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>

<223> vorausgesagte Sequenz des variablen Leichte-Kette-Bereiches für
 4B6 aus Vk A-27

<400> 9

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 10
 <211> 287
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Vk L-15 Keimbahnsequenz

<400> 10
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcaattgtc gggcgagtca gggattagc agctggtag cctggatca gcagaaacca 120
 gagaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt accctcc 287

<210> 11
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> vorausgesagte Sequenz des variablen Leichte-Kette-Bereiches für die
 Vk L-15 Keimbahn

<400> 11
 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 Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr

85

90

<210> 12
 <211> 322
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> variabler Leichte-Kette-Bereich Vk 1E2 aus Vk L-15

<400> 12
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca gggatttagc agctggtag cctggatca gcagaaacca 120
 gagaaagccc ctaagtccct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt accctccgac gttcggccaa 300
 ggaccaagtg tggaaatcaa ac 322

<210> 13
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> vorausgesagte Sequenz des variablen Leichte-Kette-Bereiches für
 1E2 aus Vk L-15

<400> 13
 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 Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 14
 <211> 294
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> VH 3-30.3 Keimbahnsequenz

<400> 14

```

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagcaa taaatactac 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gaga      294

```

<210> 15
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> vorhergesagte Sequenz des variablen Schere-Kette-Bereichs für die
 VH 3-30.3 Keimbahn

```

<400> 15
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
  1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
  20          25          30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
  35          40          45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
  50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
  65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
  85          90          95
Ala Arg

```

<210> 16
 <211> 355
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> variabler Schwere-Kette-Bereich VH 10D1 aus VH 3-30.3

```

<400> 16
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatacta tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtgacattt atatcatatg atggaacaa taaatactac 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctatat attactgtgc gaggaccggc 300
tggctggggc cctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctgag      355

```

<210> 17
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>

<223> vorhergesagte Sequenz des variablen Schere-Kette-Bereichs für
10D1 aus VH 3-30.3

<400> 17

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18

<211> 355

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> variabler Schwere-Kette-Bereich VH 4B6 aus VH 3-30.3

<400> 18

cagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatacta tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtgacattt atatcatatg atggaagcaa taaacactac 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccgtc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctatat attactgtgc gaggaccggc 300
tggctggggc cctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcag 355

<210> 19

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> vorhergesagte Sequenz des variablen Schere-Kette-Bereichs für
4B6 aus VH 3-30.3

<400> 19

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

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

<210> 20
 <211> 296
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> VH 3-33 Keimbahnsequenz

<400> 20
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaga 296

<210> 21
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> vorhergesagte Sequenz des variablen Schere-Kette-Bereichs für die
 VH 3-33 Keimbahn

<400> 21
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

<211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Leichte-Kette-CDR1 (HuMab 10D1)

<400> 24
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 25
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Leichte-Kette-CDR1 (HuMab 4B6)

<400> 25
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala
 1 5 10

<210> 26
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Leichte-Kette-CDR1 (HuMab 1E2)

<400> 26
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 27
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Schwere-Kette-CDR1 (HuMab 10D1, 4B6)

<400> 27
 Ser Tyr Thr Met His
 1 5

<210> 28
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Schwere-Kette-CDR1 (HuMab 1E2)

<400> 28
 Ser Tyr Gly Met His

1

5

<210> 29
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Leichte-Kette-CDR2 (HuMab 10D1)

<400> 29
 Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 30
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Leichte-Kette-CDR2 (HuMab 4B6)

<400> 30
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 31
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Leichte-Kette-CDR2 (HuMab 1E2)

<400> 31
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 32
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Schwere-Kette-CDR2 (HuMab 10D1)

<400> 32
 Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 33
 <211> 17
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Schwere-Kette-CDR2 (HuMab 4B6)

<400> 33

Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Schwere-Kette-CDR2 (HuMab 1E2)

<400> 34

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

Gly

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Leichte-Kette-CDR3 (HuMab 10D1, 4B6)

<400> 35

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
 1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Leichte-Kette-CDR3 (HuMab 1E2)

<400> 36

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Schwere-Kette-CDR3 (HuMab 10D1)

<400> 37

Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Schwere-Kette-CDR3 (HuMab 4B6)

<400> 38

Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Schwere-Kette-CDR3 (HuMab 1E2)

<400> 39

Ala Pro Asn Tyr Ile Gly Ala Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 40

<211> 506

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: kappa-Leichte-Kette-Plasmid
 pCK7-96 (Teil)

<400> 40

```

aggagaatga ataaataaag tgaatctttg cacctgtggt ttctctcttt cctcaattta 60
ataattatta tctgttgttt accaactact caatttctct tataagggac taaatagtta 120
gtcatcctaa ggcgcataac catttataaa aatcatcctt cattctattt taccctatca 180
tcctctgcaa gacagtcctc cctcaaacc cacaagcctc tgcctcaca gtcccctggg 240
ccatggatcc tcacatccca atccgcggcc gcaattcgta atcatggtca tagctgtttc 300
ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcaaatc cacacaacat acgagccgga agcataaagt 360
gtaaagcctg ggggtgcctaa tgagtgagct aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc 420
ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg 480
ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgc 506
  
```

<210> 41

<211> 4723

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: gamma1-Schwere-Kette-Plasmid pCG-96

<400> 41

gaactcgagc agctgaagct ttctggggca ggccaggcct gaccttggct ttggggcagg 60
 gagggggcta aggtgaggca ggtggcgcca gccagggtgca cacccaatgc ccatgagccc 120
 agacactgga cgctgaacct cgcggacagt taagaaccca ggggcctctg cgccctgggc 180
 ccagctctgt cccacaccgc ggtcaatgg caccacctct cttgcagcct ccaccaaggg 240
 cccatcggtc ttccccctgg caccctctc caagagcacc tctgggggca cagcggcct 300
 gggtgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc 360
 cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactcct 420
 cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaactg 480
 gaatcacaag cccagcaaca ccaagggtga caagaaagt ggtgagaggc cagcacaggg 540
 agggcagggt tctgctgga gccaggctca ggcgtcctgc ctggacgcat cccggctatg 600
 cagccccagt ccagggcagc aaggcaggcc ccgtctgcct cttcaccggg aggctctgc 660
 ccgccccact catgctcagg gagagggtct tctggctttt tccccaggct ctgggcaggc 720
 acaggctagg tgcccctaac ccaggccctg cacacaaagg ggcagggtgct gggctcagac 780
 ctgccaagag ccatatccgg gaggaccctg cccctgacct aagcccacc caaaggccaa 840
 actctccact ccctcagctc ggacacctc tctcctccca gattccagta actcccaatc 900
 ttctctctgc agagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccaggta 960
 agccagccca ggctctgccc tccagctcaa ggcgggacag gtgccctaga gtagcctgca 1020
 tccagggaca ggccccagcc ggggtgctgac acgtccacct ccattctctc ctcagcacct 1080
 gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc tccccccaa aaccaagga caccctcatg 1140
 atctcccgga cccctgaggc cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 1200
 gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 1260
 gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 1320
 tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aagccctccc agcccccatc 1380
 gagaaaacca tctccaaagc caaagggtggg acccgtgggg tgcgaggggc acatggacag 1440
 aggccggctc ggccccacct ctgccctgag agtgaccgct gtaccaacct ctgtccctac 1500
 agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa 1560
 gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat cccagcgaca tcgcccgtgga 1620
 gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc 1680
 cgacggctcc ttcttctctc acagcaagct caccgtggac aagagcaggg ggcaagagg 1740
 gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggcctgtcac aaccactaca cgcagaagag 1800
 cctctccctg tctccgggta aatgagtgcg acggccggca agccccgct ccccgggctc 1860
 tcgcggtcgc acgaggatgc ttggcacgta cccccgtac atacttcccg ggcgcccagc 1920
 atggaaataa agcaccacgc gctgccctgg gccctgcga gactgtgatg gttctttcca 1980
 cgggtcaggc cgagtctgag gcctgagtgg catgagggag gcagagcggg tcccactgtc 2040
 cccacactgg cccaggctgt gcagggtgtc ctgggcccc taggggtggg ctcagccagg 2100
 ggctgcctc ggcagggtgg gggatttgc agcgtggccc tccctccagc agcacctgcc 2160
 ctgggctggg ccacgggaag ccctaggagc ccctggggac agacacacag cccctgcctc 2220
 tgtaggagac tgtcctgttc tgtgagcgc cctgtcctcc cgacctccat gccactcgg 2280
 gggcatgcct gcaggtcgac tctagaggat ccccgggtag cgagctcga ttcatcgatg 2340
 atatcagatc tgccggctct cctatagtga gtcgtattaa ttctgataag ccaggttaac 2400
 ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgctcttcc 2460
 gcttctctgc tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 2520
 cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 2580
 tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcttgct ggctttttc 2640
 cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 2700
 aaccgcagcag gactataaag ataccagcgc tttccccctg gaagctccct cgtgcctct 2760
 cctgttccga cctgcccgt taccggatc ctgtccgct tctccctc ggaagcgtg 2820
 gcgctttctc aatgctcacg ctgtaggat ctcagttcgg tgtaggctct tcgctccaag 2880
 ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgctcag cccgaccgct gcgccttatc cggtaactat 2940
 cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 3000
 aggattagca gagcagaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 3060
 tacggetaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttacctc 3120
 ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggttt 3180
 tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 3240
 ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaaggat tttggctcatg 3300
 agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaatt aaaaatgaag ttttaaatca 3360
 atctaaagta tatatgagta aacttggctc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca 3420
 cctatctcag cgatctgtct atttctgtca tccatagttg cctgactccc cgctcgtgtag 3480

ataactacga	tacgggaggg	cttaccatct	ggccccagtg	ctgcaatgat	accgcgagac	3540
ccacgctcac	cggctccaga	tttatcagca	ataaaccagc	cagccggaag	ggccgagcgc	3600
agaagtggtc	ctgcaacttt	atccgcctcc	atccagtcta	ttaatgttg	ccgggaagct	3660
agagtaagta	gttcgccagt	taatagtttg	cgcaacgttg	ttgccattgc	tacaggcatc	3720
gtgggtgtcac	gctcgtcgtt	tggtatggct	tcattcagct	ccggttccca	acgatcaagg	3780
cgagttacat	gatcccccat	gttgtgcaaa	aaageggtta	gctccttcgg	tectccgatc	3840
gttgtcagaa	gtaagtggc	cgcagtgtta	tcactcatgg	ttatggcagc	actgcataat	3900
tctcttactg	tcatgccatc	cgtaagatgc	ttttctgtga	ctggtgagta	ctcaaccaag	3960
tcattctgag	aatagtgtat	gcggcgaccg	agttgctctt	gcccggcgtc	aatacgggat	4020
aataccgcgc	cacatagcag	aactttaaaa	gtgctcatca	ttggaaaacg	ttcttcgggg	4080
cgaaaactct	caaggatctt	accgctgttg	agatccagtt	cgatgtaacc	cactcgtgca	4140
cccaactgat	cttcagcatc	ttttactttc	accagcgttt	ctgggtgagc	aaaaacagga	4200
aggcaaaaatg	ccgcaaaaaa	gggaataagg	gcgacacgga	aatgttgaat	actcatactc	4260
ttcctttttc	aatattattg	aagcatttat	cagggttatt	gtctcatgag	cggatacata	4320
tttgaatgta	tttagaaaaa	taaacaaata	ggggttccgc	gcacatttcc	ccgaaaagtg	4380
ccacctgacg	tctaagaaac	cattattatc	atgacattaa	cctataaaaa	taggcgtatc	4440
acgaggccct	ttcgtctcgc	gcgtttcggg	gatgacggtg	aaaacctctg	acacatgcag	4500
ctcccggaga	cggtcacagc	ttgtctgtaa	gcggatgccg	ggagcagaca	agcccgtcag	4560
ggcgcgtcag	cggtgtttgg	cggtgtcggg	ggctggctta	actatgcggc	atcagagcag	4620
attgtactga	gagtgcacca	tatggacata	ttgtcgttag	aacgcggcta	caattaatac	4680
ataaccttat	gtatcataca	catacgattt	aggtgacact	ata		4723

<210> 42

<211> 4694

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: gamma4-Schwere-Kette-Plasmid pG4HE

<400> 42

gaactcgagc	agctgaagct	ttctggggca	ggccgggccc	gactttggct	gggggcaggg	60
agggggctaa	ggtgacgcag	gtggcgccag	ccaggtgcac	acccaatgcc	catgagccca	120
gacactggac	cctgcatgga	ccatcgcgga	tagacaagaa	ccgaggggcc	tctgcgccct	180
gggcccagct	ctgtcccaca	ccgcggtcac	atggcaccac	ctctcttgca	gcttccacca	240
agggcccatc	cgtcttcccc	ctggcgccct	gctccaggag	cacctccgag	agcacagccg	300
ccctgggctg	cctggcaag	gactacttcc	ccgaaccggg	gacgggtgctg	tggaaactcag	360
gcgccctgac	cagcggcgctg	cacaccttcc	cggtctgcct	acagtcctca	ggactctact	420
ccctcagcag	cgtggtgacc	gtgccctcca	gcagcttggg	cacgaagacc	tacacctgca	480
acgtagatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagag	agttggtgag	aggccagcac	540
agggaggag	ggtgtctgct	ggaagccagg	ctcagccctc	ctgcctggac	gcaccccggc	600
tgtgcagccc	cagcccaggg	cagcaaggca	tgccccatct	gtctctctac	ccggaggcct	660
ctgaccaccc	cactcatgct	cagggagagg	gtcttctgga	tttttccacc	aggctccygg	720
cagccacag	ctggatgcc	ctaccccagg	ccctgcgcac	acaggggcag	gtgctgcgct	780
cagacctgcc	aagagccata	tccgggagga	ccctgcccct	gacctaaacc	caccccaaag	840
gccaactct	ccactccttc	agctcagaca	ccttctctcc	tcccagatct	gagtaactcc	900
caatcttctc	tctgcagagt	ccaaatatgg	tccccatgc	ccatcatgcc	caggtaaacc	960
aaccagggcc	tcgccctcca	gctcaaggcg	ggcaggtg	cctagagtag	cctgcatcca	1020
gggacaggcc	ccagccgggt	gctgacgcat	ccacctccat	ctcttctca	gcacctgagt	1080
tctggggggg	accatcagtc	ttcctgttcc	ccccaaaacc	caaggacact	ctcatgatct	1140
cccgggcccc	tgaggtcacg	tgctgtgtgg	tggacgtgag	ccaggaagac	cccagggtcc	1200
agttcaactg	gtacgtgat	ggcgtggagg	tgcataatgc	caagacaaag	ccgcgggagg	1260
agcagttcaa	cagcacgtac	cgtgtggtca	gcgtcctcac	cgtcctgcac	caggactggc	1320
tgaacggcaa	ggagtacaag	tgcaaggtct	ccaacaaagg	cctcccgtcc	tccatcgaga	1380
aaacctctc	caaagccaaa	ggtgggaccc	acggggtg	agggccacat	ggacagaggt	1440
cagctcggcc	caccctctgc	cctgggagtg	accgctgtgc	caacctctgt	ccctacaggg	1500
cagccccgag	agccacaggt	gtacaccctg	ccccatccc	aggaggagat	gaccaagaac	1560
caggtcagcc	tgacctgcct	ggtcaaaggc	ttctacccca	gcgacategc	cgtggagtg	1620
gagagcaatg	ggcagccgga	gaacaactac	aagaccacgc	ctcccgtgct	ggactccgac	1680

```

ggctccttct tctctacag caggctaacc gtggacaaga gcaggtggca ggaggggaat 1740
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc 1800
tccctgtctc tgggtaaag agtgccaggg ccggcaagcc cccgctcccc gggctctcgg 1860
ggtcgcgcga ggatgcttgg cacgtacccc gtctacatac tccccaggca cccagcatgg 1920
aaataaagca cccaccactg ccctgggccc ctgtgagact gtgatggttc tttccacggg 1980
tcaggccgag tctgaggcct gagtgacatg agggaggcag agcgggtccc actgtcccca 2040
cactggccca ggctgtgcag gtgtgcctgg gccacctagg gtggggctca gccaggggct 2100
gccctcggca ggggtggggga tttgccagcg tggccctccc tccagcagca gctgccctgg 2160
gctgggcccac gggaagccct aggagcccct ggggacagac acacagcccc tgctctgtg 2220
ggagactgtc ctgtcctgtg agcgcctgtt cctccgacct cccatgcccc ctcgggggga 2280
tccccgggta ccgagctcga attcatcgat gatatcagat ctgccgggtc ccctatagt 2340
agtctgatta atttcgataa gccagggtta cctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg 2400
gagaggcggg ttgcgtattg ggcgctcttc cgttctctcg ctactgact cgctgcgctc 2460
ggctgttcgg ctgcggcgag cggatcagc tcaactcaaag gcggtatac ggttatccac 2520
agaatcaagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa 2580
ccgtaaaaag gccgcgtgct tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca 2640
caaaaatcga cgctcaagt c agagggtggc aaaccgcaca ggactataaa gataccaggc 2700
gtttccccct ggaagctccc tctgtcgtc tctgttccg accctgccgc ttaccggata 2760
cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct caatgctcac gctgtaggta 2820
tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca 2880
gccccaccgc tgcgccttat ccgtaacta tctgtctgag tccaaccgg taagacacga 2940
cttatcgcca ctggcagcag ccaactgtaa caggattagc agagcgagg atgtaggcgg 3000
tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg 3060
tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct ctgatccgg 3120
caaacaacc accgctggta gcggtggtt tttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag 3180
aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat ctttctacg gggctctgac ctacagtgaa 3240
cgaaaactca cgtaagggg ttttggctat gagattatca aaaaggatct tcacctagat 3300
ccttttaaat taaaaatgaa gttttaaate aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc 3360
tgacagttac caatgcttaa tcagtgggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc 3420
atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc 3480
tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga ccaacgctca ccggctccag atttatcagc 3540
aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtgg tctgcaactt tatccgcctc 3600
catccagttc attaattgtt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt 3660
gcgcaacggt gttgccattg ctacaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc 3720
ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatccccca tgttggtgcaa 3780
aaaagcgggt agctccttcg gtccctccgat cgttgctcaga agtaagttgg ccgcagtggt 3840
atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcattgcat ccgtaagatg 3900
cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtg tgcggcgacc 3960
gagttgctct tgcccggcgt caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaa 4020
agtgtctatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaaactc tcaaggatct taccgctgtt 4080
gagatccagt tcatgtaaac ccaactcgtg acccaactga tcttcagcat cttttacttt 4140
caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa agggataaag 4200
ggcgacacgg aatgttgaa tactcatact cttccttttt caatattatt gaagcattta 4260
tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat 4320
aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat 4380
catgacatta acctataaaa ataggcgtat cacgaggccc tttcgtctcg cgcgtttcgg 4440
tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca gctcccggag acggtcacag ctgtctgta 4500
agcggatgcc gggagcagac aagcccgtca gggcgctca gcgggtgtg gcgggtgtcg 4560
gggtggctt aactatgcgg catcagagca gattgtactg agagtgcacc atatggacat 4620
attgtcgtta gaacgcggct acaattaata cataacctta tgtatcatac acatacgatt 4680
taggtgacac tata 4694

```

Patentansprüche

1. Therapeutisch wirksamer humaner Antikörper oder Antigen-bindender Teil davon, welcher an CTLA4 auf der Oberfläche humaner T-Zellen mit einer Bindungsaffinität von etwa 10^8 M^{-1} oder größer bindet, wobei der Antikörper umfasst:

- (a) einen variablen Schwere-Kette-Bereich eines humanen VH 3-30.3 Gens, und
- (b) einen variablen Leichte-Kette-Bereich eines humanen VK A-27 Gens.

2. Antikörper nach Anspruch 1, wobei der Antikörper befähigt ist, humanes CTLA4 mit einer Bindungsaffinität von etwa 10^9 M^{-1} oder größer zu binden.

3. Antikörper nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei der Antikörper das Binden von humanem CTLA4 an B7-1 oder B7-2 hemmt.
4. Antikörper nach Anspruch 3, wobei der Antikörper das Binden von humanem CTLA4 an B7-1 um mindestens 50%, mindestens 60%, mindestens 70%, mindestens 80% oder mindestens 90% reduziert.
5. Antikörper nach Anspruch 3, wobei der Antikörper das Binden von humanem CTLA4 an B7-2 um mindestens 50%, mindestens 60%, mindestens 70%, mindestens 80% oder mindestens 90% reduziert.
6. Antikörper nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Antikörper nicht an CTLA4 von der Maus bindet.
7. Antikörper nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Antikörper befähigt ist, an CTLA4 vom Cynomolgus-Affen zu binden.
8. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei der Antikörper einen variablen Schwere-Kette-Bereich umfasst, welcher in den SEQ ID NR: 27, 32 und 37 gegebene Sequenzen des komplementätsbestimmenden Bereichs aufweist.
9. Antikörper nach Anspruch 8, wobei der Antikörper einen variablen Schwere-Kette-Bereich umfasst, welcher die in SEQ ID NR: 17 gegebene Aminosäuresequenz aufweist.
10. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei der Antikörper einen variablen Leichte-Kette-Bereich umfasst, welcher in den SEQ ID NR: 24, 29 und 35 gegebene Sequenzen des komplementätsbestimmenden Bereichs aufweist.
11. Antikörper nach Anspruch 10, wobei der Antikörper einen variablen Leichte-Kette-Bereich umfasst, welcher die in SEQ ID NR: 7 gegebene Aminosäuresequenz aufweist.
12. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei der Antikörper einen variablen Schwere-Kette-Bereich umfasst, welcher in den SEQ ID NR: 27, 33 und 38 gegebene Sequenzen des komplementätsbestimmenden Bereichs aufweist.
13. Antikörper nach Anspruch 12, wobei der Antikörper einen variablen Schwere-Kette-Bereich umfasst, welcher die in SEQ ID NR: 19 gegebene Aminosäuresequenz aufweist.
14. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei der Antikörper einen variablen Leichte-Kette-Bereich umfasst, welcher in den SEQ ID NR: 25, 30 und 35 gegebene Sequenzen des komplementätsbestimmenden Bereichs aufweist.
15. Antikörper nach Anspruch 14, wobei der Antikörper einen variablen Leichte-Kette-Bereich umfasst, welcher die in SEQ ID NR: 9 gegebene Aminosäuresequenz aufweist.
16. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 7, umfassend:
 - (a) eine variable Schwere-Kette-Aminosäuresequenz mit der in SEQ ID NR: 19 gegebenen Aminosäuresequenz, und
 - (b) eine variable Leichte-Kette-Aminosäuresequenz mit der in SEQ ID NR: 9 gegebenen Aminosäuresequenz.
17. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 7, umfassend:
 - (a) eine variable Schwere-Kette-Aminosäuresequenz mit der in SEQ ID NR: 17 gegebenen Aminosäuresequenz, und
 - (b) eine variable Leichte-Kette-Aminosäuresequenz mit der in SEQ ID NR: 7 gegebenen Aminosäuresequenz.
18. Antikörper nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die schwere Kette des Antikörpers IgG ist.
19. Antikörper nach Anspruch 18, wobei die schwere Kette des Antikörpers IgG₁, IgG₂, IgG₃ oder IgG₄ ist.
20. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 17, wobei die schwere Kette des Antikörpers IgM ist.

21. Antikörper nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Antikörper nicht eine unspezifische T-Zell-Aktivierung hervorruft.
22. Antikörper nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Antikörper die Tumorgroße verringert oder das Tumorwachstum verlangsamt.
23. Antikörper nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Antikörper oder der Antigen-bindende Teil davon nicht mit humanem nicht-lymphoiden Gewebe kreuz-reagiert.
24. Isolierte Nukleinsäure, welche die variable Domäne der leichten Kette oder der schweren Kette eines Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 23 kodiert.
25. Isolierte Nukleinsäure nach Anspruch 24, wobei die Nukleinsäure die in SEQ ID NR: 6 oder 8 gegebene Nukleotidsequenz umfasst.
26. Isolierte Nukleinsäure nach Anspruch 24, wobei die Nukleinsäure die in SEQ ID NR: 16 oder 18 gegebene Nukleotidsequenz umfasst.
27. Vektor, umfassend die Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 24 bis 26.
28. Vektor nach Anspruch 27, wobei der Vektor ein Plasmid ist.
29. Vektor nach Anspruch 27, wobei der Vektor ein viraler Vektor ist.
30. Isolierte rekombinante Wirtszelle, welche mit einem Vektor nach Anspruch 27, Anspruch 28 oder Anspruch 29 transformiert ist.
31. Isolierte Zelle oder Zelllinie, welche befähigt ist, einen Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 23 herzustellen.
32. Isolierte Zelle oder Zelllinie nach Anspruch 31, wobei die Zelle oder Zelllinie mit einem Vektor nach Anspruch 27, 28 oder 29 transformiert ist.
33. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend:
 - (a) einen Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 23 in einer Menge, welche wirksam ist, die Immunantwort auf das Antigen zu induzieren, zu steigern oder zu verlängern, und
 - (b) einen pharmazeutisch verträglichen Träger.
34. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 33, wobei das Antigen
 - (a) ein Tumor-Antigen, oder
 - (b) ein Antigen von einem Krankheitserreger ist.
35. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 33, wobei das Antigen ein Antigen von einem Krankheitserreger, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem Virus, einem Bakterium, einem Pilz oder einem Parasiten, ist.
36. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 33 bis 35, weiter umfassend ein chemotherapeutisches Mittel oder Antigen.
37. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 33 bis 35, wobei das Antigen und/oder weitere Antigen von einem Virus stammt, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus: HIV, Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, Herpesvirus, Adenovirus, Influenzavirus, Flaviviren, Echovirus, Rhinovirus, Coxsackievirus, Coronavirus, Respiratory-Syncytial-Virus, Mumpsvirus, Rotavirus, Masernvirus, Rubellvirus, Parvovirus, Vakzine-Virus, HTLV-Virus, Dengue-Virus, Papillomavirus, Molluskum-Virus, Poliovirus, Tollwut-Virus, JC-Virus und Arbovirus-Enzephalitis-Virus.
38. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 33 bis 35, wobei das Antigen und/oder weitere Antigen von einem Bakterium stammt, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus: Chlamydia, Rickettsia-Bakterien, Mykobakterien, Staphylokokken, Streptokokken, Pneumonokokken, Meningokokken und Conokokken, Klebsiella, Proteus, Serratia, Pseudomonas, Legionella, Diphtheria, Salmonella, Bazillen,

Cholera-, Tetanus-, Botulismus-, Anthrax-, Pest-, Leptospirose- und Lyme-Krankheit-Bakterien.

39. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 33 bis 35, wobei das Antigen und/oder weitere Antigen von einem Pilz stammt, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus: *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus*, Genus *Mucorales*, *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* und *Histoplasma capsulatum*.

40. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 33 bis 35, wobei das Antigen und/oder weitere Antigen von einem Parasiten stammt, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus: *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba*, *Giardia lamblia*, *Cyptosporidium*, *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* und *Nippostrongylus brasiliensis*.

41. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 33 bis 35, wobei das Antigen und/oder weitere Antigen ein Tumor-Antigen ist.

42. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 41, wobei das Tumor-Antigen von einem Tumor stammt, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus: einem Prostatakrebs-Tumor, einem Melanom-Tumor und einem Epithel-Tumor.

43. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 41, wobei das Antigen gp100, MAGE, Trp-2, Telomerase oder Hitzeschockprotein (HSP) ist.

44. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 41, wobei das Antigen ein A β -Peptid von Amyloid in einem Patienten ist, welcher an der Alzheimer-Krankheit leidet.

45. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 41, welche weiter eine Ganzzellen-Zubereitung umfasst.

46. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 41, wobei die Zellen der Ganzzellen-Zubereitung eine Zubereitung von ganzen Tumorzellen sind.

47. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 45 oder 46, wobei die Zellen der Ganzzellen-Zubereitung GM-CSF, GCSF, IL-2, IL-1 oder IL-6 exprimieren.

48. Verwendung des Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 23 in der Herstellung eines Medikaments zum Induzieren, Steigern oder Verlängern der Immunantwort auf ein Antigen in einem Individuum.

49. Verwendung nach Anspruch 48, wobei das Antigen
(a) ein Tumor-Antigen, oder
(b) ein Antigen eines Krankheitserregers ist.

50. Verwendung nach Anspruch 49, wobei das Antigen ein Antigen von einem Krankheitserreger ist, wobei der Krankheitserreger ein Virus, ein Bakterium, ein Pilz oder ein Parasit ist.

51. Verwendung nach Anspruch 50, wobei der Krankheitserreger HIV ist.

52. Verwendung nach einem der Ansprüche 48 bis 51, wobei das Medikament-Antigen in dem Medikament mit dem Antikörper verwendet wird.

53. Verwendung nach einem der Ansprüche 48 bis 51, wobei ein chemotherapeutisches Mittel in dem Medikament mit dem Antikörper verwendet wird.

54. Verwendung nach Anspruch 49, wobei das Tumor-Antigen ein Prostata-Tumor-Antigen, ein Melanom-Antigen oder ein Antigen eines epithelialen Krebses ist.

55. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, welches das Mischen eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 23 mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger unter sterilen Bedingungen umfasst.

56. Verfahren nach Anspruch 55, wobei der Träger ein Lösungsmittel oder Dispersionsmedium ist.
57. Verfahren nach Anspruch 56, wobei die Zusammensetzung eine Lösung ist.
58. Verfahren nach Anspruch 55, weiter umfassend das Einbringen eines grenzflächenaktiven Mittels in die Zusammensetzung.
59. Verfahren nach Anspruch 55, weiter umfassend das Sterilisieren der Zusammensetzung.
60. Verfahren nach Anspruch 59, wobei die Zusammensetzung durch Mikrofiltration sterilisiert wird.
61. Verfahren nach Anspruch 55, weiter umfassend das Einbringen antibakterieller und/oder antifungaler Mittel in die Zusammensetzung.
62. Verfahren nach Anspruch 61, wobei die antibakteriellen und/oder antifungalen Mittel aus der Gruppe, bestehend aus Paraben, Chlorbutanol und Phenolsorbinsäure, ausgewählt sind.
63. Verfahren nach Anspruch 55, wobei der Träger aus der Gruppe, bestehend aus Wasser, Ethanol, Polyol und geeigneten Gemischen davon, ausgewählt ist.
64. Verfahren nach Anspruch 63, wobei das Polyol aus der Gruppe, bestehend aus Glycerin, Propylenglykol, flüssigem Polyethylenglykol und geeigneten Gemischen davon, ausgewählt ist.
65. Verfahren nach Anspruch 57, wobei die Lösung im Wesentlichen isotonisch ist.
66. Verfahren nach Anspruch 56, weiter umfassend das Einbringen eines isotonischen Mittels.
67. Verfahren nach Anspruch 66, wobei das isotonische Mittel aus der Gruppe, bestehend aus einem Zucker, einem Polyalkohol und Natriumchlorid, ausgewählt ist.
68. Verfahren nach Anspruch 67, wobei der Polyalkohol Mannitol oder Sorbitol ist.
69. Verfahren nach Anspruch 55, weiter umfassend das Formulieren der Zusammensetzung in eine pharmazeutisch verträgliche Dosierungsform.
70. Verfahren nach Anspruch 69, wobei die Dosierungsform eine Maßeinheit-Dosierungsform ist.
71. Verfahren nach Anspruch 55, wobei der anti-CTLA4-Antikörper in einer Dosierung von etwa 0,0001 bis 100 mg/kg vorliegt.
72. Verfahren nach Anspruch 71, wobei die Dosierung 0,01 mg/kg bis 5 mg/kg beträgt.
73. Verfahren nach Anspruch 71, wobei die Dosierung 1 mg/kg bis 10 mg/kg beträgt.
74. Verfahren nach Anspruch 55, wobei die Zusammensetzung eine injizierbare Lösung ist.
75. Verfahren nach Anspruch 55, wobei die Zusammensetzung eine Lösung zur intravenösen Verabreichung ist.
76. Verfahren nach Anspruch 56, weiter umfassend das Trocknen der Zusammensetzung zum Herstellen eines Pulvers.
77. Verfahren nach Anspruch 76, umfassend das Vakuum-Trocknen oder Gefriertrocknen der Lösung.
78. Verfahren nach Anspruch 76, weiter umfassend das Einbringen eines Mittels, welches die Absorption verzögert.
79. Verfahren nach Anspruch 78, wobei das Mittel ein Monostearatsalz oder Gelatine ist.
80. Verfahren nach Anspruch 79, wobei das Monostearatsalz Aluminiummonostearat ist.

81. Verfahren nach Anspruch 55, umfassend das Herstellen des anti-CTLA4-Antikörpers durch Züchten einer Wirtszelle nach einem der Ansprüche 30, 31 oder 32.

82. Verfahren nach Anspruch 81, wobei die Wirtszellen Säuger-Wirtszellen sind.

Es folgen 22 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

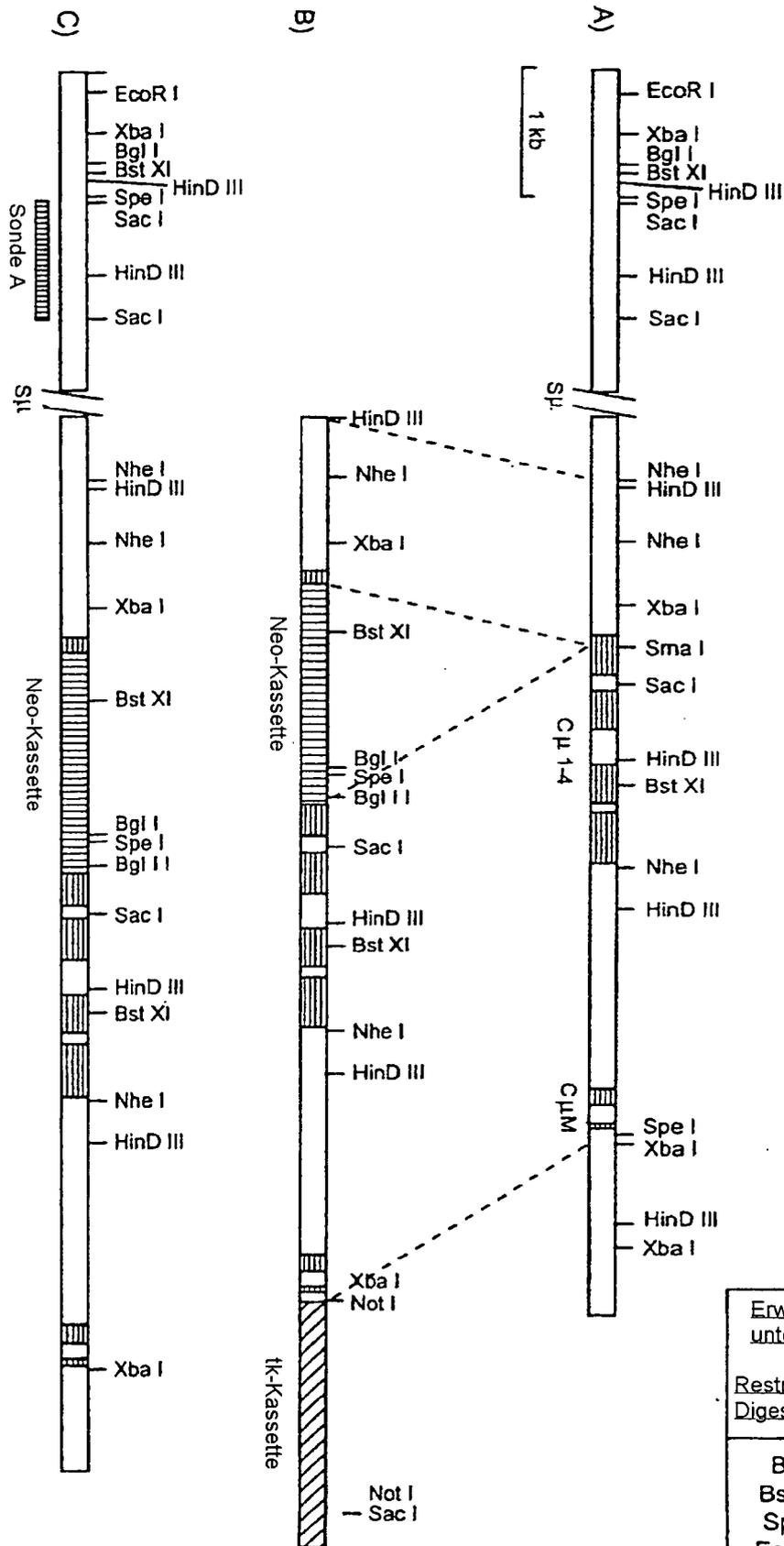


FIG. 1

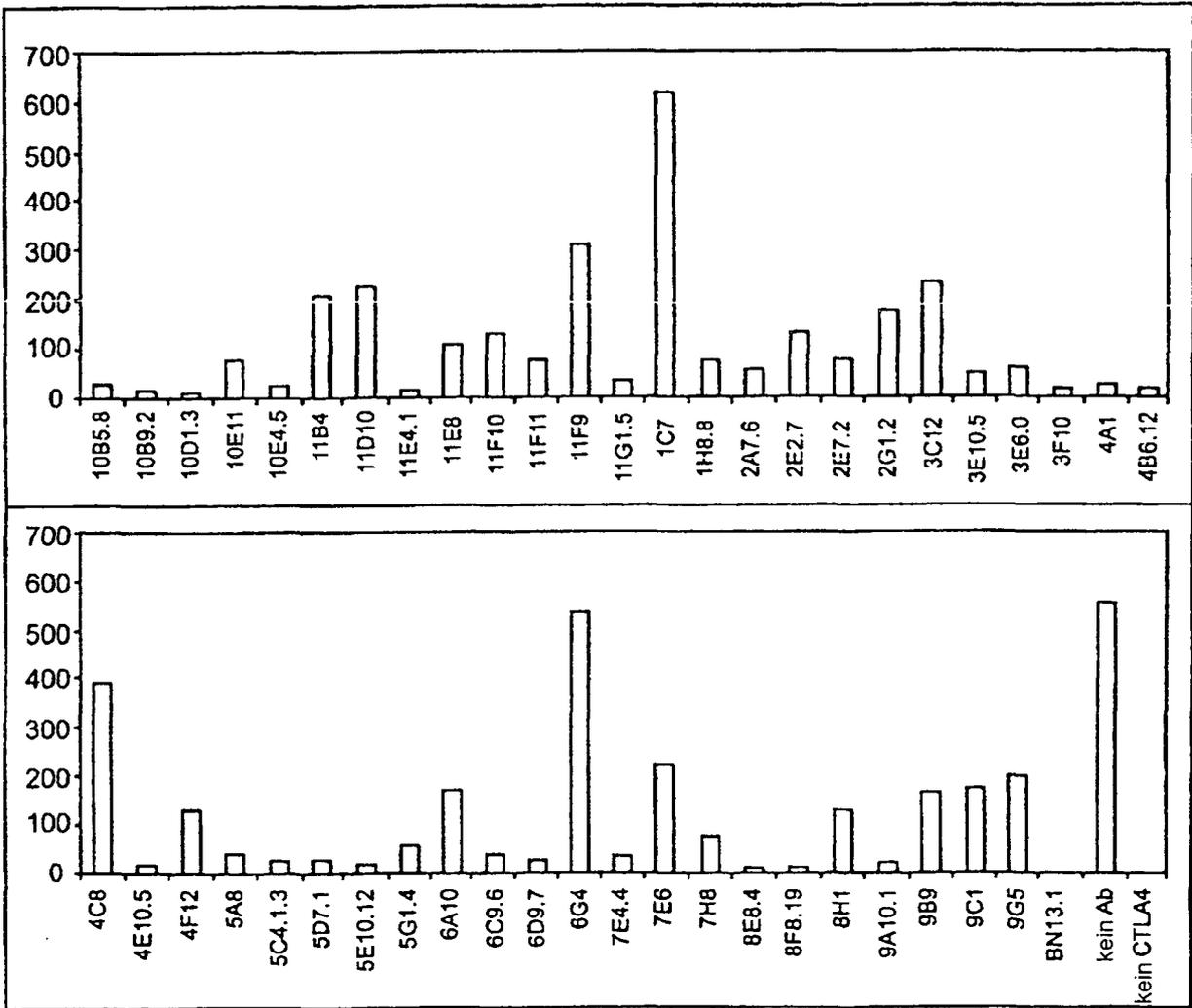


FIG. 2

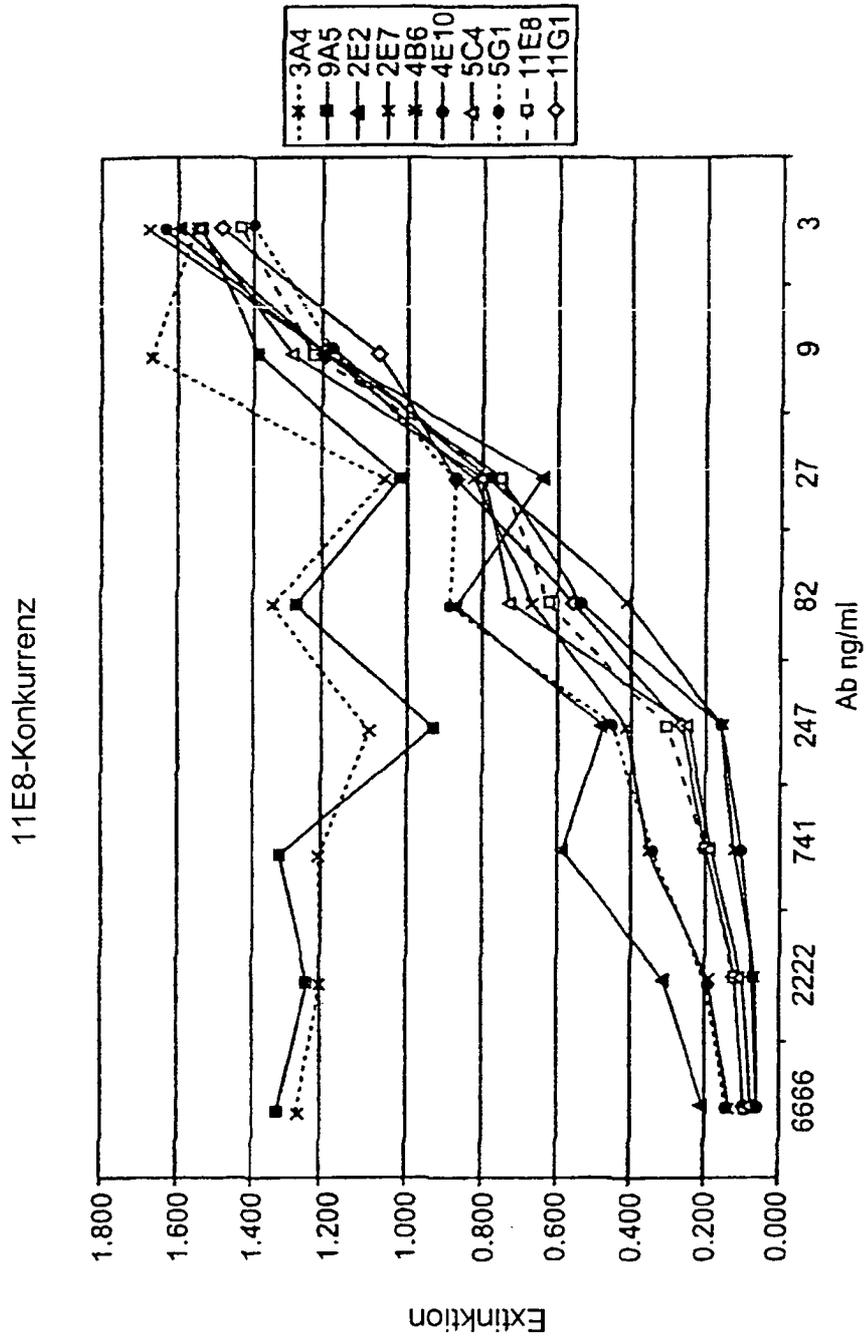


FIG. 3

10D1.3 VH (SEQ ID Nr.:2)

TGGGGGAGGC	GTGGTCCAGC	CTGGGAGGTC	CCTGAGACTC	TCCTGTGCAG	50
CCTCTGGATT	CACCTTCAGT	AGCTATACTA	TGCACTGGGT	CCGCCAGGCT	100
CCAGGCAAGG	GGCTGGAGTG	GGTGACATTT	ATATCATATG	ATGGAAACAA	150
TAAATACTAC	GCAGACTCCG	TGAAGGGCCG	ATTCACCATC	TCCAGAGACA	200
ATTCCAAGAA	CACGCTGTAT	CTGCAAATGA	ACAGCCTGAG	AGCTGAGGAC	250
ACGGCTATAT	ATTACTGTGC	GAGGACCGGC	TGGCTGGGGC	CCTTTGACTA	300
CTGGGGCCAG	GGAACCCTGG	TCACCGTCTC	CTCAGCCTCC	ACCAAGGGC	349

10D1.3 VK (SEQ ID Nr.:3)

CTCCAGGCAC	CCTGTCTTTG	TCTCCAGGGG	AAAGAGCCAC	CCTCTCCTGC	50
AGGGCCAGTC	AGAGTGTTGG	CAGCAGCTAC	TTAGCCTGGT	ACCAGCAGAA	100
ACCTGGCCAG	GCTCCCAGGC	TCCTCATCTA	TGGTGCATTC	AGCAGGGCCA	150
CTGGCATCCC	AGACAGGTTT	AGTGGCAGTG	GGTCTGGGAC	AGACTTCACT	200
CTCACCATCA	GCAGACTGGA	GCCTGAAGAT	TTTGCAGTGT	ATTACTGTCA	250
GCAGTATGGT	AGCTCACCGT	GGACGTTCCG	CCAAGGGACC	AAGGTGGAAA	300
TCAAACGAAC	TGTGGCTGCA	C			321

FIG. 4

SEQ ID Nr.: 14 , 16 bzw. 18

VH 3-30.3

Keimbahn: CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC
 10D1: ---
 4B6: ---

VH 3-30.3:

TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GCT ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG
 10D1: ---
 4B6: ---

VH 3-30.3:

GCA GTT ATA TCA TAT GAT GGA AGC AAT AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA
 10D1: A-- T--
 4B6: A-- T--

VH 3-30.3:

GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT
 10D1: ---
 4B6: ---

VH 3-30.3:

GCG AGA
 10D1: ---
 4B6: ---

SEQ ID Nr.: 20 bzw. 22

VH 3-33

Keimbahn: CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCG
 1E2: ---

VH 3-33:

TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG
 1E2: ---

VH 3-33:

GCA GTT ATA TGG TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA
 1E2: ---

FIG. 6

1 von 2

```
VH 3-33:      GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT  
1E2:          - - - - -  
              CDR3  
              JH3b  
VH 3-33:      GCG AGA GA  
1E2:          - - - - -CT CCC AAT TAT ATT GGT GCT TTT GAT GTC TGG GGC CAA GGG ACA ATG.GTC ACC GTC TCT TCA G/
```

FIG. 6
2 von 2

SEQ ID Nr.: 15, 17 bzw. 19

VH 3-30.3
 Keimbahn:
 10D1:
 4B6:

```

          CDR1          CDR2
QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFS SYAMH WVRQAPGKGLEWVA VISYDGSNKYYADSVKGG
-----T-----T-----N-----
-----T-----T-----F-----H-----
    
```

VH 3-30.3:
 10D1:
 4B6:

```

          CDR3
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
-----I----- TGWLGPFDY WQQGTLVTVSS
---V-----I-----
    
```

SEQ ID Nr.: 21 bzw. 23

VH 3-33
 Keimbahn:
 1E2:

```

          CDR1          CDR2
QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFS SYGMH WVRQAPGKGLEWVA VIWYDGSNKYYADSVKGG
-----T-----T-----N-----
-----T-----T-----F-----H-----
    
```

VH 3-33:
 1E2:

```

          CDR3
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
-----F----- APNYIGAPDV WQQGTMVTVSS
    
```

FIG. 8

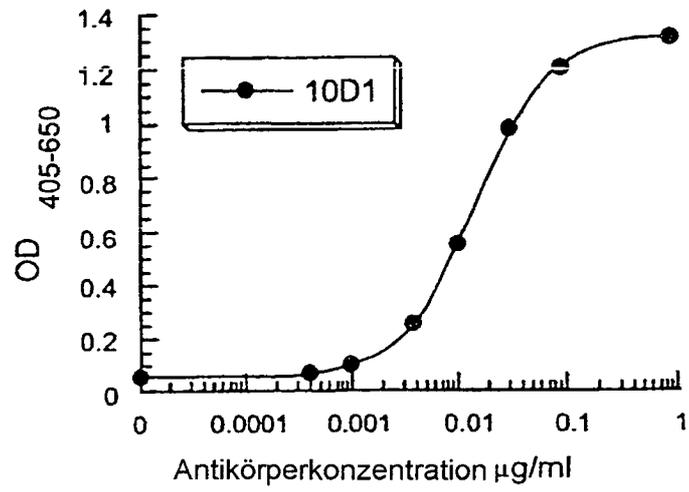


FIG. 9

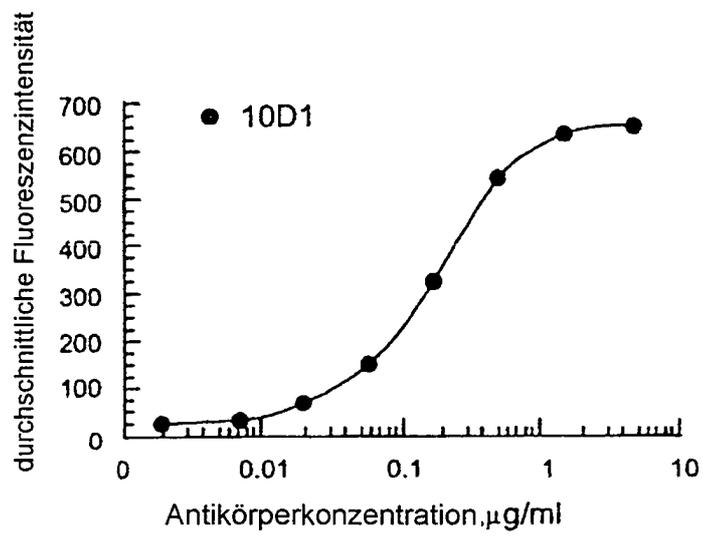


FIG. 10

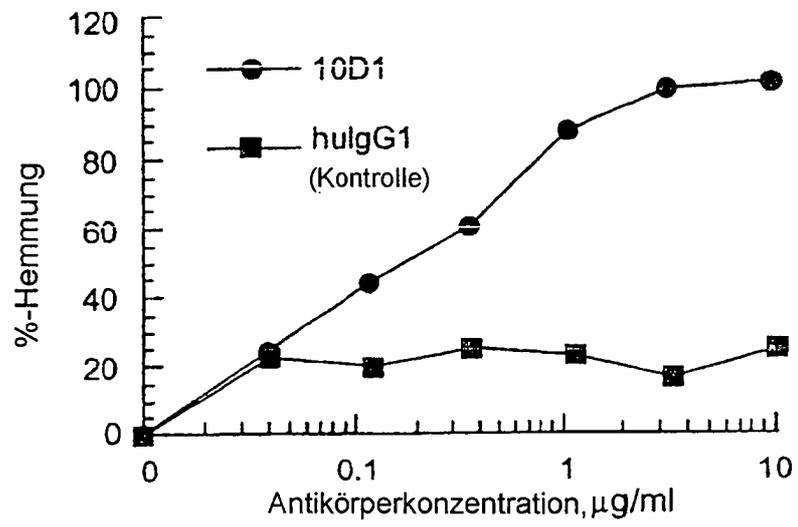


FIG. 11

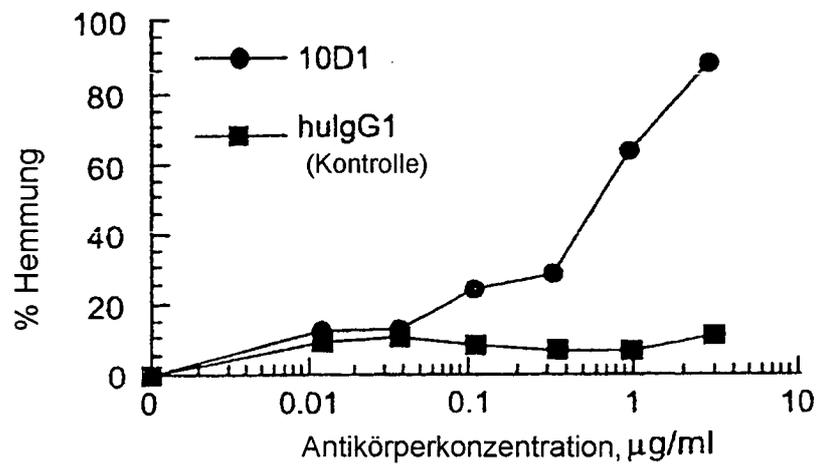


FIG. 12

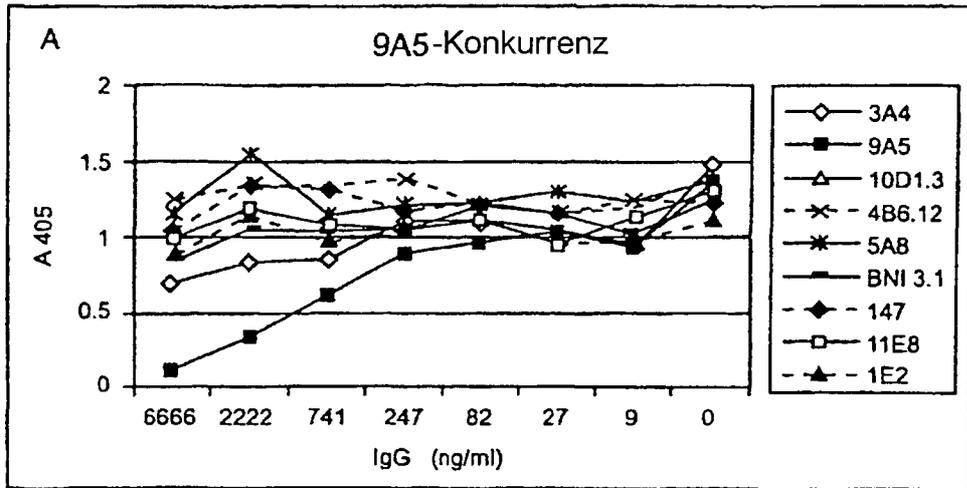


FIG. 13A

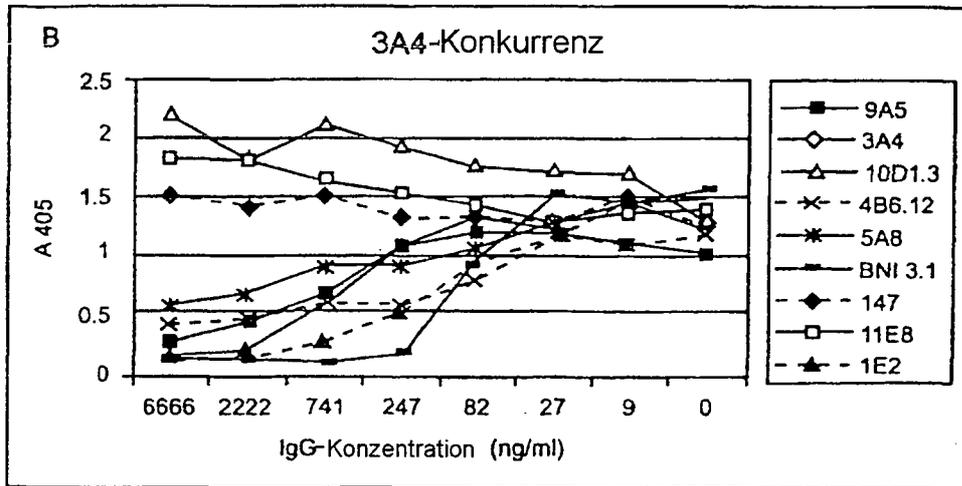


FIG. 13B

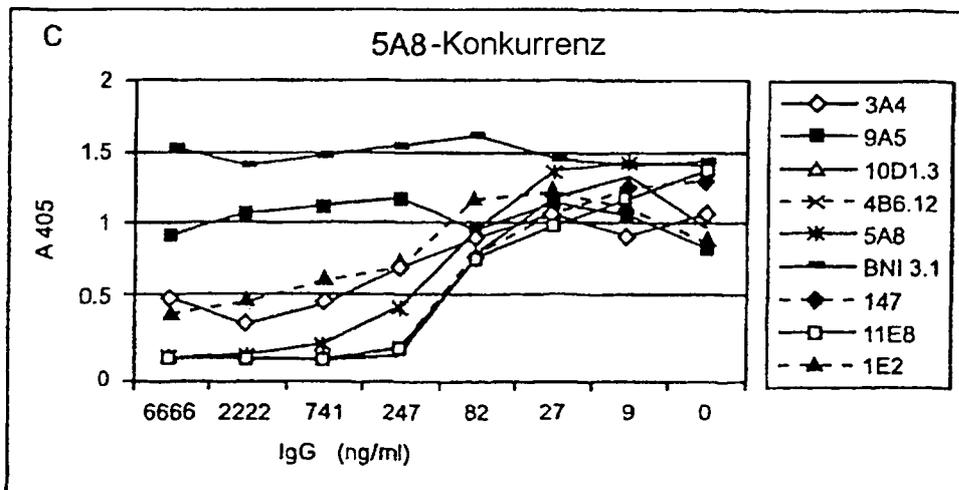


FIG. 13C

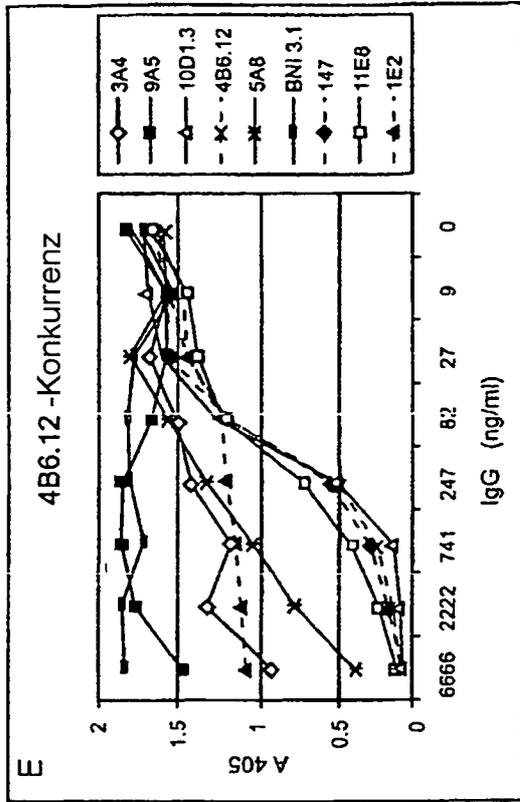


FIG. 13E

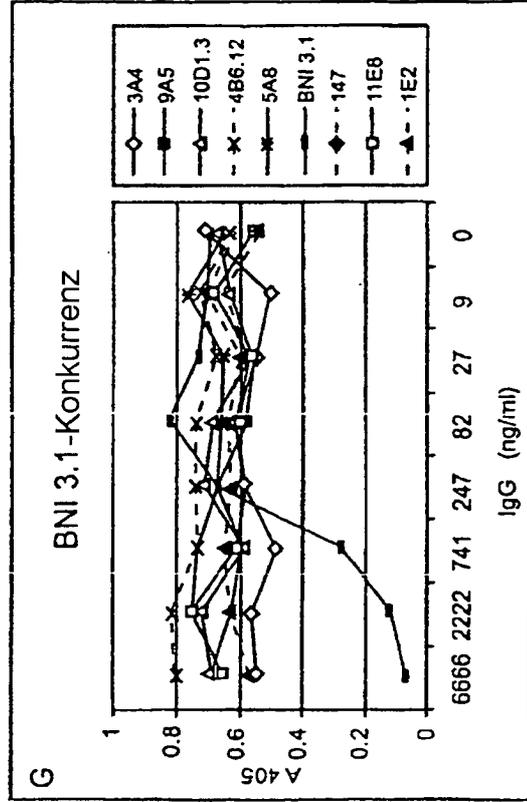


FIG. 13G

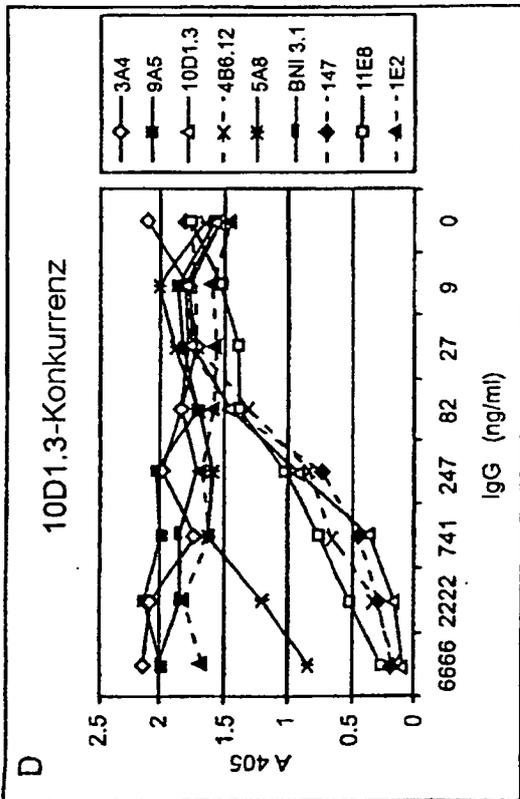


FIG. 13D

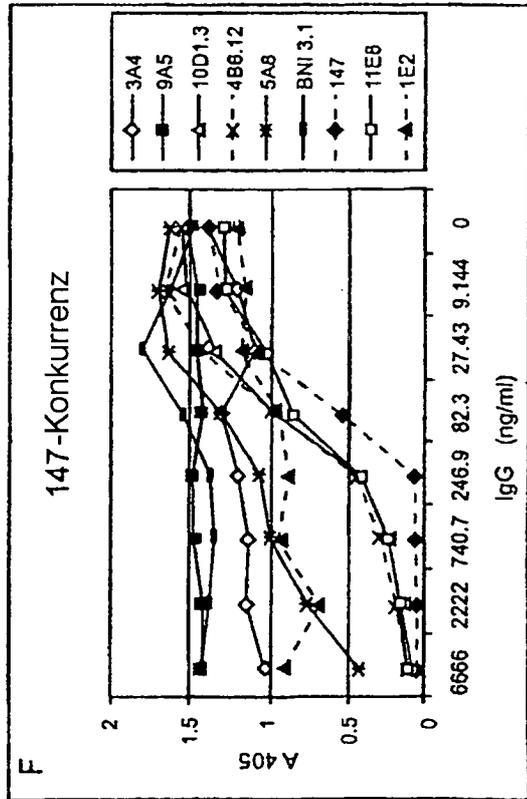


FIG. 13F

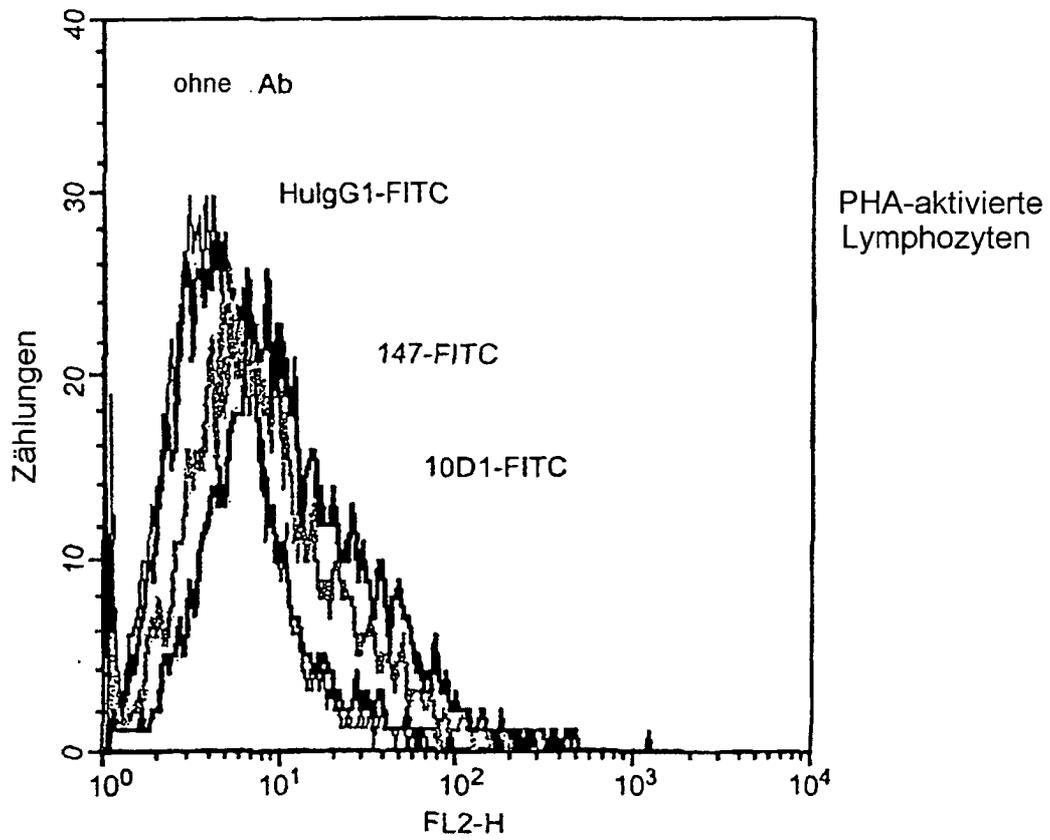
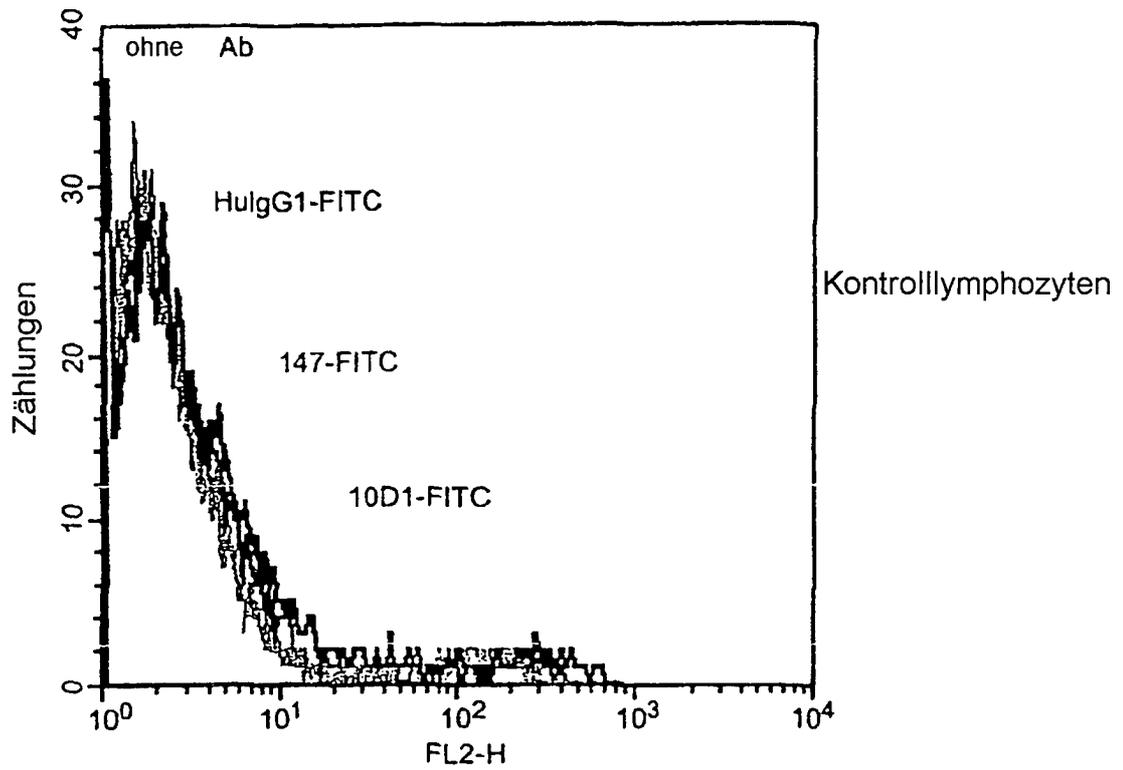


FIG. 14

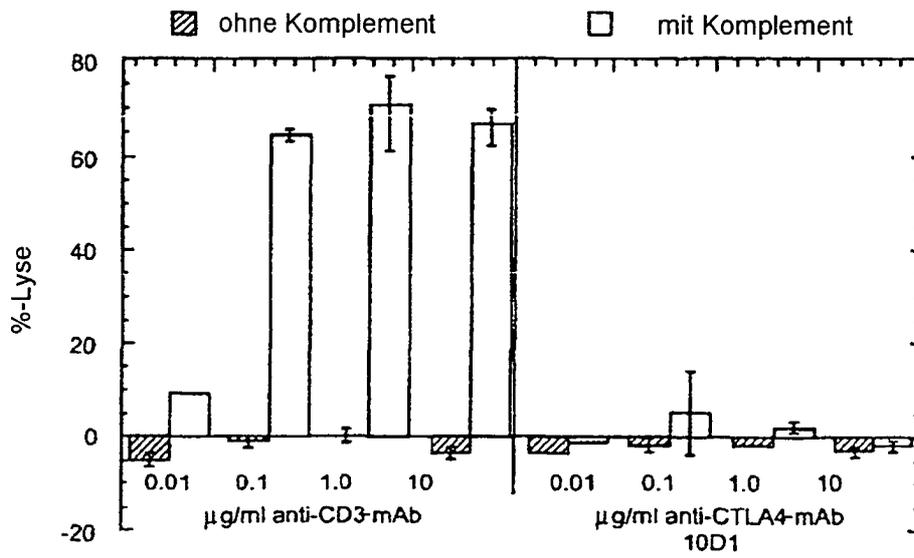


FIG. 15

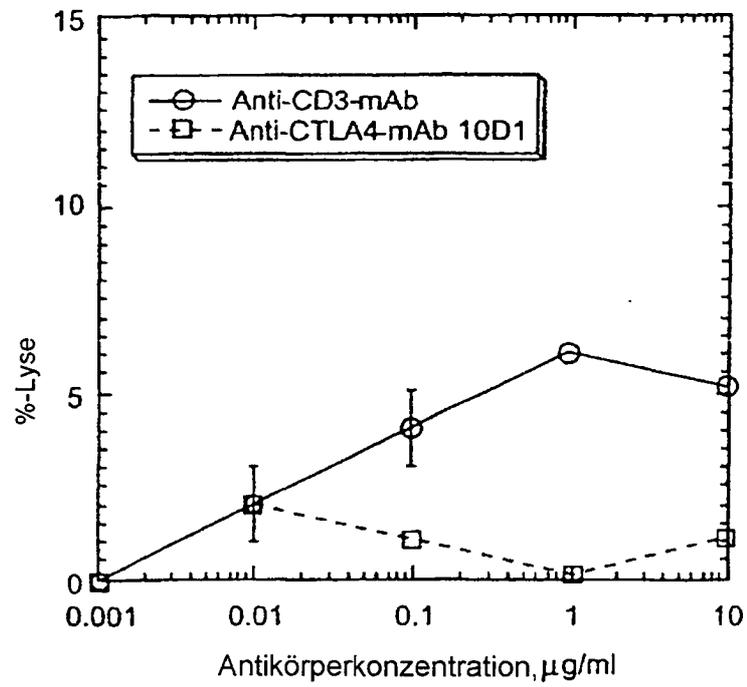


FIG. 16

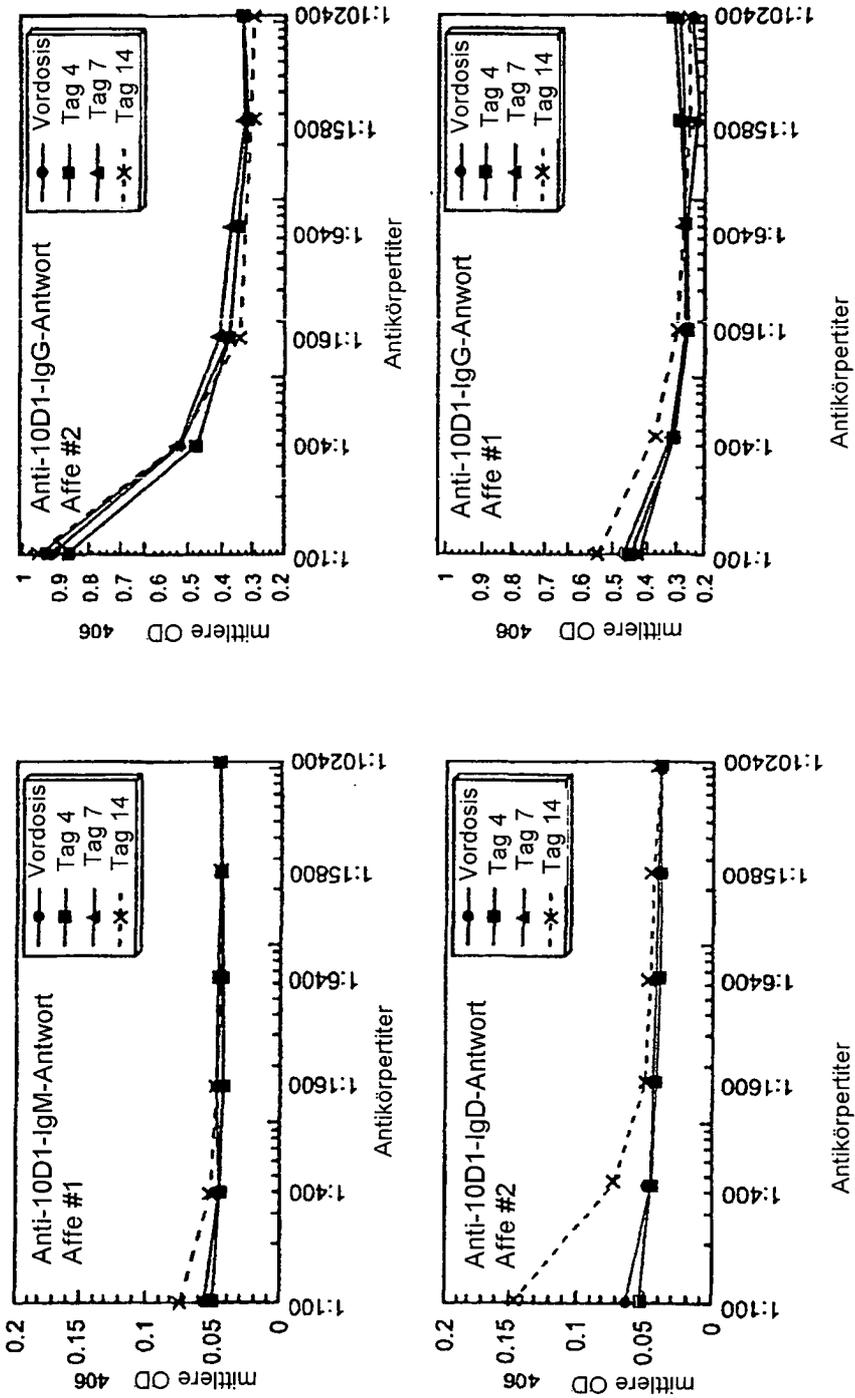


FIG. 17

Studien-Nr. MDXCITLA4-01
Zusammenfassung ausgewählter Laborwerte

Screen Nr.	Individuum Nr (Initialien)	Ergänzung #	Tag	Datum	PCV	Blutplätt.	WBC	Neutis	Lymphs	Monos	Eos	CD4	CD8	ESR	Hgb	Hcft					
					ng/ml	x10 ⁹ /ul	x10 ⁹ /ul	%	x10 ⁹ /ul	%	x10 ⁹ /ul	/ul	/ul	mm/hr	g/dl	%					
02001	001	JGR	Sr		144.80	263	8.12	73.00	5.90	18.00	1.47	5.60	0.46	1.80	0.15	10.4	30				
02001	001	JGR	0		185.20	261	5.74	66.00	3.79	22.00	1.32	6.60	0.38	3.10	0.18	10.6	32				
02001	001	JGR	1			259	6.31	69.00	4.38	20.00	1.29	6.70	0.55	0.90	0.00	9.5	30				
02001	001	JGR	2			240	6.59	70.00	4.66	19.00	1.31	6.70	0.44	1.80	0.12	9.5	28				
02001	001	JGR	3			270	6.53	71.00	4.63	21.00	1.38	5.50	0.36	2.20	0.14	6.08	254				
02001	001	JGR	7		257.40	299	6.70	68.00	4.56	23.00	1.53	6.00	0.40	2.50	0.17	9.5	28				
02001	001	JGR	14		332.30	308	6.87	71.90	7.94	21.20	1.39	5.21	0.36	1.90	0.13	8.8	25				
02001	001	JGR	21			286	9.72	74.00	7.20	19.70	1.91	4.80	0.46	1.00	0.10	9.1	28				
02001	001	JGR	28		351.00	304	5.38	63.00	3.40	26.00	1.44	5.80	0.31	2.90	0.18	6.7	25				
01002		JWF	Sr		28.30	271	11.60	75.40	8.75	13.60	1.58	5.70	0.66	4.60	0.53	3.99	189	41	13.9	37	
01003		MZB	Sr		12.70	178	5.49	69.00	3.79	19.60	1.08	6.30	0.35	2.70	0.24	3.25	168	19	12.7	36	
01004		TEQ	Sr		1459.00	264	6.26	75.10	4.70	14.40	0.90	7.70	0.48	2.40	0.15	3.85	129	61	12.8	36	
01005		WMN	Sr		192.40	212	6.85	73.70	5.05	17.40	1.20	6.20	0.43	2.20	0.15	4.83	217				
01006		MRS	Sr		4503.00	140	7.55	76.70	5.79	15.90	1.20	6.20	0.47	0.80	0.06	3.19	363	83			
01007		TAB	Sr		1394.00	205	5.78	73.00	4.24	13.00	0.76	6.50	0.37	6.00	0.35	3.76	127		14.1	43	
01008		CHB	Sr		70.70	229	4.67	54.00	2.56	32.00	1.52	8.30	0.39	3.40	0.16	4.61	499		15.6	45	
01009	003	RAB	Sr		238.60	144	3.70	78.00	2.88	14.00	0.55	5.40	0.20	1.20	0.04	2.11	162	43	9.8	30	
01009	003	RAB	0		336.90	123	3.92	68.00	2.67	21.00	0.83	6.70	0.34	1.50	0.06	3.74	188		10.9	31	
01009	003	RAB	1			122	3.35	71.00	2.38	22.00	0.74	4.00	0.14	1.80	0.06	3.07	192		11.3	32	
01009	003	RAB	2			109	4.05	74.00	2.99	19.00	0.77	4.80	0.20	1.20	0.05	3.28	220		11.3	33	
01009	003	RAB	3			114	3.79	70.00	2.67	21.00	0.81	6.20	0.23	1.30	0.05	3.13	265		10.9	31	
01009	003	RAB	7		249.30	69	3.38	75.00	2.54	17.00	0.60	5.60	0.19	0.70	0.02	2.44	161		10.4	30	
01009	003	RAB	14		259.80	101	3.68	69.00	2.54	21.20	0.78	6.50	0.31	1.00	0.04	3.08	173		8.8	25	
01012	004	RAB	21			122	4.82	78.00	3.76	13.20	0.64	7.70	0.37	0.60	0.03	2.18	195		7.4	20	
01012	004	CEH	Sr		112.90	172	5.85	64.00	3.74	28.00	1.69	6.60	0.33	1.00	0.06	7.46	451	10	13.2	40	
01012	004	CEH	1													642	475				
01012	004	CEH	2			150	4.82	67.70	3.28	26.40	1.28	4.60	0.22	1.10	0.05	5.52	380		12.2	36	
01012	004	CEH	3			147	4.36	63.70	2.78	29.30	1.28	5.10	0.22	1.30	0.06	5.44	441		13.1	37	
01012	004	CEH	7		190.00	159	4.95	58.60	2.90	32.70	1.61	5.90	0.29	2.50	0.12	8.42	506		12.6	35	
01012	004	CEH	14		207.60	199	5.64	63.10	3.55	29.30	1.65	5.70	0.32	1.60	0.09				13.5	38	
01013		KJF	Sr		49.10	228	8.53	65.00	5.02	26.00	2.23	5.30	0.46	2.30	0.20	12.13	398		13.4	37	
02014	002	L-S	Sr		12.70	222	5.65	53.00	3.01	34.00	1.82	7.40	0.42	3.90	0.22	7.21	439		13.0	40	
02014	002	L-S	0		27.50	217	5.88	57.00	3.36	32.00	1.88	8.60	0.50	1.50	0.08	6.76	389		13.5	38	
02014	002	L-S	1			226	5.74	55.00	3.19	35.00	2.04	7.00	0.40	1.40	0.09	6.32	405		13.6	38	
02014	002	L-S	2			223	5.59	55.00	3.09	32.00	1.84	9.80	0.55	1.40	0.08	5.90	339		13.5	39	
02014	002	L-S	3			219	4.89	54.00	2.66	34.00	1.68	7.50	0.37	2.70	0.13	5.29	358		13.2	37	
01016	ungeeignet	G-F	Sr		4856.00	106	7.31	86.00	6.29	5.00	0.33	6.80	0.49	1.80	0.14	57.6	7		10.3	31	
		normaler Ber.		gering		150	3.60	40.50	1.96	15.40	0.80	2.60	0.12			404	220				
				hoch		10.70	75.00	7.23	48.50	3.00	10.00	0.92	6.80	0.57		1612	1128				

Tabelle 11

Studie Nr. MDXCTLA4-02																
Zusammenfassung ausgewählter Laborwerte																
Screen Nr.	Individuum Nr.	Initialien	Ergänzung #	Tag	Datum	Blutplätt.	WBC	Neuts	Lymphs	Monos	Eos	CD4	CD8	ESR	Hgb	Hctf
						$\times 10^3/\mu\text{l}$	$\times 10^3/\mu\text{l}$	%	%	$\times 10^3/\mu\text{l}$	%	$\times 10^3/\mu\text{l}$	/ μl	mm/hr	g/dl	%
02001	001	SAH	0	Scr		216	5.28	58.60	35.60	2.23	5.90	1189	631		14.4	39
02001	001	SAH	0	0		230	5.58	59.70	32.30	1.80	5.70	1039	502		14.9	43
02001	001	SAH	0	1		202	5.12	61.60	30.20	1.55	5.00	957	407		13.4	37
			Normalbereich		gering	150	3.60	40.50	15.40	0.80	2.60	404	220			
					hoch		10.70	75.00	48.50	3.00	10.10	1612	1129	30		

Tabelle 13