



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 37 899 T2 2008.12.24**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 128 847 B1**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61K 47/48** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 37 899.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB99/03747**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 954 209.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/027435**

(86) PCT-Anmeldetag: **10.11.1999**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **18.05.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **05.09.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **02.01.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.12.2008**

(30) Unionspriorität:

**9824632 10.11.1998 GB**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

**UCB Pharma, S.A., Bruxelles, BE**

(72) Erfinder:

**SMITH, Bryan John, Maidenhead, Berkshire SL6  
6JZ, GB**

(74) Vertreter:

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

(54) Bezeichnung: **ANTIKÖRPER-SERUMPROTEIN HYBRIDE**

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

**[0001]** Diese Erfindung betrifft modifizierte Antikörperfragmente, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung in der Medizin.

**[0002]** Da Antikörper eine hohe Spezifität in ihrer Bindung an andere Moleküle zeigen, sind sie als therapeutische oder diagnostische Mittel oder als Reagenzien von Nutzen (zum Beispiel als Reagenzien zur Affinitätsreinigung oder als katalytische Enzyme). Die Einführung der Hybridomtechnologie und die Erzeugung von transgenen Tieren hat die Herstellung von großen Volumina monoklonaler Antikörper erlaubt, die ausreichend für eine therapeutische Verwendung sind. Die meisten solcher Antikörper wurden zur Behandlung akuter Erkrankungen, wie bestimmter Typen von Krebs, erzeugt. Für die Behandlung von chronischen und/oder gängigeren Erkrankungen werden wahrscheinlich noch größere Mengen Antikörper benötigt. Eine gesteigerte Verwendung bringt ebenfalls einen gesteigerten Bedarf für ein billigeres therapeutisches Mittel mit sich.

**[0003]** Monoklonale Antikörper können in kultivierten Säugetier- oder Insektenzellen oder in transgenen Tieren hergestellt werden, aber die Fähigkeit dieser Technologien, einen großen Markt bei annehmbaren Kosten zu versorgen, ist bislang nicht nachgewiesen. Außerdem wurde für Pilze gezeigt, dass sie in der Lage sind, heterologe Proteine herzustellen [z. B. Sleep, D. et al. (1991) *Bio/Technology*, 9, 183–187], aber es wurde berichtet, dass eine Expression von vollständigem Immunglobulin G (IgG1) in einem Pilz nur in geringer Menge auftritt (in *Saccharomyces cerevisiae*) oder in einer Schüttelkolben-Kultur (in *Pichia pastoris*), so dass eine Antikörperherstellung in Pilzen im industriellen Maßstab nicht nachgewiesen ist. [Horwitz, A. H., et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8678–8682; Ogunjimi, A. A. et al. (1999) *Biotechnology Lett.* 21, 561–567]. Weiterhin würde erwartet werden, dass eine Glykosylierung des Antikörpers der aus Säugetiersystemen nicht ähnlich ist, und dies kann in Säugetieren Probleme der Immunogenizität und eine abweichende Funktion verursachen (Komplement-Aktivierung, Bindung an Fc-Rezeptoren, Transzytose und Verlängerung der Halbwertszeit durch eine Interaktion mit dem FcRn-Rezeptor) [Nose, M. und Wigzell, H. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 6632–6636; Tao, M.-H. und Morrison, S. L. (1989) *J. Immunol.* 143, 2595–2601; Wawrzynczak, E. J. et al. (1992) *Molec. Immunol.* 29, 213–220; Kim, J.-K., et al. (1994) *Eur. J. Immunol.* 24, 2429–2434].

**[0004]** Von bakteriellen Systemen ist nicht bekannt, dass sie in der Lage zum Herstellen eines vollständigen, funktionsfähigen Antikörpers mit einer Ausbeute sind, die ausreicht, um ein ökonomisches Verfahren zur Herstellung im großen Maßstab zu ergeben, aber sie stellen eine Quelle für kostengünstige Immunglobulin-Fragmente, wie Fab' dar [Retter, M., et al. (1988) *Science*, 240, 1041–1043]. Antikörperfragmenten können jedoch verschiedene der Funktionen eines vollständigen Antikörpers fehlen. Zum Beispiel fehlt Fab', F(ab')<sub>2</sub> oder scFv die Fc-Domäne, welche in vivo eine lange Lebensdauer verleiht: [Medesan C. et al. (1997) *J. Immunol.* 158, 2211–2217]. Für die Halbwertszeit von Fab' oder F(ab')<sub>2</sub> im Kreislauf von Säugetieren wurde berichtet, dass sie ungefähr 1% der von vollständigem IgG beträgt [Waldmann, T. A. und Strober, W. (1969) *Progr. Allergy*, 13, 1–110], und für die  $\beta$ -Phasen-Halbwertszeit (die Zeit, welche die Hälfte der Moleküle im Kreislauf braucht, um entfernt zu werden) von Fab' wurde berichtet, dass sie ungefähr 5% der des vollständigen IgG beträgt [Chapman, A. P., et al. (1999) *Nature Biotechnology*, 17, 780–783]. Obwohl sie billig herzustellen sein können, werden diese Fragmente daher schnell aus dem Kreislauf entfernt und können von begrenztem therapeutischem Nutzen sein. Dies hat zu Versuchen geführt, die Halbwertszeit von Antikörperfragmenten zu verlängern, zum Beispiel durch eine Modifikation von Fab' oder F(ab')<sub>2</sub> in vitro durch das Hinzufügen von einem oder mehreren Molekül(en) Polyethylenglykol an jedes Fragmentmolekül. Internationale Patentanmeldung Nr. WO 98/925971.

**[0005]** In der vorliegenden Erfindung haben wir uns mit dem erkennbaren Bedarf für ein Hilfsmittel beschäftigt, um ein IgG-Fragment ökonomisch herzustellen, welches ein Antigen binden kann und welches in vivo eine lange Halbwertszeit aufweist. Wir haben dies durch Einsetzen eines Trägerproteins erreicht, um die Zeit des Immunglobulins im Kreislauf zu verlängern.

**[0006]** Daher stellen wir gemäß einem Aspekt der Erfindung ein Mehrkomponenten-Hybridprotein bereit, umfassend ein Antigen-bindendes Antikörperfragment, welches kovalent an ein Serum-Trägerprotein oder ein Fragment davon gebunden ist, wobei das Serum-Trägerprotein ein Albuminmolekül ist, und wobei das Antikörperfragment und das Albumin indirekt, wie in Anspruch 1 ausgeführt, verbunden sind.

**[0007]** Eine Vielzahl von Proteinen kommt im Plasma vor, welche im Körper mit Halbwertszeiten zirkulieren, die in Tagen gemessen werden, zum Beispiel 5 Tage für Thyroxin-bindendes Protein oder 2 Tage für Transthyretin [Bartalena, L. und Robbins, J. (1993) *Clinics in Lab. Med.* 13, 583–598] oder 65 h in der zweiten Phase des Turnover von iodiertem saurem  $\alpha$ 1-Glykoprotein [Bree, F. et al. (1986) *Clin. Pharmacokin.* 11, 336–342].

Außerdem legen Daten von Gitlin et al. [Gitlin, D., et al. (1964) J. Clin. Invest. 10, 1938–1951] nahe, dass in schwangeren Frauen die Halbwertszeit von saurem  $\alpha$ 1-Glykoprotein 3,8 Tage, 12 Tage für Transferrin und 2,5 Tage für Fibrinogen beträgt.

**[0008]** Serumalbumin ist ein häufiges Protein sowohl in vaskulären, als auch in extravaskulären Bereichen [Peters, Jr., T. (1985) Adv. Prot. Chem. 37, 161–245]. Die Halbwertszeit von Albumin im Menschen, ungefähr 19 Tage [Peters, 1985 *ibid*], ist ähnlich zu der von IgG1 (ungefähr 21 Tage [Waldeman + Strober, *ibid*]), obwohl sie in anderen Arten geringer ist – zum Beispiel ungefähr 2 Tage in Ratten [Peters, 1985 *ibid*]. Albumin besitzt nicht die bekannte Fähigkeit von Antikörpern, spezifisch Liganden, insbesondere jene mit hohem Molekulargewicht, zu binden.

**[0009]** Die WO 9200763 offenbart die chemische Kopplung von Albuminmolekülen an IgM- oder IgA-Fragmente, um die Antigen-Bindungsaffinität wiederherzustellen.

**[0010]** Die WO9533492 offenbart die chemische Kopplung eines ausrichtenden Mittels (spezifisches Bindungsmolekül für extrazelluläre Gewebematrix) an ein antiproliferatives oder zytotoxisches Mittel. Das sich ergebende Konjugat wird zur Hemmung der Wundheilung im Auge verwendet. Gegebenenfalls kann das ausrichtende Mittel chemisch an ein Trägermolekül, wie Albumin, gekoppelt sein, um die Bindung von mehreren Molekülen an das antiproliferative oder zytotoxische Mittel an jedes Molekül des ausrichtenden Mittels zu erlauben.

**[0011]** Yukawa N. et al. (1997) J. Immunol. 18, 214–233 offenbaren ein polyklonales bispezifisches Kaninchen-Fab'-gebundenes Serumalbumin-Konjugat zur Verwendung in einem Hämagglutinations-Immunassay für Beta-Mikroseminoprotein. Das Albuminmolekül wird als ein Linkermolekül verwendet, an welches mehrere Fab'-Fragmente gebunden werden.

**[0012]** In der vorliegenden Erfindung haben wir eine Reihe von Hybridproteinen hergestellt, die vorteilhafterweise die Antigen-bindenden Fähigkeiten eines Antikörperfragments und die Langlebigkeit von Serumalbumin *in vivo* aufweisen. Zusätzlich können die Hybride insbesondere für eine Verwendung bei schwangeren oder stillenden Müttern geeignet sein, da Albumin, wie verschiedene andere Serumproteine, schlecht durch die Plazenta transportiert wird: markiertes Albumin, das einer Mutter injiziert wurde, tritt mit 5% oder weniger spezifischer Aktivität im Fötus nach 25 Tagen auf [Gitlin, D. Kumate, J. Urrusti, J. und Morales, C. (1964) J. Clin. Invest. 10, 1938–1951]. Dieses steht im Gegensatz zu IgG, welches effizient durch die Plazenta zum Fötus transportiert wird. Ähnlich wird Albumin nicht durch die Darmwand von Neugeborenen transportiert, während IgG dies durch die Interaktion mit dem FcRn-Rezeptor wird. Daher würde vorteilhafterweise ein Fötus oder ein Neugeborenes minimalen Mengen der erfindungsgemäßen Hybride aus dem mütterlichen Kreislauf oder der Milch ausgesetzt sein.

**[0013]** Bezüglich der kommerziellen Herstellung wurde für rekombinantes Albumin berichtet, dass es mit mehreren gm pro Liter Hefekultur hergestellt wird (*Pichia pastoris* oder *Kluyveromyces fragilis*) [Barr, K. A., et al. (1992) Pharm. Eng. 12, 48–51; Fleer, R., et al. (1991) Bio/Technology 9, 968–975; Cregg, J. M. et al. (1993) Bio/Technology 11, 905–910]. Diese Expressionsmenge macht eine industrielle Herstellung von Protein in pharmazeutischer Güte ökonomisch möglich, wie von Fleer et al. [Fleer, R., et al. (1991) Bio/Technology 9, 968–975] angemerkt wurde. Ähnlich wurde für transgene Mäuse gefunden, dass sie so viel wie 10 gm pro Liter Albumin in ihrer Milch exprimieren [Hurwitz, D. R., et al. (1994) Transgenic Res. 3, 365–375].

**[0014]** Der Bestandteil des Antigen-bindenden Antikörperfragments in den erfindungsgemäßen Proteinen wird im Allgemeinen eine Antikörperdomäne der variablen Region umfassen, welche eine oder mehrere Antigen-bindende Stelle(n) enthält.

**[0015]** Die Domäne der variablen Region kann irgendeine Größe oder Aminosäurezusammensetzung aufweisen und wird im Allgemeinen mindestens eine hypervariable Aminosäuresequenz, die für die Antigenbindung verantwortlich ist, eingefügt in eine Leserahmenssequenz, umfassen. Im Allgemeinen gesprochen, kann die Domäne der variablen (V) Region irgendeine geeignete Anordnung von variablen Immunglobulindomänen der schweren ( $V_H$ ) und/oder der leichten ( $V_L$ ) Kette sein. Daher kann zum Beispiel die Domäne der V-Region monomer sein und eine  $V_H$ - oder  $V_L$ -Domäne darstellen, wenn diese in der Lage sind, ein Antigen mit annehmbarer Affinität unabhängig zu binden. Alternativ kann die Domäne der V-Region dimer sein und  $V_H$ - $V_H$ ,  $V_H$ - $V_L$ - oder  $V_L$ - $V_L$ -Dimere enthalten, in welchen die  $V_H$ - und  $V_L$ -Ketten nicht kovalent miteinander verbunden sind. Wenn es gewünscht wird, können die Ketten jedoch kovalent gekoppelt werden, entweder direkt, zum Beispiel über Disulfidbindung zwischen den zwei variablen Domänen, oder durch einen Linker, zum Beispiel einen Pep-

tidlinker, um eine Einzelkettendomäne zu bilden, z. B. scFv.

**[0016]** Die Domäne der variablen Region kann irgendeine natürlich vorkommende variable Domäne oder eine gentechnisch hergestellte Version davon sein. Mit gentechnisch hergestellter Version ist eine Domäne der variablen Region gemeint, welche unter Verwendung von gentechnischen, rekombinanten DNA-Techniken erzeugt wurde. Solche gentechnisch hergestellten Versionen schließen jene ein, die zum Beispiel aus natürlichen variablen Antikörperregionen durch Insertionen, Deletionen oder Änderungen in oder an den Aminosäuresequenzen der natürlichen Antikörper erzeugt wurden. Besondere Beispiele für diesen Typ schließen jene gentechnisch hergestellten Domänen der variablen Region ein, welche mindestens eine CDR und gegebenenfalls eine oder mehrere Leserahmen-Aminosäure(n) aus einem Antikörper und den Rest der Domäne der variablen Region aus einem zweiten Antikörper enthalten.

**[0017]** Die Domäne der variablen Region wird im Allgemeinen in der Lage zum selektiven Binden an ein Antigen sein. Das Antigen kann irgendein Zell-assoziiertes Antigen darstellen, zum Beispiel ein Zelloberflächenantigen, wie ein T-Zell-, Endothelzell- oder Tumorzellmarker, oder es kann ein extrazelluläres Matrixantigen darstellen, ein intrazelluläres Antigen oder ein lösliches Antigen. Besondere Beispiele für Zelloberflächenantigene schließen Adhäsionsmoleküle, zum Beispiel Integrine, wie  $\beta$ 1-Integrine, z. B. VLA-4, E-Selectin, P-Selectin oder L-Selectin, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD45, CDW52, CD69, karzinoembryonisches Antigen (CEA), humanes Milchwittglobulin (HMFG1 und 2), MHC Klasse I- und MHC Klasse II-Antigene und VEGF und wenn geeignet, Rezeptoren davon ein. Lösliche Antigene schließen Interleukine, wie IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 oder IL-12, virale Antigene, zum Beispiel respiratorisches synzytiales Virus- oder Zytomegalovirus-Antigene, Immunglobuline, wie IgE, Interferone, wie Interferon- $\alpha$ , Interferon- $\beta$  oder Interferon- $\gamma$ , Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , Tumornekrosefaktor- $\beta$ , die Kolonie stimulierenden Faktoren, wie G-CSF oder GM-CSF und Blutplättchen abgeleitete Wachstumsfaktoren, wie PDGF- $\alpha$  und PDGF- $\beta$  und wenn geeignet, Rezeptoren davon ein.

**[0018]** In der Praxis ist es im Allgemeinen vorzuziehen, dass die Domäne der variablen Region mit einer C-terminalen Aminosäure an mindestens eine andere Antikörperdomäne oder ein Fragment davon kovalent gebunden ist. Wenn zum Beispiel eine  $V_H$ -Domäne in der Domäne der variablen Region anwesend ist, kann diese daher mit einer Immunglobulin  $C_H1$ -Domäne oder einem Fragment davon verbunden sein. Ähnlich kann eine  $V_L$ -Domäne mit einer  $C_K$ -Domäne oder einem Fragment davon verbunden sein. Auf diese Weise kann zum Beispiel das erfindungsgemäße Fragment ein Fab-Fragment darstellen, wobei die Antigen-bindende Domäne assoziierte  $V_H$ - und  $V_L$ -Domänen enthält, die kovalent an ihren C-Termini mit jeweils einer  $CH1$ - und  $C_K$ -Domäne verbunden sind. Die  $CH1$ -Domäne kann mit weiteren Aminosäuren erweitert sein, zum Beispiel um eine Domäne der Gelenkregion bereitzustellen, wie sie in einem Fab'-Fragment gefunden wird, oder um weitere Domänen bereitzustellen, wie  $CH2$ - und  $CH3$ -Antikörperdomänen.

**[0019]** Der Serum-Trägerprotein-Bestandteil in den erfindungsgemäßen Hybridproteinen ist Albumin oder ein Fragment davon, welches insbesondere menschlichen Ursprungs sein wird, und eine oder mehrere zusätzliche oder unterschiedliche Aminosäuren zu der natürlich vorkommenden Sequenz aufweisen kann, immer vorausgesetzt, dass die sich ergebende Sequenz funktionell äquivalent in Bezug auf die Halbwertszeit ist. Fragmente schließen irgendeinen kleineren Teil des Ausgangsproteins ein, welcher die Trägerfunktion der reifen Sequenz behält.

**[0020]** Die Antikörper- und Trägerprotein-Bestandteile in den erfindungsgemäßen Hybridproteinen sind indirekt kovalent verbunden. Indirekte kovalente Verbindung soll bedeuten, dass eine Aminosäure in einem Antikörperfragment an eine Aminosäure in einem Trägerprotein durch eine dazwischenliegende chemische Sequenz, zum Beispiel eine Brückengruppe, gebunden ist. Besondere Brückengruppen schließen zum Beispiel aliphatische, einschließlich Peptidketten, ein, wie insbesondere nachfolgend beschrieben wird.

**[0021]** Besondere Brückengruppen, die geeignet sind, um einen Antikörper indirekt mit einem Trägerprotein zu verbinden, schließen gegebenenfalls substituierte aliphatische, cycloaliphatische, heteroaliphatische, heterocycloaliphatische, aromatische und heteroaromatische Gruppen ein. Besondere Gruppen schließen gegebenenfalls substituierte geradkettige oder verzweigte  $C_{1-20}$ -Alkylen-,  $C_{2-20}$ -Alkenylen- oder  $C_{2-20}$ -Alkinylenketten, die gegebenenfalls durch ein oder mehrere -O- oder -S-Atom(e) unterbrochen und/oder terminal substituiert sind, oder -N(R<sup>1</sup>)- [wobei R<sup>1</sup> ein Wasserstoffatom oder eine  $C_{1-6}$ -Alkylgruppe ist], -N(R<sup>1</sup>)CO-, -CON(R<sup>1</sup>)-, -N(R<sup>1</sup>)SO<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>N(R<sup>1</sup>)-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, aromatische, z. B. Phenyl-, heteroaromatische, z. B. Pyridyl-, oder Cycloalkyl-, z. B. Cyclohexylgruppen ein. Solche Ketten schließen zum Beispiel gegebenenfalls substituierte geradkettige oder verzweigte  $C_{1-10}$ -Alkylenketten, wie gegebenenfalls substituierte Butylen-, Pentylen-, Hexylen- oder Heptylenketten, einzelne Aminosäurereste und Peptidketten, welche zum

Beispiel zwei bis zwanzig Aminosäuren enthalten, die gleich oder verschieden sein können, z. B. Polyglycinketten, wie  $(\text{Gly})_n$ , wobei  $n$  eine ganze Zahl von Zwei bis Zehn ist, ein. Optionale Substituenten, welche an irgendeiner der oben erwähnten Ketten anwesend sein können, schließen ein oder mehrere Halogenatom(e) ein, z. B. Fluor-, Chlor-, Brom- oder Iodatome, oder  $\text{C}_{1-5}$ -Alkyl-,  $\text{C}_{1-6}$ -Alkoxy-,  $\text{C}_{1-6}$ -Halogenalkyl-,  $\text{C}_{1-6}$ -Halogenalkoxy-, -OH- oder -N(R<sup>1</sup>)(R<sup>2</sup>)-Gruppen [wobei R<sup>2</sup> wie für R<sup>1</sup> definiert ist] ein.

**[0022]** Die Brückengruppe, welche einen Antikörper indirekt mit einem Trägerprotein verbindet, geht zu der Seitenkette aus Cysteinresten, die in dem Antikörper oder dem Trägerprotein liegt. An jedem Verbindungspunkt kann der Rest einer reaktiven Gruppe anwesend sein. Wenn zum Beispiel die Brückengruppe mit einem Cysteinrest in dem Antikörper oder Trägerprotein verbunden ist, kann der Rest einer Thiol-selektiven reaktiven Gruppe, wie einer Maleimidgruppe oder desgleichen, als Teil der Verbindung eingeschlossen sein.

**[0023]** Wenn es gewünscht wird, kann das erfindungsgemäße Hybridprotein ein oder mehrere Effektor- oder Reportermolekül(e) aufweisen, welche daran gebunden sind, und die Erfindung erstreckt sich auf solche modifizierten Proteine. Die Effektor- oder Reportermoleküle können an das Antikörperfragment und/oder das Trägerprotein durch irgendeine verfügbare Aminosäure-Seitenkette oder terminale funktionelle Aminosäuregruppe gebunden sein, die in beiden Bestandteilen liegt, zum Beispiel irgendeine freie Amino-, Imino-, Hydroxyl- oder Carboxylgruppe. Die Verbindung kann direkt oder indirekt sein, über Spacer- oder Brückengruppen, wie gerade oben beschrieben wurde, zum Verbinden der Antikörper- und Trägerprotein-Bestandteile. Alternativ kann der Reporter/Effektor an den Verbindungsrest gebunden sein.

**[0024]** Effektormoleküle schließen zum Beispiel antineoplastische Mittel, Toxine (wie enzymatisch aktive Toxine bakteriellen oder pflanzlichen Ursprungs und Fragmente davon, z. B. Ricin und Fragmente davon), biologisch aktive Proteine, zum Beispiel Enzyme, Nukleinsäuren und Fragmente davon, z. B. DNA, RNA und Fragmente davon, natürliche oder synthetische Polymere, wie Polysaccharide oder Polyalkylen-Polymere, wie Poly(ethylenglykol), Radionuklide, insbesondere Radioiodid, und chelatgebundene Metalle ein. Geeignete Reportergruppen schließen chelatgebundene Metalle, fluoreszente Verbindungen oder Verbindungen ein, die durch eine NMR- oder ESR-Spektroskopie nachgewiesen werden können.

**[0025]** Besondere antineoplastische Mittel schließen zytotoxische und zytostatische Mittel, zum Beispiel alkylierende Mittel, wie Stickstoffsengase (z. B. Chlorambucil, Melphalan, Mechlorethamin, Cyclophosphamid oder Uracilsengas) und Derivate davon, Triethylenphosphoramid, Triethylthiophosphoramid, Busulfan oder Cisplatin, Antimetaboliten, wie Methotrexat, Fluoruracil, Floxuridin, Cytarabin, Mercaptopurin, Thioguanin, Fluoressigsäure oder Fluorzitronensäure, Antibiotika, wie Bleomycine (z. B. Bleomycinsulfat), Doxorubicin, Daunorubicin, Mitomycine (z. B. Mitomycin C), Actinomycine (z. B. Dactinomycin), Plicamycin, Calichämicin und Derivate davon oder Esperamicin und Derivate davon, mitotische Inhibitoren, wie Etoposid, Vincristin oder Vinblastin und Derivate davon, Alkaloide, wie Ellipticin, Polyole, wie Taxicin-I oder Taxicin-II, Hormone, wie Androgene (z. B. Dromostanon oder Testolacton), Progestine (z. B. Megestrolacetat oder Medroxyprogesteronacetat), Östrogene (z. B. Dimethylstilbestroldiphosphat, Polyöstradiolphosphat oder Estramustinphosphat) oder Antiöstrogene (z. B. Tamoxifen), Anthrachinone, wie Mitoxantron, Harnstoffe, wie Hydroxyharnstoff, Hydrazine, wie Procarbazin oder Imidazole, wie Dacarbazin, ein.

**[0026]** Besonders geeignete Effektorgruppen stellen Calichämicin und Derivate davon dar (siehe zum Beispiel die südafrikanischen Patentanmeldungen Nr. 85/8794, 88/8127 und 90/2839).

**[0027]** Chelatgebundene Metalle schließen Chelate von di- oder tripositiven Metallen ein, die eine Koordinationszahl von 2 bis einschließlich 8 aufweisen. Besondere Beispiele solcher Metalle schließen Technetium (Tc), Rhenium (Re), Kobalt (Co), Kupfer (Cu), Gold (Au), Silber (Ag), Blei (Pb), Wismut (Bi), Indium (In), Gallium (Ga), Yttrium (Y), Terbium (Tb), Gadolinium (Gd) und Scandium (Sc) ein. Im Allgemeinen ist das Metall vorzugsweise ein Radionuklid. Besondere Radionuklide schließen <sup>99m</sup>Tc, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>58</sup>Co, <sup>60</sup>Co, <sup>67</sup>Cu, <sup>195</sup>Au, <sup>199</sup>Au, <sup>110</sup>Ag, <sup>203</sup>Pb, <sup>206</sup>Bi, <sup>207</sup>Bi, <sup>111</sup>In, <sup>67</sup>Ga, <sup>68</sup>Ga, <sup>88</sup>Y, <sup>90</sup>Y, <sup>160</sup>Tb, <sup>153</sup>Gd und <sup>47</sup>Sc ein.

**[0028]** Das chelatgebundene Metall kann zum Beispiel einer der oben genannten Metalltypen sein, welcher mit irgendeinem geeigneten mehrzähligen chelatbildenden Mittel, zum Beispiel acyclischen oder cyclischen Polyaminen, Polyethern (z. B. Kronenethern und Derivaten davon), Polyamiden, Porphyrinen und carbocyclischen Derivaten chelatgebunden sind.

**[0029]** Im Allgemeinen wird der Typ des chelatbildenden Mittels von dem verwendeten Metall abhängen. Eine besonders geeignete Gruppe chelatbildender Mittel in erfindungsgemäßen Konjugaten stellen jedoch acyclische und cyclische Polyamine dar, insbesondere Polyaminocarbonsäuren, zum Beispiel Diethylentriaminpen-

taessigsäure und Derivate davon, und makrocyclische Amine, z. B. cyclische Triaza- und Tetraaza-Derivate (zum Beispiel wie in der internationalen Patentanmeldung Nr. WO 92/22583 beschrieben) und Polyamide, insbesondere Desferrioxamin und Derivate davon.

**[0030]** In den erfindungsgemäßen Proteinen ist jedes Antigen-bindende Antikörperfragment vorzugsweise ein monovalentes Fab'-Fragment, welches gegebenenfalls eine oder mehrere zusätzliche Aminosäure(n), gebunden an den C-Terminus der CH1-Domäne, enthält, und ist insbesondere ein Fab'-Fragment. Besonders geeignete Fab'-Fragmente schließen jene ein, in denen die Gelenkdomäne einen einzelnen Cysteinrest enthält. Die Fragmente des Albumins schließen eine oder mehrere Domäne(n) I, II und/oder III oder Subdomänen davon ein [siehe zum Beispiel Peters, T. in "All about Albumin", Academic press, London (1996)].

**[0031]** In den erfindungsgemäßen Antikörper-Albumin-Hybriden ist jeder Proteinbestandteil indirekt zwischen den Thiolgruppen eines in dem Antikörper und eines anderen im Albumin vorliegenden Cysteinrests verbunden. Die indirekte Verbindung kann durch ein Brückenmolekül erreicht werden, wie es oben beschrieben wurde. Besonders geeignete Gruppen schließen nicht spaltbare Linkergruppen, insbesondere gegebenenfalls substituierte geradkettige oder verzweigte C<sub>1-10</sub>-Alkylketten ein.

**[0032]** Der Antikörper ist vorzugsweise ein Fab'-Fragment, welches gegebenenfalls eine oder mehrere zusätzliche Aminosäure(n) enthält, welche an den C-Terminus der CH1-Domäne gebunden sind. Insbesondere geeignete Fragmente schließen Fab'-Fragmente ein. Der Cysteinrest, an welchen das Spacer- oder Brückenmolekül gebunden ist, liegt vorzugsweise in der CH1-Domäne des Fab oder liegt insbesondere in irgendeiner C-terminalen Erweiterung der CH1-Domäne des Fab, zum Beispiel in der Gelenkdomäne eines Fab'.

**[0033]** Das Albumin kann insbesondere reifes humanes Serumalbumin oder ein Fragment davon darstellen. Das Brückenmolekül ist an den Cysteinrest an Position 34 des Albumins gebunden. Um eine unerwünschte Homodimer-Bildung zu vermeiden [siehe die Beispiele unten] weist das Brückenmolekül vorteilhafterweise eine Länge von ungefähr 10 Å bis ungefähr 20 Å auf, zum Beispiel ungefähr 16 Å. Geeignete Brückenmoleküle in diesem Längenbereich können einfach aus veröffentlichten Quellen, zum Beispiel aus Herstellerkatalogen [siehe unten] bestimmt werden. Besonders geeignete Brückenmoleküle schließen gegebenenfalls substituierte Hexylketten ein. Wenn jedes Ende des Brückenmoleküls an den Cysteinrest gebunden ist, kann dies über eine Disulfidbindung oder insbesondere eine Schwefel-Kohlenstoff-Bindung stattfinden. Wenn die Verbindung eine Schwefel-Kohlenstoff-Bindung darstellt, kann der Rest einer Thiol-selektiven reaktiven Gruppe, wie ein Maleimid, als Teil von jedem Ende der Spacer- oder Brückengruppe vorliegen.

**[0034]** Die erfindungsgemäßen Hybridproteine können für den Nachweis oder die Behandlung einer Anzahl von Erkrankungen oder Störungen geeignet sein. Solche Erkrankungen oder Störungen können jene einschließen, die unter den allgemeinen Überbegriffen der infektiösen Erkrankung, z. B. der viralen Infektion, der entzündlichen Erkrankung/Autoimmunität, z. B. der rheumatoiden Arthritis, der Osteoarthritis, der entzündlichen Darmerkrankung, des Krebses, der allergischen/atopischen Erkrankung, z. B. des Asthmas, Ekzems, der erblich bedingten Erkrankung, z. B. der zystischen Fibrose, der Sichelzellenanämie, der dermatologischen Erkrankung, z. B. der Schuppenflechte, der neurologischen Erkrankung, z. B. der multiplen Sklerose, der Transplantation, z. B. der Organtransplantatabstoßung, der Graft-versus-Host-Erkrankung und der metabolischen/idiopathischen Erkrankung, z. B. des Diabetes, beschrieben werden.

**[0035]** Das erfindungsgemäße Hybridprotein kann für eine Verwendung in der Therapie und/oder Diagnose formuliert werden, und gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung stellen wir eine pharmazeutische Zusammensetzung bereit, welche ein Mehrkomponenten-Hybridprotein, welches ein Antigen-bindendes Antikörperfragment umfasst, welches kovalent mit einem Albuminmolekül oder einem Fragment davon verbunden ist, zusammen mit einem oder mehreren pharmazeutisch verträglichen Bindemittel(n), Verdünnungsmittel(n) oder Träger(n) umfasst.

**[0036]** Wie oben erklärt, kann das Hybridprotein in diesem Aspekt der Erfindung gegebenenfalls mit einer oder mehreren Effektor- oder Reportergruppe(n) verbunden sein.

**[0037]** Die pharmazeutische Zusammensetzung kann irgendeine geeignete Form zur Verabreichung annehmen, z. B. zur oralen, buccalen, parenteralen, nasal, topischen oder rektalen Verabreichung, oder eine Form, die zur Verabreichung durch Inhalation oder Insufflation geeignet ist, und liegt vorzugsweise in einer Form vor, die zur parenteralen Verabreichung geeignet ist, z. B. durch Injektion oder Infusion, zum Beispiel durch Bolusinjektion oder kontinuierliche Infusion. Wenn die Zusammensetzung für eine Injektion oder Infusion ist, kann sie die Form einer Suspension, Lösung oder Emulsion in einem öligen oder wässrigen Träger anneh-

men, und sie kann Formulierungsmittel, wie Suspensions-, Konservierungs-, Stabilisierungs-, Antioxidations- und/oder Dispersionsmittel enthalten.

**[0038]** Alternativ kann die Zusammensetzung in trockener Form zur Rekonstitution vor der Verwendung mit einer geeigneten sterilen Flüssigkeit vorliegen.

**[0039]** Wenn die Zusammensetzung für eine orale Verabreichung geeignet ist, kann die Formulierung zusätzlich zu dem aktiven Inhaltsstoff Zusatzstoffe enthalten, wie: Stärke, z. B. Kartoffel-, Mais- oder Weizenstärke, oder Zellulose oder Stärkederivate, wie mikrokristalline Zellulose, Kieselsäure, verschiedene Zucker, wie Lactose, Magnesiumcarbonat und/oder Calciumphosphat. Wenn die Formulierung für eine orale Verabreichung ist, ist es wünschenswert, dass sie vom Verdauungssystem des Patienten gut vertragen werden wird. Dazu kann es wünschenswert sein, Schleimbildner und Harze in die Formulierung einzuschließen. Es kann auch wünschenswert sein, die Verträglichkeit durch Formulieren des Antikörpers in eine Kapsel, welche in den Magensäften unlöslich ist, zu verbessern. Es kann auch bevorzugt sein, den Antikörper oder die Zusammensetzung in eine Formulierung mit kontrollierter Freisetzung einzuschließen.

**[0040]** Wenn die Zusammensetzung für eine rektale Verabreichung geeignet ist, kann die Formulierung ein Binde- und/oder Gleitmittel enthalten, zum Beispiel polymere Glykole, Gelatinen, Kakaobutter oder andere Pflanzenwache oder -fette.

**[0041]** Therapeutische und diagnostische Verwendungen der erfindungsgemäßen Hybridproteine umfassen typischerweise das Verabreichen einer wirksamen Menge des Proteins an einen Menschen. Die genaue zu verabreichende Menge wird gemäß der beabsichtigten Verwendung des Proteins und dem Alter, Geschlecht und dem Zustand des Patienten variieren, aber kann typischerweise von ungefähr 0,1 mg bis 1000 mg, zum Beispiel von ungefähr 1 mg bis 500 mg variiert werden. Das Protein kann als eine Einzeldosis oder in einer kontinuierlichen Weise über einen Zeitraum verabreicht werden. Die Dosen können wiederholt werden, wenn es angemessen ist. Typische Dosen betragen zum Beispiel zwischen 0,01–50 mg/kg Körpergewicht pro therapeutischer Einzeldosis, insbesondere zwischen 0,1–20 mg/kg Körpergewicht für eine therapeutische Einzeldosis.

**[0042]** Die erfindungsgemäßen Hybridproteine können durch chemische, enzymatische und/oder rekombinante DNA-Standardverfahren hergestellt werden.

**[0043]** So kann zum Beispiel das Hybridprotein durch die Verwendung von rekombinanten DNA-Techniken hergestellt werden, welche die Manipulation und Reexpression von DNA umfassen, die variable und/oder konstante Antikörperregionen und ein gewünschtes Trägerprotein oder ein Fragment davon kodiert. Eine solche DNA ist bekannt und/oder ist einfach aus DNA-Bibliotheken verfügbar, einschließlich von zum Beispiel Phagen-Antikörper-Bibliotheken [siehe Chiswell, D J und McCafferty, J. *Tibtech.* 10, 80–84 (1992)], oder kann synthetisiert werden, wenn es gewünscht wird. Molekularbiologische und/oder chemische Standardverfahren können verwendet werden, um die DNA zu sequenzieren und manipulieren, zum Beispiel um Kodons einzuführen, um Cysteinreste zu erzeugen, um andere Aminosäuren oder Domänen in dem Antikörper und/oder Trägerprotein wie gewünscht zu modifizieren, hinzuzufügen oder zu entfernen.

**[0044]** Von hier ausgehend können ein oder mehrere replizierbare Expressionsvektoren, welche die DNA enthalten, hergestellt und verwendet werden, um eine geeignete Zelllinie zu transformieren, z. B. eine nicht produzierende Myelom-Zelllinie, wie eine Maus-NSO-Linie oder eine bakterielle, z. B. E. coli-Linie, oder insbesondere eine Pilz-Linie, wie eine Hefe-Linie, z. B. Mitglieder der Gattungen *Pichia*, *Saccharomyces* oder *Kluyveromyces*, in welcher die Herstellung des Antikörpers stattfinden wird. Um eine effiziente Transkription und Translation zu erhalten, sollte die DNA-Sequenz in jedem Vektor geeignete regulatorische Sequenzen einschließen, insbesondere eine Promotor- und Leader-Sequenz, welche operabel mit der Sequenz der variablen Domäne verbunden ist. Besondere Verfahren zum Herstellen rekombinanter Proteine auf diese Weise sind im Allgemeinen gut bekannt und werden routinemäßig verwendet. Zum Beispiel werden grundlegende molekularebiologische Verfahren von Maniatis et al [Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1989] beschrieben, eine DNA-Sequenzierung kann wie in Sanger et al [PNAS 74, 5463, (1977)] und dem Amersham International plc Sequencing Handbook beschrieben, durchgeführt werden, und eine zielgerichtete Mutagenese kann gemäß dem Verfahren von Kramer et al [Nucl. Acids Res. 12, 9441, (1984)] und dem Anglian Biotechnology Ltd. Handbuch durchgeführt werden. Zusätzlich gibt es zahlreiche Veröffentlichungen, einschließlich Patentspezifikationen, welche geeignete Techniken für die Herstellung von Proteinen durch Manipulation von DNA, die Erzeugung von Expressionsvektoren und die Transformation von geeigneten Zellen, wie zum Beispiel in der internationalen Patentanmeldung Nr. WO 86/01533 und der europäischen Patentanmeldung Nr.

392745 beschrieben, detailliert ausführen.

**[0045]** Eine chemische Synthese der erfindungsgemäßen Hybridproteine kann durch Koppeln von geeignet funktionalisiertem Antikörper, Trägerprotein und, wo angemessen, Brückengruppen in einer vorbestimmten Reihenfolge erreicht werden. Chemische Standard-Kopplungstechniken können unter Verwendung von Ausgangsmaterialien eingesetzt werden, die eine oder mehrere reaktive funktionelle Gruppe(n) enthalten, wie Thiole, Säuren, Thiosäuren, Anhydride, Säurehalogenide, Ester, Imide, Aldehyde, Ketone, Imine und Amine. Der Ausgangsantikörper und das -trägerprotein können einfach aus natürlichen Quellen und/oder durch rekombinante DNA-Techniken, wie zuvor beschrieben wurde, erhalten werden. Geeignete Brückengruppen, zum Beispiel im Längenbereich von 10 Å–20 Å, wie oben beschrieben, sind entweder kommerziell verfügbar [siehe zum Beispiel Pierce & Warriner (UK) Ltd., Chester, UK] oder können durch einfache Funktionalisierung einer bekannten, einfach verfügbaren Chemikalie unter Verwendung konventioneller Chemie erhalten werden.

**[0046]** So kann in einem allgemeinen Ansatz eine homo- oder heteropolyfunktionale, z. B. bi- oder trifunktionale Brückengruppe zuerst an entweder den Antikörper oder das Trägerprotein gekoppelt werden, und das sich ergebende Produkt kann wie benötigt an den/die übrigen Bestandteil(e) gekoppelt werden, um das erfindungsgemäße Hybridprotein bereitzustellen. Die Kopplungsreaktionen können unter Verwendung von Standardbedingungen für Reaktionen von diesem Typ durchgeführt werden. So kann die Reaktion zum Beispiel in einem Lösungsmittel, zum Beispiel einem organischen Lösungsmittel, einem wässrig-organischen Lösungsmittel oder insbesondere einem wässrigen Lösungsmittel bei oder ungefähr bei Umgebungstemperatur bis ungefähr 70°C durchgeführt werden. Um eine ungewollte Polymerisation in der ersten Kopplungsreaktion zu vermeiden, wird die homo- oder heteropolyfunktionale Brückengruppe vorzugsweise in einer Überschusskonzentration im Vergleich zum Antikörper oder Trägerprotein eingesetzt. Ähnlich wird in der zweiten Kopplungsreaktion der Antikörper oder das Trägerprotein vorzugsweise in einer Überschusskonzentration zu dem Produkt der ersten Kopplungsreaktion eingesetzt. Darstellende Reaktionen werden detailliert in den nachfolgenden Beispielen zur Herstellung der erfindungsgemäßen Proteine beschrieben, und diese können einfach unter Verwendung verschiedener Ausgangsmaterialien angepasst werden, um andere erfindungsgemäße Verbindungen bereitzustellen.

**[0047]** Die folgenden Beispiele stellen die Erfindung dar. In diesen wird sich auf verschiedene Figuren bezogen. Diese sind:

**Fig. 1.**

SDS-PAGE des RSA-Fab'-Konjugats.

**[0048]** Das RSA-Fab'-Konjugat wurde unter sowohl reduzierenden als auch nicht reduzierenden Bedingungen laufen gelassen. Ungefähre sichtbare Molekulargewichte wurden durch einen Vergleich mit Standardproteinen abgeschätzt, die auf demselben Gel unter reduzierenden Bedingungen laufen gelassen wurden. Die molaren Verhältnisse wurden durch eine N-terminale Sequenzierung der Banden bestimmt, die von den Gelen auf eine PVDF-Membran geblottet wurden.

**Fig. 2.**

Pharmakokinetik des RSA-Fab'-Konjugats oder der Kontrollen in der Ratte.

**[0049]** Die Proteine wurden vor der Injektion in 6 Ratten <sup>125</sup>I-markiert. Die in Blutproben, die in Intervallen genommen wurden, anwesende Radioaktivität wurde durch Gammazählung quantifiziert. Die Ergebnisse der Analyse durch Winnonlin sind gezeigt. Die Einheiten für die Plasma-Halbwertszeit in den α- und β-Phasen (jeweils  $t_{1/2\alpha}$  und  $t_{1/2\beta}$ ) sind Stunden (h). Die Flächen unter den Plasmakonzentration-Zeitkurven (AUC,  $O-\infty$ ) sind in den Einheiten h·%Dosis. Die als RSA-Fab'-Konjugat (Korrekturfaktor) aufgetragenen Daten wurden aus Daten für das RSA-Fab'-Konjugat korrigiert, um eine Instabilität des markierten Proteins zuzulassen, wie im Text beschrieben wird.

**Fig. 3.**

Pharmakokinetik von RSA-Fab' oder Fab'-cys in der Ratte (untersucht durch ELISA oder Zytokinneutralisation).

**[0050]** Unmarkierte Proteine wurden in 2 Ratten injiziert und nachfolgend in Plasmaproben durch einen ELI-

SA quantifiziert. Im Fall des Konjugats setzte der ELISA eine Bindung des Liganden (TNF) und des Anti-Albuminantikörpers ein, und im Fall der Fab'-cys-Kontrolle setzte er eine Bindung von TNF und der Anti-Kappa-L-Kette ein, wie im Text beschrieben wird. Die Einheiten für die Plasma-Halbwertszeit in den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phasen (jeweils  $t_{1/2\alpha}$  und  $t_{1/2\beta}$ ) sind Stunden (h). Alternativ wurden Proben durch eine Neutralisation der TNF-Aktivität im L929-Assay untersucht. Die Flächen unter den Plasmakonzentration-Zeitkurven (AUC,  $0-\infty$ ) sind in den Einheiten  $h \cdot \% \mu\text{g/ml}$ . Die Kurven für RSA-Fab' überlagern einander, und die Kurven für Fab'-cys tun dies ebenso. Fehlerbalken = Standardfehler.

**Fig. 4.**

Konstruktion von pPIC(scFv-HSA)

**[0051]** Schema des Konstruktionsverfahrens.

**Fig. 5.**

Reduzierende SDS-PAGE von HSA-scFv-Fusionsproteinen.

**[0052]** Eine Probe von jedem Fusionsprotein wurde vor und nach einer Blau-Sepharose-Chromatographie, zusammen mit Standard-Molekulargewichtsmarkern und Standard-RSA auf demselben Gel unter reduzierenden Bedingungen laufen gelassen.

**Fig. 6.**

Pharmakokinetik von HSA-Fab'-Fusionsproteinen oder HSA in der Ratte.

**[0053]** Die Proteine wurden vor der Injektion in 6 Ratten  $^{125}\text{I}$ -markiert. Die in Blutproben, die in Intervallen genommen wurden, anwesende Radioaktivität wurde durch Gammazählung quantifiziert. Die Ergebnisse der Analyse durch Winnonlin sind gezeigt. Die Einheiten für die Plasma-Halbwertszeit in den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phasen (jeweils  $t_{1/2\alpha}$  und  $t_{1/2\beta}$ ) sind Stunden (h). Die Flächen unter den Plasmakonzentration-Zeitkurven (AUC,  $0-\infty$ ) sind in den Einheiten  $h \cdot \% \text{Dosis}$ .

**Fig. 7.**

Struktur des Vernetzungsmittels Trimaleimid.

**[0054]** Dieses Reagens wurde zur Erzeugung des RSA-F(ab')<sub>2</sub>-Konjugats verwendet.

**Fig. 8.**

Reduzierende SDS-PAGE des HSA-F(ab')<sub>2</sub>-Konjugats.

**[0055]** Die gereinigte Probe und Standardproteine wurden auf demselben Gel unter reduzierenden Bedingungen laufen gelassen. Die molaren Verhältnisse wurden durch eine N-terminale Sequenzierung der Banden bestimmt, die von den Gelen auf eine PVDF-Membran geblottet wurden.

**Fig. 9.**

Scatchard-Plots zur Bindung von RSA-F(ab')<sub>2</sub> oder F(ab')<sub>2</sub>-Kontrolle an Zellmembranen.

**[0056]** 2 Werte für  $K_D$  wurden für jede der (biphasischen) Kurven berechnet, wie gezeigt ist. Jede Phase von jeder Kurve ist als eine Gerade gezeigt.

Beispiel 1:

Fab'-Albumin-Konjugat

Verfahren

Herstellung von anti-TNF-Fab'

**[0057]** Rekombinantes anti-TNF-Fab' wurde in E. coli hergestellt und aus dem Periplasma durch die Verfahren hergestellt, die in der internationalen Patentanmeldung Nr. WO 98/25971 beschrieben sind.

Konjugation des anti-TNF-Fab' mit Ratten-Serumalbumin

**[0058]** Ratten-Serumalbumin (RSA, Fraktion V, Sigma, Code Nr. A-6272) wurde in Natriumacetat, 0,1 M, pH-Wert 5,9, auf 6,7 mg/ml (0,1 mM) gelöst. Dithiothreitol-Lösung (100 mM in demselben Acetatpuffer) wurde hinzugefügt, um eine Dithiothreitol-Endkonzentration von 0,3 M zu ergeben, was einen 3-fach molaren Überschuss gegenüber RSA ergibt. Das Gemisch wurde bei 37°C für 40 min inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend einer Chromatographie auf Sephadex G25M unter Verwendung einer PD10-Säule (Pharmacia, Code Nr. 17-0851-01, nach den Herstelleranweisungen verwendet) unterzogen, wodurch das Dithiothreitol entfernt wurde und der Puffer gegen Natriumphosphat, 0,1 M, pH-Wert 6, 2 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) ausgetauscht wurde. Die RSA-Konzentration in dieser Stufe betrug 70 µM.

**[0059]** 1,6-Bismaleimidohexan (BMH, Pierce Code Nr. 22330) wurde auf 7,736 mg/ml (28 mM) in Dimethylformamid gelöst. Die BMH-Lösung wurde zu der reduzierten RSA-Lösung hinzugefügt, um einen 21-fach molaren Überschuss von BMH gegenüber RSA zu ergeben. Das Gemisch wurde bei 21°C für 100 min inkubiert, anschließend einer Chromatographie auf G25M in einem Puffer aus Natriumphosphat, 0,1 M, pH-Wert 6, 2 mM EDTA unterzogen. Die Konzentration des derivatisierten RSA betrug in dieser Stufe 46 µM.

**[0060]** Die Lösungen des derivatisierten RSA und des anti-TNF-Fab' (187 µM) in Natriumphosphat, 0,1 M, pH-Wert 6, 2 mM EDTA wurden gemischt, um ein molares Verhältnis von RSA:Fab': 1:1,3 zu ergeben (was korrigiert um die Derivatisierung des RSA und die Reduktion des Fab'-Thiols ein Verhältnis von derivatisiertem RSA:reduziertem Fab': 1:1,4 ergab). Das Gemisch wurde bei 21°C für 2 h inkubiert, obwohl die Reaktion im Wesentlichen innerhalb von 1 h abgeschlossen war. Das Gemisch wurde anschließend bei 4°C gelagert, bis es den Reinigungsverfahren unterzogen wurde.

Konjugation von Fab' mit Cystein

**[0061]** Das Verfahren zur Herstellung des Kontrollmoleküls, anti-TNF-Fab', welches kovalent durch BMH über Thiole mit Cystein (anstelle von RSA) verbunden war, war im Wesentlichen dasselbe, wie für die Herstellung des Konjugats (siehe oben). 20 µM Fab' wurde bei 21°C für 95 min mit einem 40-fach molaren Überschuss an BMH (als eine Lösung in Dimethylformamid hinzugefügt) umgesetzt. Nach einer Chromatographie auf G25M (um das BMH zu entfernen) wurde das derivatisierte Fab' mit Cystein (Sigma, Code Nr. C-4820) bei einem molaren Verhältnis von Fab':Cystein-freies Thiol: 1:4,5 umgesetzt. Nach der Reaktion bei 21°C für 160 min wurde die Probe bei 4°C vor der Reinigung des Fab'-cys-Produkts gelagert.

Reinigung des Konjugats

**[0062]** Das Reaktionsgemisch wurde zuerst einer Chromatographie auf Gammabind plus (Pharmacia), einer Matrix, die eine Affinität für Fab' aufweist, unterzogen. Eine 5,3 ml Säule wurde in einem Puffer aus Natriumphosphat, 0,1 M, pH-Wert 6, 2 mM EDTA mit einer Fließgeschwindigkeit von 2 ml/min äquilibriert. Die gesamte Chromatographie fand bei einer Temperatur von 21°C statt. Die Probe wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min auf die Säule aufgebracht, und die Säule wurde anschließend in demselben Puffer (Natriumphosphat, 0,1 M, pH-Wert 6, 2 mM EDTA) gewaschen, bis die Grundlinie wiederhergestellt war. Adsorbiertes Protein wurde durch das Aufbringen eines Puffers aus Essigsäure, 0,5 M, der auf einen pH-Wert von 3 durch das Hinzufügen von Natriumhydroxid eingestellt wurde, eluiert. Das gesamte Elutionsmittel wurde in Fraktionen gesammelt, und jede Fraktion wurde durch eine SDS-PAGE analysiert (unter Verwendung von sowohl reduzierenden als auch nicht reduzierenden Bedingungen). Wie für diese Affinitätsmatrix erwartet, eluierte das unkonjugierte Fab' in dem pH-Wert 3 Puffer, während das unkonjugierte RSA gar nicht an die Matrix band und in dem Durchfluss während der Probenbeladung auftrat. Eine Konjugation eines einzelnen Fab' an ein RSA-Molekül beeinflusste eindeutig seine Bindung an das Protein G auf der Matrix, da das Konjugat in dem Durchfluss nur

etwas später als das (und überlappend mit dem) unkonjugierte(n) RSA auftrat. Die Fraktion, die das Konjugat enthielt, wurde noch einmal einer Chromatographie auf Gammabind plus (wie oben) unterzogen, um mehr RSA von ihm zu trennen. Die Konjugat (und einige Spuren von RSA) enthaltenden Fraktionen wurden in einer Rührzelle (Amicon, Cut-off-Membran mit 10 kDa nominellem Molekulargewicht) konzentriert.

**[0063]** Das kontaminierende RSA wurde aus der Herstellung durch eine Gelpermeationschromatographie auf einer GF250-HPLC-Säule der Größe 2 × 23 cm (unter Verwendung einer Hewlett Packard 1090 HPLC) entfernt. Die Säule wurde in einem Puffer aus Natriumphosphat, 0,2 M, pH-Wert 7, bei einer Fließgeschwindigkeit von 3 ml/min bei 21°C äquilibriert und eluiert. Die Probe des konzentrierten Konjugats (and RSA) wurde chromatographiert, und die Elution wurde bei 280 und 220 nm überwacht. Die Fraktionen, die den beobachteten Peaks entsprachen, wurden gesammelt und durch eine SDS-PAGE analysiert. Jene Fraktionen, welche das Konjugat enthielten (welches vollständig von dem später eluierenden RSA gelöst war), wurden gepoolt und in einer Rührzelle (Amicon, Cut-off-Membran mit 10 kDa nominellem Molekulargewicht) konzentriert. Die Lösung wurde bei 4°C gelagert, wobei Natriumazid auf 0,05% (w/v) hinzugefügt wurde, um als ein Konservierungsmittel zu wirken.

#### Reinigung des Fab'-cys

**[0064]** Das Reaktionsgemisch, welches das Fab'-cys-Produkt enthielt, wurde 5-fach in einem Puffer aus Natriumacetat, 50 mM, pH-Wert 4,5 verdünnt, anschließend auf eine Mono-S-Säule (mit 1 ml Volumen) unter Verwendung eines FPLC (Pharmacia) Geräts geladen. Die adsorbierten Proteine wurden anschließend in einem Gradienten von 0 bis 250 mM Natriumchlorid in Natriumacetat, 50 mM, pH-Wert 4,5 eluiert. Die Elution (1 ml/min bei 21°C) wurde durch eine Absorption bei 280 nm überwacht. Die gesammelten Peaks wurden durch eine SDS-PAGE analysiert.

#### Radioaktive Markierung der Proteine

**[0065]** Die Proteine wurden an den ε-Aminogruppen der Lysylreste unter Verwendung von <sup>125</sup>I-markiertem Bolton-und-Hunter-Reagens (Amersham International, Code Nr. IM5861) markiert. Die Proteine wurden in einem Puffer aus Borat gelöst oder verdünnt, um eine Borat-Endkonzentration von 0,1 M, pH-Wert 8 zu ergeben. Eine 300 µg Protein enthaltende Lösung (zwischen 300 und 370 µl) wurde anschließend mit 20 µl Bolton-und-Hunter-Lösung in Propan-2-ol (welche 9 MBq <sup>125</sup>I enthielt) gemischt. Das Gemisch wurde bei 21°C für 15 min inkubiert, anschließend wurde die Reaktion durch das Hinzufügen von 60 µl einer Lösung aus Glycin, 1 M, in Borat, 0,1 M, pH-Wert 8,5 abgestoppt. Nach ungefähr 5 min Reaktion bei 21°C wurde das Reaktionsgemisch auf Sephadex G25M unter Verwendung einer PD10-Säule (Pharmacia, Code Nr. 17-0851-01, nach den Herstelleranweisungen verwendet) chromatographiert. Dabei wurde der Puffer gegen Phosphat gepufferte Salzlösung ausgetauscht. Die spezifische Aktivität jeder Herstellung wurde aus Schätzungen der Proteinkonzentration (siehe Analytische Verfahren) und der Radioaktivität berechnet, und lag typischerweise im Bereich von 0,45 bis 0,54 µCi/µg. Die radioaktiv markierten Proben wurden direkt nach der Markierung verwendet.

#### Analytische Verfahren

**[0066]** Eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), welche vorgegossene SDS-Gele (Novex), 1 mm dick und mit einer Acrylamidkonzentration von 4 bis 20%, verwendete, wurde nach den Herstelleranweisungen laufen gelassen. Die Gele wurden durch Eintauchen für 1 h in Coomassie BBG in Perchlorsäure (Sigma, Code Nr. B-8772) gefärbt, gefolgt vom Waschen in Wasser. Verschiedene Molekulargewichtsstandards wurden verwendet, um ungefähre Molekulargewichte (sichtbare) für die Probenproteine abzuleiten. Diese Standards waren jeweils Mark 12 und Seebue ungefärbt und vorgefärbte Marker (Novex). Für Western Blots folgte der SDS-PAGE ein Blotten auf eine Polyvinylidendifluoridmembran (Millipore), mit einem Nachweis des Fd-Fragments des Fab' durch Schaf anti-Mensch IgG(Fd) IgG-Fraktion (The Binding Site, Code Nr. PC075), gefolgt vom Peroxidase-Affinipur-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment des Kaninchen anti-Schaf-IgG, Fc-Fragment (Immunoresearch, Code Nr. 313036046) und einer Visualisierung durch die Verwendung von Chemolumineszenz (ECL, Amersham International). Für die Autoradiographie folgte der SDS-PAGE eine Exponierung des Gels gegenüber einem photographischen Film (Hyperfilm MP, Amersham International). Zum Sichtbarmachen der radioaktiv markierten Proben auf den Gelen (und der nachfolgenden Quantifizierung) wurden die Gele Hochauflösungs- oder Mehrzweckscreens ausgesetzt und in dem Canberra Packard Cyclone System unter Verwendung der Optiquant-Software verarbeitet.

**[0067]** Die Quantifizierung der Proteinlösungen wurde durch eine Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm in einer 1 cm Zelle unter Verwendung der Absorptionskoeffizienten (für 1 mg/ml Lösung in einer 1 cm Zelle)

von 1,43 für Fab' oder F(ab')<sub>2</sub> und von 0,58 für RSA durchgeführt. Ein Koeffizient von 1,0 für das RSA-Fab'-Konjugat wurde aus jenen von RSA und Fab' berechnet, gewichtet in Übereinstimmung mit den einzelnen Massen der zwei Bestandteile.

**[0068]** Die Konzentration des freien Thiols in einer Proteinlösung wurde durch Hinzufügen von 1/9 Volumen 4,4'-Dithiodipyridin (5 mM, die Endkonzentration betrug daher 0,5 mM) in Phosphat gepufferter Salzlösung gemessen. Nach 10 min bei 21°C wurde die Absorption bei 324 nm in einer 1 cm Zelle gemessen. Die Absorption einer Nur-Puffer-Blindprobe wurde von diesem Wert abgezogen, und diese Zahl wurde mit 56,1167 multipliziert, um das Ergebnis in µM Thiol zu ergeben (wobei dies weiter für irgendeine Verdünnung der Ausgangsprobe korrigiert wurde).

**[0069]** Die N-terminale Proteinsequenzierung wurde nach den Herstelleranweisungen auf einem Modell 470A Proteinsequenziergerät mit einer online 120A HPLC und einem 900A Datenanalysesystem (Applied Biosystems) durchgeführt. Das Protein in Lösung wurde an eine Polyvinylidendifluoridmembran in einem Prosorb-Gerät (Applied Biosystems) adsorbiert. Die Proteine aus der SDS-PAGE wurden auf eine Polyvinylidendifluoridmembran (Immobilon PSQ, Millipore) gebロットet, und die Proteinbanden wurden durch Färben mit 0,1% (w/v) Ponceau S (Sigma, Code Nr. P-3504 in 1 Vol.-% Essigsäure für 1 min und anschließendem Entfärben des Hintergrunds in Wasser nachgewiesen. Die Banden wurden ausgeschnitten und direkt sequenziert.

**[0070]** Eine Oberflächen-Plasmon-Resonanzstudie der Interaktionen mit dem Liganden wurde auf einem BI-ACORE 2000 (Biacore AB) nach den Herstellerempfehlungen durchgeführt. Die Sensorchipoberfläche, die mit Ziege Anti-Mensch F(ab')<sub>2</sub>-Antikörper (Jackson ImmunoResearch Lab. Inc.) beschichtet war, welcher an die leichte Kette bindet, wurde verwendet, um Konjugat, Fab' oder IgG zu binden, deren Bindung an den Liganden (TNF) aus der Lösung anschließend messbar war.

**[0071]** ELISAs wurden wie unten folgt, durchgeführt, wobei zwischen die Schritte Waschschriffe in 0,1% Tween 20 in Phosphat gepufferter Salzlösung eingefügt waren. Mikrotiterplattenvertiefungen wurden mit Zytokin-Antigen beschichtet. Nichtspezifische Bindungsstellen wurden anschließend durch Inkubation der Vertiefungen mit einer 5% (w/v) Lösung getrockneter Magermilch ("Marvel", Premier Beverages, UK) in Phosphat gepufferter Salzlösung für 1 h blockiert. Die Proben oder Standards wurden in bovinem Serumalbumin, 1% (w/v) in Phosphat gepufferter Salzlösung verdünnt und anschließend in den Vertiefungen für 1 h bei 21°C inkubiert.

**[0072]** Die Quantifizierung wurde durch Absorption bei 630 nm durchgeführt, erzeugt aus 3,2',5,5'-Tetramethylbenzidin (120 µM in 10 mM Acetat, pH-Wert 6) als ein Ergebnis der Peroxidaseaktivität, wobei einem der beiden gefolgt wurde:

(i) Zum Nachweis des Albumin-Fab'-Konjugats, Inkubation von jeder Vertiefung mit Kaninchen Anti-Rattenalbumin (Cappel, Produkt Nr. 55711, verdünnt 1 in 4000 in 1% bovinem Serumalbumin in Phosphat gepufferter Salzlösung), gefolgt von Ziege Anti-Kaninchenimmunglobulin-Fc-Peroxidase-Konjugat (Jackson Produkt Nr. 111-036-046, verdünnt 1 in 5000 in 1% (w/v) bovinem Serumalbumin in Phosphat gepufferter Salzlösung).

(ii) Zum Nachweis von Fab', Inkubation in Ziege Anti-Mensch leichte Kappa-Kette (Southern Biotechnology Associates, Inc., Produkt Nr. 2060-01, verdünnt 1 in 5000 in 1% bovinem Serumalbumin in Phosphat gepufferter Salzlösung), gefolgt von Esel Anti-Ziegenimmunglobulin (H + L)-Peroxidasekonjugat (Jackson, Produkt Nr. 705-036-147, verdünnt 1 in 5000 in 1% (w/v) bovinem Serumalbumin in Phosphat gepufferter Salzlösung).

**[0073]** Das Assayformat (i) ergab eine lineare Antwort im Bereich von 40–500 ng/ml Konjugat, und das Assayformat (ii) ergab eine lineare Antwort im Bereich von 5–100 ng/ml Fab'.

**[0074]** Um die Neutralisation der TNF-Aktivität zu untersuchen, wurden Maus-L929-Zellen einschichtig in normalem RPMI 1640 plus Glutamin und 10 Vol.-% fötalem Kälberserum gezogen. Der TNF wurde in der Anwesenheit von Actinomycin D (1%, w/v) mit oder ohne Probe/anti-TNF hinzugefügt. Durch TNF verursachter Zelltod wurde durch einen MTT-Assay überwacht: 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT, Sigma, Code Nr. M-2128) wurde bis auf eine Endkonzentration von 50 µg/ml im Medium der behandelten Zellen hinzugefügt und bei 37°C für 4 h inkubiert. Die Reaktion wurde abgestoppt, und die braune Farbe, die von den lebenden Zellen erzeugt wurde, wurde mit einer Lösung aus SDS, 20% (w/v) in 50% Dimethylformamid in Wasser, bei pH-Wert 4,7 (durch Hinzufügen von 50% Essigsäure, 1 M, in Salzsäure, 1 M) gelöst und anschließend durch Messen der Absorption bei 570 nm quantifiziert. Nach dem Subtrahieren der Absorption bei 630 nm konnte der Grad des Zellüberlebens (und so die Konzentration des anwesenden aktiven TNF)

durch einen Vergleich mit Proben von Zellen untersucht werden, die mit Standardmengen TNF in der Abwesenheit einer TNF-neutralisierenden Aktivität behandelt wurden.

#### Inkubation von Protein in Plasma oder Blut in vitro

**[0075]** Rattenplasma und -blut (heparinisiert) wurden frisch hergestellt. Zu 100  $\mu\text{l}$  wurden 12  $\mu\text{l}$   $^{125}\text{I}$ -markierte Proteinlösung hinzugefügt. Die Inkubation fand bei 37°C in einem verschlossenen 0,5 ml Röhrchen statt, wobei 0,5 und 2  $\mu\text{l}$  Proben in Intervallen für die SDS-PAGE und Autoradiographie genommen wurden.

**[0076]** Unmarkiertes Konjugat oder Fab'-cys (2  $\mu\text{l}$  einer 0,9 mg/ml Lösung) wurden mit 100  $\mu\text{l}$  frischem Rattenplasma gemischt und bei 37°C in einem verschlossenen 0,5 ml Röhrchen inkubiert. Proben von 2  $\mu\text{l}$  wurden in Intervallen zur Analyse durch einen Western Blot genommen.

#### Pharmakokinetische Analyse des Konjugats

**[0077]** Männliche Wistar-Ratten (jede ungefähr 250 g) erhielten jede 20  $\mu\text{g}$   $^{125}\text{I}$ -markiertes oder 180  $\mu\text{g}$  unmarkiertes Protein in Lösung in Phosphat gepufferter Salzlösung, welches in eine Schwanzvene injiziert wurde. Danach wurden in Intervallen Blutproben aus der Schwanzarterie genommen, wobei das Plasma durch Heparinisierung und Zentrifugation hergestellt wurde. Die Proben wurden wie oben beschrieben (siehe analytische Verfahren) analysiert, und die Radioaktivität im Gesamtblut wurde als cpm/g Blut berechnet. Die Prozente der injizierten Dosis (%ID) wurde für jede einzelne Ratte berechnet, basierend auf Standards und ausgedrückt als %ID/ml Gesamtblutvolumen. Gruppen von 6 oder 2 Ratten wurden für die Studie von jeweils  $^{125}\text{I}$ -markiertem oder unmarkiertem Protein verwendet.

**[0078]** Die Daten wurden mit der WinNonlin-Software analysiert, um die angegebenen pharmakokinetischen Werte zu bestimmen. Ein Zwei-Kompartiment-Modell wurde für diese Analyse verwendet, wenn es nicht anders angegeben ist.

#### Ergebnisse

##### Charakterisierung des Konjugats

**[0079]** Es ist bekannt, dass, obwohl Serumalbumin einen Cysteinylrest aufweist, der nicht an einer Disulfidbindung beteiligt ist (Rest 34 in der reifen humanen Albuminsequenz), viele der Moleküle in einer Albuminherstellung kein freies Cysteinylthiol aufgrund der Bildung von gemischten Disulfiden mit Molekülen, wie Glutathion oder freiem Cystein, besitzen [Peters, ibid 1985]. Folglich zeigte eine Analyse der Rattenalbumin-Lösung vor der Reduktion, dass dort 0,15 Mol Thiol pro Mol Albumin vorlagen, d. h. nur 15% der Albuminmoleküle besaßen ein freies Thiol. Nach der Reduktion stieg dies auf 0,95 Mol Thiol pro Mol Albumin an, was mit der Anwesenheit einer freien Thiolgruppe in 95% der Albuminmoleküle übereinstimmt, höchstwahrscheinlich an Position 34 in der reifen Albuminsequenz, da eine Reduktion unter Bedingungen, wie jenen, die hier verwendet wurden, keine der an anderer Stelle im Moleküle anwesenden Disulfide zerstört [Peters, ibid 1985]. Eine nachfolgende Reaktion an diesem Cysteinylrest erlaubte eine Bindung eines anderen Moleküls an einer spezifischen Stelle und in einem molaren Verhältnis von 1:1, ohne begleitende Herstellung anderer Produkte in einem höheren Verhältnis von Albumin:anderem Molekül, welches nachfolgend entfernt werden müsste. Die Koordinaten für die Kristallstruktur des humanen Serumalbumins wurden in der Brookhaven Datenbank hinterlegt (als Eintrag 1AO6, von S. Suigo, S. Mochizuki und A. Kashima). Eine Überprüfung dieses Modells zeigt, dass der freie Cysteinylrest an Position 34 in einer Vertiefung zwischen zwei Helices liegt, aber es geht daraus nicht eindeutig hervor, wie lang ein Spacer-Arm an einem Vernetzungsmittel sein sollte, um wirksam zu arbeiten. Die Abwesenheit eines Albumin-Homodimers würde vorteilhaft in einem Herstellungsverfahren sein, da die Ausbeute an Heterodimer dann größer sein würde, und es gäbe dann auch keinen Bedarf für einen zusätzlichen Schritt, um das Homodimer zu entfernen. Es wurde gefunden, dass das Vernetzungsmittel, welches in dem vorliegenden Beispiel verwendet wurde, dieses vorteilhafte Ergebnis hervorbrachte. Eine Reaktion des reduzierten Albumins mit einem 20-fach molaren Überschuss an BMH verursachte eine Derivatisierung von 80% dieser Albuminmoleküle. Albumin-Homodimere wurden während der Albumin-Derivatisierung (oder der nachfolgenden Reaktion mit anderen Proteinmolekülen) nicht gebildet. Der Spacer-Arm des Vernetzungsmittels mit einer Länge von 16,1 Å war lang genug, um vom Cysteinylthiol an Position 34 bis zur Oberfläche des Albuminmoleküls zu reichen, wo er in der Lage war, mit dem freien Thiol auf einem Fab'-Molekül zu reagieren. Er war nicht lang genug, um die entsprechende Vertiefung auf einem zweiten Albumin zu durchdringen, um dort das freie Thiol zu erreichen, und so wurde die Herstellung von Homodimeren verhindert.

**[0080]** Das derivatisierte Albumin und das Fab' wurden in dem molaren Verhältnis 1:1,4:Albumin:Fab' gemischt. Die SDS-PAGE-Analyse der Produkte am Ende der Reaktion wiesen eine Ausbeute an Albumin-Fab'-Konjugat in einer Größenordnung von 20 bis 30% auf, obwohl erwartet werden würde, dass dies durch eine Optimierung der Reaktionsbedingungen verbessert werden kann. Das Konjugat wurde aus dem Reaktionsgemisch durch eine Affinitätschromatographie gereinigt, wobei das Konjugat überraschenderweise nicht an die Matrix band, wie es Fab' tat, sondern geringfügig später als Albumin eluierte, welches überhaupt nicht band. Nach dem Entfernen von nicht umgesetztem Fab' wurde das Albumin von dem Konjugat durch Größenausschluss getrennt. Die endgültige Herstellung des Konjugats wurde durch eine SDS-PAGE ([Fig. 1](#)) analysiert, welche (durch sichtbare Molekulargewichte) die Verbindung von einem Fab' pro Albuminmolekül zeigte. Auf einer nicht reduzierten SDS-PAGE war die Hauptbande ein Konjugat aus 1 RSA mit 1 Fab'-Molekül, wie durch eine N-terminale Sequenzierung des Proteins in der Bande bestimmt wurde. Ungefähr 37% des Konjugats war als eine Bande mit höherem Molekulargewicht anwesend, die ebenfalls ein RSA:Fab'-Verhältnis von 1:1 aufwies. Es wurde angenommen, dass dies Dimermaterial ist, analog zu dem beobachteten Auftreten von Albuminpolymeren in unbehandelten Herstellungen von Albumin. Geringere Mengen (ungefähr 2% des Gesamtmaterials) des Konjugats, welchem die L-Kette fehlte, und ein mögliches kleines Derivat des Konjugats (ungefähr 4% des Gesamten) waren ebenfalls anwesend. Eine N-terminale Proteinsequenz-Analyse der Hauptbande auf der reduzierenden SDS-PAGE zeigte, dass es sich um RSA-Fd (d. h. die Fab'-H-Kette) handelte, sodass die Verbindung spezifisch über das Fab'-Fd und nicht über die L-Kette stattfand. So wurde die 1:1 Stöchiometrie der Konjugation bestätigt.

**[0081]** Die Konjugation von Fab' an Cystein (um das Kontrollmolekül Fab'-cys herzustellen) ergab eine gute Ausbeute – nahezu das gesamte Fab'-Derivat reagierte mit Cystein, nur mit Spuren von  $F(ab')_2$ -ähnlichem Material mit mehr als ungefähr 55 kDa (sichtbar) auf einer nicht reduzierenden SDS-PAGE. Diese Materialspur eluierte kurz nach dem Fab'-cys-Produkt, welches bei einer Natriumchloridkonzentration von ungefähr 75 mM auf einer Mono-S-Chromatographie eluierte, und wurde von ihm ausgeschlossen.

**[0082]** Die Möglichkeit, das Konjugat in einem ELISA zu untersuchen, welcher abhängig von der Konjugatbindung an TNF zeigte, dass das Konjugat die Fähigkeit behielt, TNF zu binden. Dies wurde durch eine Analyse der Konjugatbindung an TNF durch eine Oberflächen-Plasmon-Resonanz bestätigt, unter Verwendung des BIACORE 2000 (Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten und Gleichgewichtskonstante – siehe Tabelle 1). Dies zeigte, dass das anti-TNF-Fab' durch eine Konjugation an Albumin nicht beeinflusst wurde. Dies wurde ebenfalls durch seine gleiche Leistungsfähigkeit zur Neutralisation von TNF bestätigt: in einem Assay des durch TNF verursachten L929-Zelltods betrug die Konzentration des Proteins, um 90% der TNF-Aktivität (die IC<sub>90</sub>) zu inhibieren, für das Albumin-Anti-TNF-Fab'-Konjugat 14,7 pM, verglichen mit 18,0 pM für anti-TNF-Fab'-Cystein-Konjugat, 10,9 pM für anti-TNF- $F(ab')_2$  und 11,3 pM für anti-TNF-IgG4. Die Aufrechterhaltung der Fab'-Bindungsaktivität wurde der beabsichtigten Orientierung der Fab'-Bindungsdomäne weg vom Punkt der Konjugation an das Albuminmolekül zugesprochen, was durch Ausrichten der Fab'-Gelenkregion als Bindungspunkt an den anderen Rest erreicht wurde.

**[0083]** Die Kontrolle Fab'-cys behielt ebenfalls ihre Fähigkeit bei, TNF zu binden und zu neutralisieren, wie durch ihren Nachweis durch einen ELISA und ihre Aktivität in dem L929-Assay gesehen wird.

#### Pharmakokinetische Analyse des Konjugats in Rattenplasma

**[0084]** <sup>125</sup>I-markiertes RSA-, Fab'-,  $F(ab')_2$ - und RSA-Fab'-Konjugat wurden in Plasma, welches zu verschiedenen Zeiten über 144 h gesammelt wurde, überwacht ([Fig. 2](#)). Die beobachtete  $\beta$ -Phasen-Halbwertszeit von Albumin war in Übereinstimmung mit dem Literaturwert von ungefähr 2 Tagen [Peters, *ibid* 1985]. Die  $\beta$ -Phasen-Halbwertszeit des  $F(ab')_2$  und des Fab' war ähnlich zu der zuvor beschriebenen von  $F(ab')_2$  [z. B. Kitamura et al., *ibid*, Chapman et al., *ibid*], und ihr ging eine schnelle Entfernung in der  $\alpha$ -Phase voraus, welche typisch für solche Moleküle ist. Wenn das Fab' jedoch an RSA konjugiert war, blieb es im Kreislauf der Ratte bis zu einem Grad, der vergleichbar zum Rattenalbumin ist. Aufgrund einer Reduktion der Entfernung während sowohl der  $\alpha$ - als auch der  $\beta$ -Phasen, zeigte das Konjugat eine 35-fach größere Fläche unter der Plasma-Konzentrationskurve (AUC, 0- $\infty$ ), als es die Fab'-cys-Kontrolle tat, ähnlich zu der von Albumin alleine. Um sicherzustellen, dass die nachgewiesene Radioaktivität in den Plasmaproben das verbleibende Konjugat widerspiegelte, wurden die Proben von einer Ratte, der markiertes Konjugat gegeben wurde, auf einer SDS-PAGE laufen gelassen und mit einem Phosphorimager (Daten nicht gezeigt) gescannt. Dies zeigte das Verbleiben von intaktem markiertem Konjugat in vivo für mindestens 120 h, und es wurde berechnet, dass die  $\beta$ -Phasen-Halbwertszeit von intaktem Konjugat 32,07 h betrug, in guter Übereinstimmung mit dem entsprechenden Ergebnis aus dem Gesamt-<sup>125</sup>I-Nachweis.

**[0085]** Die Stabilität des Konjugats im Plasma wurde überprüft. Eine Inkubation des unmarkierten Konjugats im Rattenplasma (in vitro) bei 37°C für 68 h in der Anwesenheit oder Abwesenheit einer Vielzahl von Proteaseinhibitoren, überwacht durch eine SDS-PAGE und Westernblotten, zeigte, dass das Konjugat im Rattenplasma stabil war. Konjugat, welches mit <sup>125</sup>I markiert war, wurde in vitro in Phosphat gepufferter Salzlösung (pH-Wert 7) für bis zu 10 Tage inkubiert, und es wurde ebenfalls gefunden, dass es stabil war.

**[0086]** Eine Inkubation des <sup>125</sup>I-markierten Konjugats bei 37°C in Rattenplasma oder -blut in vitro zeigte jedoch, dass das Molekül nicht vollständig stabil war, einige Moleküle erlitten eine Spaltung an oder nahe der Stelle der Verbindung zwischen dem Albumin und dem Fab'-Molekül. Da unmarkiertes Konjugat stabil war, wurde die beobachtete Instabilität der Modifikation des Proteins durch die Anwesenheit von 125I oder durch das Markierungsverfahren zugeschrieben. Trotz einer sichtbaren Instabilität bei diesen Bedingungen, blieb selbst nach 168 h Inkubation in vitro intaktes Material zurück. Die Unversehrtheit des Konjugats in vivo wurde durch eine SDS-PAGE von Plasmaproben, gefolgt von einer Quantifizierung des intakten Konjugats durch ein Phosphorimager-Scanning untersucht, und wie in den in vitro-Experimenten, wurde eine geringe Instabilität von <sup>125</sup>I-markiertem Konjugat beobachtet. Die beobachteten Ergebnisse aus den in vivo-Experimenten konnten entsprechend angepasst werden, um nur die Quantität von intaktem markiertem Konjugat widerzuspiegeln. Die angepassten Daten ergaben das in [Fig. 2](#) gezeigte Ergebnis (siehe Konjugat (Korrektur)), welches war, dass selbst die leicht instabile markierte Version des Konjugats eine AUC aufwies, die 17-fach größer war, als die Fab'-cys-Kontrolle.

**[0087]** Die Schlussfolgerung, dass Daten, die aus der Verwendung von <sup>125</sup>I-markiertem Konjugat abgeleitet wurden, eine Unterbewertung der Langlebigkeit des unmarkierten Konjugats in vivo darstellen, wurde durch ein Experiment unterstützt, in welchem das Konjugat nicht markiert wurde. Unmarkiertes Protein wurde durch zwei Formen des ELISA und durch die biologische Aktivität (TNF-Neutralisation im L929-Assay) überwacht. Die Ergebnisse aus der Verwendung der drei Assays in Proben aus zwei Ratten waren einander ähnlich ([Fig. 3](#)), was zeigt, dass RSA-Fab' in vivo in ausgedehnten Zeiträumen stabil war. Fab'-cys wurde jedoch schnell entfernt, sodass zu wenig Daten durch einen ELISA erhalten wurden, um die Verwendung eines Zwei-Kompartiment-Modells zu erlauben, und die AUC-Abschätzung, die in [Fig. 3](#) angegeben ist, wurde durch die Verwendung eines Ein-Kompartiment-Modells erhalten. Zu wenige Daten wurden durch die Verwendung des Aktivitätsassays erhalten, um überhaupt irgendeine Modellierung zu erlauben. Die AUC des RSA-Fab'-Konjugats war ungefähr 200-fach größer als die der Fab'-cys-Kontrolle.

**[0088]** Es wurde gezeigt, dass es möglich ist, ein IgG-Antikörper-Fab'-Fragment herzustellen, es chemisch mit Albumin in vitro zu vernetzen unter Beibehaltung der vollständigen Bindungsfähigkeit (mit derselben Affinität, wie im vollständigen Antikörper beobachtet) und zu zeigen, dass es eine erheblich längere Halbwertszeit in vivo aufweist, als es unkonjugiertes Fab' tut. Das Konjugat enthielt ein Fab' pro Albuminmolekül. Die  $\beta$ -Phasen-Halbwertszeit des Konjugats in der Ratte betrug ungefähr das Zweifache der des unkonjugierten Fab', was näher an der des unkonjugierten Albumins liegt, und die Fläche unter der Kurve war ungefähr 200-fach größer für das Konjugat, als für das unkonjugierte Fab'. Daher war die Folge der Konjugation von Fab' an Albumin eine erhebliche Verlängerung seiner biologischen Aktivität in vivo, was (in dem vorliegenden Fall) eine verlängerte Anti-Zytokin-Therapie erlaubte.

BEISPIEL 2. Genetische Fusion von scFv an Albumin. (Dieses Beispiel ist nur zur Information angegeben)

#### Verfahren

Konstruktion von Plasmiden, welche scFv-humanes Serumalbumin-Fusionsproteine kodieren.

**[0089]** Das Plasmid pPIC(scFv) enthielt das Gen für einen anti-TNF-scFv, welcher die variablen Domänen in der Reihenfolge V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub> umfasste. Dieses Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen KpnI und NotI gespalten, um ein "Vektor"-DNA-Fragment zu erzeugen, welches einer Agarose-Elektrophorese folgend gereinigt wurde. In dieses wurde ein PvuII-NotI DNA-Fragment, welches das reife HSA-Gen enthielt, zusammen mit einem 200 bp-Linker, welcher eine direkte Fusion im Leserahmen zwischen dem C-Terminus des scFv und dem N-Terminus des HSA kodiert, ligiert. Dieses Verfahren ist in [Fig. 4](#) zusammengefasst. Der Linker oder das Verbindungsfragment führten auch eine einzelne ClaI Restriktionsstelle ein, um die Konstruktion einer weiteren Reihe von Genen zu erleichtern, welche Fusionsproteine kodieren, die verschiedene Spacer enthalten, um die scFv- und HSA-Motive physisch zu trennen. Angelagerte Oligonukleotidkassetten wurden verwendet, um die folgenden Spacer zwischen den KpnI und ClaI Stellen einzuführen:

1. Eine Sequenz, die 3 Wiederholungen der Gly<sub>4</sub>Ser-Sequenz kodiert.
2. Eine Sequenz, die vom flexiblen N-terminalen Ende der humanen IgG1 Gelenkregion abgeleitet wurde.

**[0090]** Zusätzlich wurde ein Gen, welches ein weiteres Fusionsprotein kodiert, erzeugt, in welchem die C-Domäne aus der humanen Ig-Kappa-leichten-Kette als ein Spacer verwendet wurde, um das scFv (dieses Mal in der V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-Orientierung) vom HSA zu trennen. Die Konstruktomenklatur war entsprechend: scFv-HSA, scFv-G4S-HSA, scFv-UHL-HSA, scFv-C<sub>K</sub>-HSA.

#### Expression der Fusionsproteine in Hefe.

**[0091]** Diese Plasmide wurden linearisiert und in kompetente *Pichia pastoris* Zellen transfiziert. Dieses wurde unter Verwendung eines "EasySelect *Pichia* Expression"-Kits (Invitrogen) durch Befolgen der Herstelleranweisungen durchgeführt. Die Transformanten wurden durch eine Resistenz gegen Zeomycin (500 g/ml) selektiert, welches in den YPDS-Agar eingeschlossen war, welcher verwendet wurde, um sie wachsen zu lassen. Die Transformanten wurden als Mut<sup>+</sup> bestätigt, das heißt, sie waren in der Lage, Methanol als einzige Kohlenstoffquelle zu verwenden, obwohl sie sensitiv auf die Anwesenheit von überschüssigem Methanol waren. Zwei Kolonien von jedem der 4 Typen der Transformanten wurden ausgewählt und in einer Schüttelkolben-Kultur in BMGY-Medium nach den Anweisungen des "EasySelect *Pichia* Expression"-Kits angezogen. Jede Kultur betrug 25 ml in einem 25 ml Kolben, inkubiert bei 30°C, Schütteln bei 225 rpm. Nach 16–18 h, wenn die Kulturen gewachsen waren, um eine optische Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) zwischen 2 und 6 zu ergeben, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und in 30–40 ml BMMY-Medium (welches Methanol als Kohlenstoffquelle enthält) resuspendiert, um eine OD<sub>600</sub> von 1 zu ergeben. Die Inkubation wurde anschließend unter Rühren und gelegentlichem Hinzufügen von Methanol, um eine Methanolkonzentration von ungefähr 0,5 Vol.-% aufrecht zu erhalten, fortgesetzt. Nach 84 h Inkubation wurden die Kulturen zentrifugiert, und die Überstände wurden zur Verwendung in der Herstellung von exprimierten und sezernierten Fusionsproteinen zurückbehalten.

#### Reinigung der Fusionsproteine.

**[0092]** Die exprimierten Proteine wurden aus dem Hefe-Kulturmedium nach einer Klärung durch Zentrifugation gereinigt. Das Medium wurde einer Chromatographie auf einer Matrix aus Blau-Sepharose (Pharmacia) unterzogen, welche als eine Affinitätsmatrix für Albumin-enthaltende Proteine wirkt, wie unten folgt. Jeder geklärte Überstand wurde mit einem Volumen von Phosphat gepufferter Salzlösung, pH-Wert 7 gemischt, und der pH-Wert des Gemisches wurde von ungefähr 6,5 auf ungefähr 7 durch das Hinzufügen eines kleinen Volumens Natriumhydroxid-Lösung (2 M) angehoben. Das Gemisch wurde anschließend auf eine 1,5 ml-Säule aus Blau-Sepharose aufgebracht, welche in Phosphat gepufferter Salzlösung, pH-Wert 7 prääquilibriert war. Die Fließgeschwindigkeit in allen Stufen betrug 0,5 ml/min, und die Temperatur betrug 21°C. Der Aufbringung folgend, wurde die Säule mit Phosphat gepufferter Salzlösung gewaschen, bis eine stabile Grundlinie erreicht wurde, und anschließend wurde das gebundene Protein durch das Elutionsmittel Natriumthiocyanat, 0,2 M in Phosphat gepufferter Salzlösung eluiert. Die Elution wurde durch eine Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm überwacht. Das eluierte Protein wurde gesammelt, konzentriert und sein Puffer wurde gegen Phosphat gepufferte Salzlösung durch die Verwendung eines Rührzellkonzentrators (Amicon, welcher eine Cutoff-Filtermembran mit einem nominellen Molekulargewicht von 10 kDa verwendet) ausgetauscht. Das Protein wurde durch die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm und die Verwendung eines theoretischen Absorptionskoeffizienten quantifiziert, welcher für jedes Fusionsprotein durch die Verwendung des Programms ProtParam (auf der Expasy-Webseite zu finden) berechnet.

#### Radioaktives Markieren der Proteine

**[0093]** Fusionsproteine ohne Linker, mit G4S-Linker oder mit oberem Gelenk-Linker und unmodifiziertes humanes Serumalbumin wurden mit <sup>125</sup>I wie in Beispiel 1 oben beschrieben, markiert.

#### Analytische Verfahren

**[0094]** Die Proteine wurden charakterisiert und ihre Pharmakokinetik in Ratten wurde wie in Beispiel 1 beschrieben, analysiert.

#### Ergebnisse

##### Charakterisierung der Fusionsproteine

**[0095]** Alle vier scFv-humanes Serumalbumin-(HSA)-Fusionsproteine wurden von *Pichia pastoris* exprimiert, wobei sie in das Medium mit den folgenden Geschwindigkeiten sezerniert wurden, wie durch die Absorption bei 280 nm der durch die Chromatographie hergestellten Proteinlösungen bestimmt wurde (Mittelwert aus 2

Experimenten): scFv-HSA (kein Linker), 9,0 µg/ml, scFv-G4S-HSA, 8,5 µg/ml, scFv-UHL-HSA, 7,5 µg/ml, scFv-C<sub>K</sub>-Linker, 7,8 µg/ml. Die entsprechenden Banden der exprimierten Proteine konnten auf einer SDS-PAGE von unfraktioniertem Hefe-Kulturmedium beobachtet werden (z. B. [Fig. 5](#)). Es wurde keine Entwicklung zum Zweck des Verbesserns der Expressionsmengen unternommen. Diese Daten legen nahe, dass die Reihenfolge der variablen Domänen in dem scFv-Abschnitt die Expressionsmengen des Fusionsproteins nicht erheblich beeinflusst.

**[0096]** Eine reduzierende SDS-PAGE ([Fig. 5](#)) von hergestellten Fusionsproteinen nach nur einer Blau-Sepharose-Chromatographie zeigte, dass jedes eine Hauptbande und eine Nebenbande enthielt, wobei die Hauptart 91% des gesamten Proteins in der scFv-HSA-Herstellung, 75% in der scFv-G4S-HSA-Herstellung, 80% in der scFv-UHL-HSA- und 83% in der scFv-C<sub>K</sub>-HSA-Herstellung ausmachte, wie durch Scannen von Brilliant Blue G-gefärbten Gelen abgeschätzt wurde. Die Hauptbande in der jeder Herstellung wies ein sichtbares Molekulargewicht auf, welches dem theoretischen Molekulargewicht glich, das aus der translatierten DNA-Sequenz berechnet wurde. Die Nebenbande wanderte in jeder mit dem Standard-humanen Serumalbumin auf demselben Gel, was auf geringere(s) Spaltungsereignis(s) an der Sequenz zwischen der Albumin- und der scFv- oder scFv-Gelenk-/Spacer-Sequenz hinweist. Die N-terminale Sequenzierung dieses Nebenprodukts in der scFv-G4S-HSA-Präparation zeigte, dass es in der Tat den N-Terminus des reifen HSA aufwies. Die N-terminale Sequenzanalyse der Fusionsproteine zeigte, dass sie den erwarteten scFv-N-Terminus aufwiesen, welchem in jedem Fall die Sequenz EAEA voranstand, welche in das Fusionsprotein eingeschlossen wurde, um mögliche(s) Problem(e) der sterischen Behinderung zu verringern, welche die Spaltung der Prosequenz unwirksam macht (wie von Sreerikrishna, K. et al. (1997) *Gene*, 190, 55–62 diskutiert). Diese EAEA-Spacersequenz wurde jedoch nachfolgend nicht durch eine Hefe-Diaminopeptidase-Aktivität entfernt. Dennoch inhibierte diese N-terminale EAEA-Erweiterung die Expression und Sekretion der heterologen Proteine nicht offenkundig. Es ist wahrscheinlich, dass die EAEA-Sequenz aus dem Fusionsprotein deletiert werden könnte, um ein Protein mit authentischem scFv-(oder anderem)N-Terminus zu erzeugen.

**[0097]** Es wurde gezeigt, dass die Blau-Sepharose-Chromatographie in einem einzigen Schritt wirksam in der Reinigung der Albumin-enthaltenden Proteine war. Diese Proteine schlossen Nebenprodukte der Proteolyse in den vorliegenden Fällen ein, aber es wurden hier keine Optimierungen vorgenommen. Daher würde erwartet werden, dass die Proteolyse durch Hilfsmittel wie die Optimierung der Kulturbedingungen, dem Einschluss von Proteaseinhibitoren und/oder der Expression in Protease defizienten Stämmen der Hefe (zum Beispiel wie von Gleeson, M. A. G. et al. in "Pichia Protocols" [Hrsg. Higgins, D. R. und Cregg, J. M.], veröff. Humana Press, Totowa, New Jersey (1998), S. 81–94 beschrieben wird) reduziert wird. Hinsichtlich industrieller Verfahren sind die Kosten der Blau-Sepharose sehr niedrig, sicherlich wesentlich niedriger, als irgendeine andere kommerziell verfügbare Affinitätsmatrix. Daher ist die Verwendung von Albumin als Teil eines Fusionsproteins doppelt vorteilhaft, da es dem Protein nicht nur solche Eigenschaften, wie eine lange Serum-Halbwertszeit (siehe Beispiel 1 oder unten), sondern auch eine schnelle, kostengünstige Reinigung verleihen kann. Die Fähigkeit der Fusionsproteine, einen Liganden zu binden, wurde durch die Biacore-Analyse bestätigt. Diese zeigte, dass die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten und  $K_D$  der 4 Typen des Fusionsproteins einander und anderen Formen des anti-TNF-Antikörpers ähnlich waren, einschließlich vollständigem IgG (Tabelle 1).

#### Pharmakokinetische Analyse der Fusionsproteine in Rattenplasma

**[0098]** Die Fusionsproteine scFv-HSA, scFv-G4S-HSA und scFv-UHL-HSA wurden <sup>125</sup>I-markiert, wie auch HSA alleine. Der geringere Bestandteil des Albumins, welcher in jeder der Fusionsprotein-Herstellungen anwesend war, wurde ebenfalls markiert. Die Analysen der Verteilung der Markierung in dem Fusionsprotein und den Albuminbestandteilen der Herstellungen durch zwei Verfahren der Autoradiographie und durch Phosphorimaging ergaben ähnliche Ergebnisse. Der Mittelwert der zwei Verfahren betrug: für scFv-HSA, 76% der Markierung lagen im Fusionsprotein vor, für scFv-G4S-HSA, 80% der Markierung lagen im Fusionsprotein vor, für scFv-UHL-HSA, 40% der Markierung lagen im Fusionsprotein vor. Die übrige Markierung wurde vom Albuminbestandteil jeder Herstellung aufgenommen.

**[0099]** Diese Proteine wurden in Ratten (n = 6) injiziert. Plasmaproben wurden in Intervallen für eine Analyse durch Gammazählung und durch eine SDS-PAGE, gefolgt von einem Phosphorimaging, genommen. Die Verteilung der Markierung in den verschiedenen Proben wurde während der ersten 48 h durch Phosphorimaging der Proben aus einer Ratte pro Gruppe bestimmt (Wiederholungsanzahl, n = 2 oder 4). In jedem Fall wurde gefunden, dass keine eindeutige Änderung in der Verteilung der Markierung während des 48 h-Zeitraums vorlag (Daten nicht gezeigt). Daher waren die Fusionsproteine nicht anfällig für einen erheblichen Abbau in vivo. Es wurde angenommen, dass diese Stabilität für die gesamte Dauer des Experiments beibehalten wurde, welche 144 h betrug, und die pharmakokinetische Analyse der Proteine basierte auf den Ergebnissen der Gam-

mazählung. Die Pharmakokinetik war für alle Proteine ähnlich (siehe [Fig. 6](#)), wodurch gezeigt wird, dass sich die Fusionsproteine ähnlich wie unmodifiziertes humanes Albumin im Plasma in vivo verhielten. Es sei angemerkt, dass HSA in Ratten nur halb (oder weniger) so beständig wie das homologe Rattenalbumin ist, und für eine Fusion von scFv mit HSA würde nicht nötigerweise erwartet werden, dass sie eine Halbwertszeit ergibt, die irgendwie länger als jene von HSA selber ist. Dennoch sind die AUC für die <sup>125</sup>I-Fusionsproteine ungefähr 13-mal größer als jene für die <sup>125</sup>I-Fab'-cys-Kontrolle (gezeigt in [Fig. 2](#)).

**[0100]** Dieses Beispiel zeigt, dass Serumalbumin an andere(s) Protein(e) fusioniert werden kann, um eine Fusion zu erzeugen, welche Funktion(en) der (des) anderen Proteins(e) zusammen mit der langen Halbwertszeit des Albumins besitzt. Da die Fusion keine Albumin-Cysteinylthiole beteiligt, bleibt weiterhin die Möglichkeit, ein Fusionsprotein als Akzeptor für ein oder mehrere Fab'-Molekül(e) zu verwenden, welche(s) durch chemische Hilfsmittel verbunden werden (wird), wie beispielhaft durch die Beispiele 1 und 3 dargestellt wird. Polyspezifische, sowie polyvalente Moleküle könnten auf diese Weisen erzeugt werden.

### Beispiel 3.

#### Fab'-Dimer-Albumin-Konjugat

#### Verfahren

#### Herstellung des Dimers des Anti-Zelloberflächenmarker-Fab'.

**[0101]** Der Anti-Zelloberflächenmarker wurde gentechnisch als ein Fab' hergestellt. Er wurde in E. coli exprimiert und wurde aus dem Periplasma extrahiert, wie es in der internationalen Patentspezifikation Nr. WO 98/25971 beschrieben wird.

**[0102]** Die Fab'-Zwischenketten-Disulfidbindung wurde wie folgt reduziert: 12 ml Fab' bei 20,93 mg/ml in 0,1 M Natriumphosphat, pH-Wert 6,0, 2 mM EDTA wurden mit 240 µl 250 mM 2-Mercaptoethylamin im selben Puffer gemischt und für 50 min bei 38°C inkubiert. Eine Diafiltration der Probe gegen denselben Puffer entfernte das Reduzierungsmittel. Die Ausbeute des Fab' in dieser Stufe betrug 85,1%. Ein Thiolassay zeigte, dass ein Durchschnitt von 0,83 freien Thiolen pro Fab'-Molekül vorlag, und eine Analyse durch eine GF250 Größenausschluss-Chromatographie zeigte, dass das Protein 93,1 Fab'-Monomer und 6,9% Disulfid-gebundenes F(ab')<sub>2</sub> umfasste.

**[0103]** Das Vernetzungsmittel war eine Trimaleimidverbindung, die in [Fig. 7](#) dargestellt ist. Dieses Molekül enthielt auch eine Metall-chelatbildende Funktion. Eine 1 mg/ml Lösung dieser Verbindung wurde in 0,1 M Natriumphosphat, pH-Wert 6,0, 2 mM EDTA hergestellt, und 5 Aliquots von jeweils 434,8 µl wurden unter Mischen in 5 min Intervallen zu der oben reduzierten Fab'-Herstellung hinzugefügt. Dies stellte ein molares Verhältnis von Vernetzungsmittel:Fab': 1:2,56 bereit. Das Gemisch wurde bei 21°C für 3 h inkubiert, wobei zu diesem Zeitpunkt 25 µl Eisessig hinzugefügt wurden, um den pH-Wert auf 4,5 zu senken. 47 ml Wasser hinzugefügt, um die Leitfähigkeit zu senken, und das Gemisch wurde durch eine Ionenaustausch-Chromatographie getrennt. Die Proteine wurden auf eine 2,6 cm Innendurchmesser × 15,5 cm Säule (Pharmacia), welche Methylsulfonat-Kationenaustauscher (SP-Sepharose HP) enthielt, mit einer Fließgeschwindigkeit von 10,5 ml/min aufgebracht und durch einen Gradienten von 0 bis 250 mM Natriumchlorid in 50 mM Acetat, pH-Wert 4,5 eluiert. Die Elution wurde durch Absorption bei 280 nm überwacht. Die verschiedenen Reaktionsprodukte (Monomer, Dimer und Trimer) wurden durch eine SDS-PAGE und durch eine GF250-Größenausschluss-Chromatographie identifiziert. Nur die Fraktion, welche Fab'-Dimer enthielt, wurde für die nachfolgende Konjugation an Albumin verwendet.

#### Verbindung des Fab'-Dimers an Ratten-Serumalbumin.

**[0104]** 33,71 mg RSA wurden in 2,5 ml 0,1 M Natriumphosphat, pH-Wert 6,0, 2 mM EDTA gelöst und mit 25 µl 200 mM 2-Mercaptoethylamin im selben Puffer gemischt, was eine Reduktionsmittel-Endkonzentration von 2 mM ergab. Das Gemisch wurde bei 37°C für 1 h inkubiert. Das Reduzierungsmittel wurde anschließend durch eine Größenausschluss-Chromatographie auf Sephadex G25M entfernt, unter Verwendung einer PD10-Säule (Pharmacia, Code Nr. 17-0851-01, nach den Herstelleranweisungen verwendet). Der Puffer war anschließend Natriumphosphat, 0,1 M, pH-Wert 6, 2 mM EDTA. Die Konzentration des Albumins betrug 143 µM.

**[0105]** Das reduzierte Albumin wurde mit konjugiertem Fab'-Dimer in einem molaren Verhältnis von 1:1 inku-

biert und bei 21°C für 24 h inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde durch eine Chromatographie auf Gamma-bind plus, wie in Beispiel 1 (oben) beschrieben, unter Verwendung einer Säule mit 3 ml Volumen getrennt. Nicht umgesetztes Albumin versagte an diese Matrix zu binden. Gebundenes Material wurde durch einen Puffer aus 0,5 M Essigsäure, pH-Wert 3 eluiert. Die eluierten Fraktionen wurden umgehend durch das Hinzufügen von Trizma, 2 M, pH-Wert 8,8 neutralisiert. Dieses Material wurde weiterhin durch eine Blau-Sepharose-Chromatographie, wie in Beispiel 2 beschrieben, gereinigt. Nicht umgesetztes Fab'-Dimer versagte, an die Matrix zu binden, und gebundenes Material wurde mit Natriumthiocyanat, 0,2 M in Phosphat gepufferter Salzlösung eluiert. Die eluierten Fraktionen wurden konzentriert, und der Puffer wurde gegen Phosphat gepufferte Salzlösung in einer Rührzelle (Amicon) mit einem Cutoff-Filter mit 10 kDa nominellem Molekulargewicht ausgetauscht. Jeder Chromatographietyp wurde wiederholt, um das Albumin-Fab'-Dimer-Konjugat vollständig zu reinigen,

#### Analytische Verfahren.

**[0106]** Die Verfahren waren wie in den Beispielen 1 und 2 beschrieben, außer dass für die N-terminale Proteinsequenz-Bestimmung das automatische Sequenziergerät, welches verwendet wurde, ein PE Biosystems Procise 492 war. Zusätzlich wurden die Ligandenbindungseigenschaften des Konjugats durch eine Scatchard-Analyse seiner Bindung an ganze Zellen bestimmt, wie unten folgt.

**[0107]** Das Konjugat und ein Kontrollprotein (ein Dimer aus Fab', welches über Thiole durch bis-Maleimido-hexan vernetzt ist) wurden durch Bindung von Fluoreszein markiert. Dieses wurde durch Inkubation von einem mg Protein in 1 ml 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> mit 100 µg Fluoreszeinisothiocyanat (Sigma F7250) durchgeführt, welches als 10 µl Lösung in Dimethylsulfoxid hinzugefügt wurde. Die Reaktion fand für 2 h bei 21°C statt. Die Reaktion wurde durch das Hinzufügen eines molaren Überschusses Lysin abgestoppt. Markiertes Protein wurde von freiem Fluoreszein durch eine Größenausschluss-Chromatographie getrennt. Der Fluoreszeinmarkierte Antikörper wurde in Phosphat gepufferter Salzlösung gesammelt und der Proteinbestandteil durch Absorption bei 280 nm quantifiziert, während das Ausmaß der Substitution aus der Absorption bei 495 nm abgeschätzt wurde. Der für DFM verwendete µM-Extinktionskoeffizient betrug 0,14, für RSA-(Fab')<sub>2</sub> 0,2 und für Fluoreszein 0,077. Das Fluoreszein-markierte Kontrollprotein wies ein molares Verhältnis von Fluoreszein: Protein von 1,59 auf, und das Fluoreszeinmarkierte RSA-(Fab')<sub>2</sub> wies 3,08 Fluoreszeinmoleküle pro Proteinmolekül auf.

**[0108]** Die fluoreszenten Proteinkonjugate wurden anschließend seriell aus einer höchsten Konzentration von 2 µg/ml in Phosphat gepufferter Salzlösung, welche 5 Vol.-% fötales Kälberserum enthielt verdünnt (1:1,4). Das Endvolumen pro Röhrchen betrug 250 µl. Vierzigtausend Zielzellen wurden in 100 µl pro Röhrchen hinzugefügt, um ein Endvolumen von 350 µl und eine höchste Antikörper-Endkonzentration von 1,43 µg/ml zu ergeben. Die Zellen wurden mit Antikörper bei 4°C für 3 h inkubiert. Eine Fluoreszenz aktivierte Zellsortierungs-(FACS)-Analyse wurde anschließend mit den Zellen durchgeführt. Das Fluoreszenzsignal wurde in Moleküle mit äquivalentem löslichen Fluoreszein aus einer Standardkurve von fluoreszenten Kügelchen umgewandelt, gemäß dem Verfahren von Krause et al. ((1990) Determination of Affinities of Murine and Chimeric Anti-α/β-T Cell Receptor Antibodies by Flow Cytometry. Behring Inst. Mitt. 87, 56–67). Die Anzahl der Fluoreszeinmoleküle, die pro Zelle gebunden wurden, wurde in die Anzahl der Antikörpermoleküle, die pro Zelle gebunden wurden, durch das Fluoreszein:Protein-Verhältnis umgewandelt. Eine Subtraktion von der Gesamtzahl der Antikörpermoleküle pro Röhrchen ergab die Anzahl der freien Moleküle pro Röhrchen. Eine Scatchard-Analyse wurde mit diesen Daten durchgeführt.

#### Ergebnisse.

**[0109]** In den verwendeten, nicht optimierten Bedingungen betrug die Ausbeuten der Produkte aus der chemischen Vernetzungsreaktion: Fab'-Trimer, 30,6%, Fab'-Dimer, 30,7%, Fab'-Monomer, 38,7%.

**[0110]** Dieses Dimer wurde in den nachfolgenden Reaktionen mit Albumin verwendet. Durch die Vernetzung mit einem tri-funktionellen Mittel hergestellt, besaß das Dimer eine funktionelle Gruppe, welche auf dem Verbindungsrest zurückblieb. Dieses war ein Maleimid, welches in der Lage war, mit einem freien Thiol zu reagieren. Ein freies Thiol wurde im Rattenalbumin durch Reduktion durch ein Verfahren erzeugt, welches unterschiedlich zu dem in Beispiel 1 verwendeten war. Ein Assay der Thiole in der auf diese Weise reduzierten Albuminherstellung zeigte, dass dort dann ein Durchschnitt von 0,97 freien Thiolen pro Molekül vorlag. Daher kann ein einzelnes Thiol in Albumin durch mehr als ein Verfahren erzeugt werden.

**[0111]** Eine Inkubation des hergestellten Fab'-Dimers mit dem reduzierten RSA ergab eine Ausbeute von 1 mg Albumin-Fab'-Dimer-Konjugat nach vollständiger Reinigung, wie durch Absorption bei 280 nm unter Verwendung eines theoretischen Absorptionskoeffizienten abgeschätzt wurde, der durch das Programm ProtPa-

ram (ExPasy) berechnet wurde.

**[0112]** Eine SDS-PAGE (reduziert) des Produkts zeigte die Anwesenheit von zwei Banden mit sichtbarem Molekulargewicht von ungefähr 150 kDa und ungefähr 31 kDa (Fig. 8). Eine N-terminale Sequenzierung zeigte, dass diese jeweils Albumin-Fab'-schwere-Ketten-Dimer und Fab'-leichte-Kette darstellten. Die nicht reduzierte SDS-PAGE zeigte eine Hauptbande mit sichtbarem Molekulargewicht von ungefähr 200 kDa. Eine N-terminale Proteinsequenzierung zeigte, dass diese Bande Albumin-Fab'(d. h. schwere und leichte Ketten)-Dimer darstellte. Dass das Produkt der Vereinigung von RSA und Fab'-Dimer aus einem Albuminmolekül und zwei Fab'-Molekülen bestand, wurde durch eine N-terminale Sequenzierung des unfraktionierten Endprodukts ebenfalls bestätigt. Dies zeigte ebenfalls, dass keine Fab'-leichte-Kette während der Herstellung dissoziierte, und dass die kovalente Verbindung zwischen Fab' und Albumin nur über die Fab'-schwere-Kette stattfand.

**[0113]** Die Ligandenbindungsaktivität wurde von dem Konjugat beibehalten, wie durch eine FACS-Analyse seiner Bindung an Zellen, die einen Liganden auf ihrer Oberfläche tragen, gezeigt wurde. Eine Scatchard-Analyse der Bindung ergab eine 2-Phasen-Kurve, mit einem  $K_D$  von 8 nM für die Bindung von einem der zwei Fab's und 3 nM für die Bindung von beiden Fab's in dem Konstrukt (Fig. 9). Diese Werte waren ähnlich zu jenen einer Kontrolle (Fab' dimerisiert durch Vernetzen mit bis-Maleimidohexan, d. h. welchem der Albuminrest fehlte), welche jeweils 12 nM und 3 nM betrug. Wie in den anderen zwei Beispielen ergab sich die Aufrechterhaltung der vollständigen Bindungsaktivität des Fab' trotz der Bindung eines Rests mit großem Molekulargewicht wahrscheinlich aufgrund der Ausrichtung des Fab'-Gelenks als dem Bindungspunkt, welcher am entgegengesetzten Ende des Moleküls von der Antigen-Bindungsfunktion lag. In dem vorliegenden Beispiel interferierte das Albumin mit keinem Fab', an welches es gebunden war.

**[0114]** Daher stellte dieses Verfahren ein sehr spezifisches bivalentes Produkt her. Im Gegensatz zu Beispiel 1 wurde dies eher durch eine Modifikation des Immunglobulinrestes, als des Albumins vor der Endstufe der Konjugation erreicht. Wiederum im Gegensatz zu den anderen Beispielen wurde ein anderes Immunglobulin verwendet, was den allgemeinen Nutzen des Ansatzes beispielhaft darstellt. Durch Verwenden solcher Ansätze würde eine Verbindung von Albumin mit anderen polyspezifischen Immunglobulinen eindeutig polyspezifische Moleküle mit verlängerter Halbwertszeit in vivo erzeugen.

**[0115]** Die vorliegenden Ergebnisse stellen auch beispielhaft den Einschluss einer zusätzlichen Funktion in das Konjugat dar. Das vorliegende Beispiel stellt den Einschluss einer Metall-chelatbildenden Funktion dar, wie sie für einen Assay, die Diagnose oder Therapie geeignet sein könnte. Die chelatbildende Funktion in diesem Beispiel liegt auf dem Verbindungsrest und stellt einen Makrozyklus dar, für welchen kürzlich gefunden wurde, dass er Metalle stark bindet, vor allem Indium, aber möglicherweise alternativ Kupfer, Gadolinium, Eisen III, Kobalt III, Chrom III, Nickel oder Aluminium.

#### TABELLE 1.

Oberflächen-Plasmon-Resonanzanalyse der Bindung des Liganden an Konjugat, Fusionen und andere Immunglobuline.

**[0116]** Alle Immunglobuline und Derivate wurden von demselben anti-TNF-Antikörper abgeleitet, und TNF wurde als Ligand verwendet. Siehe Fig. 10 für die Analyse der Bindung von RSA-F(ab')<sub>2</sub>.

Tabelle 1. Oberflächen-Plasmon-Resonanzanalyse der Bindung des Liganden an Konjugat, Fusionen und andere Immunglobuline

	$k_a, 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_d, 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$K_D, 10^{-10} \text{ M}$
IgG	3,63	1,41	3,88
Fab'	2,79	0,56	2,01
RSA-Fab'-Konjugat	3,88	1,65	4,25
scFv-HSA	7,67	1,11	1,45
scFv-G4S-HSA	6,58	1,32	2,29
scFv-UHL-HSA	6,64	1,52	2,29
scFv-C <sub>K</sub> -HSA	7,09	0,95	1,34

**Patentansprüche**

1. Hybridprotein, umfassend ein Antigen-bindendes Antikörperfragment, welches kovalent an ein Albuminmolekül oder ein Fragment davon gebunden ist, wobei das Antikörperfragment und Albumin indirekt durch ein Brückenmolekül zwischen den Thiolgruppen eines in dem Antikörper vorliegenden und eines weiteren im Albumin an Position 34 vorliegenden Cysteinreste verbunden sind, wobei das Brückenmolekül eine Länge von 10 Å bis 20 Å aufweist.
2. Hybridprotein nach Anspruch 1, wobei das Brückenmolekül eine Hexylenkette mit dem Rest eines Maleimids an jedem Ende ist.
3. Hybridprotein nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Antikörperfragment ein einwertiges Fab-Fragment ist, welches gegebenenfalls eine oder mehrere an den C-Terminus der CH1-Domäne gebundene zusätzliche Aminosäure(n) enthält.
4. Hybridprotein nach Anspruch 3, wobei das Antikörperfragment ein einwertiges Fab- oder Fab'-Fragment ist.
5. Hybridprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 4, welches an eine oder mehrere Effektor- oder Reportergruppe(n) gebunden ist.
6. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein Hybridprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 5, zusammen mit einem oder mehreren pharmazeutisch verträglichen Bindemittel(n), Verdünnungsmitteln) oder Träger(n).

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

**FIG. 1** SDS-PAGE von RSA-FAB'-Konjugat

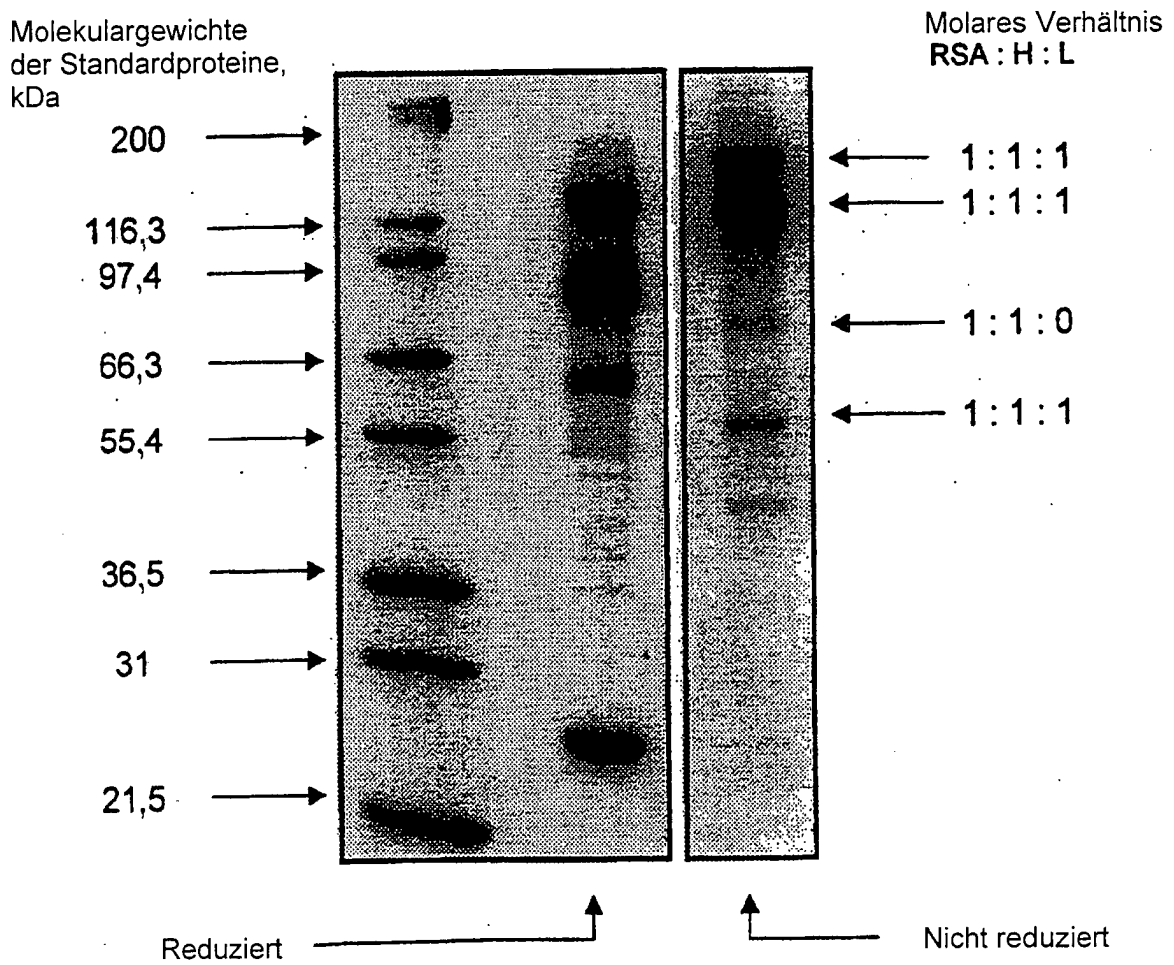
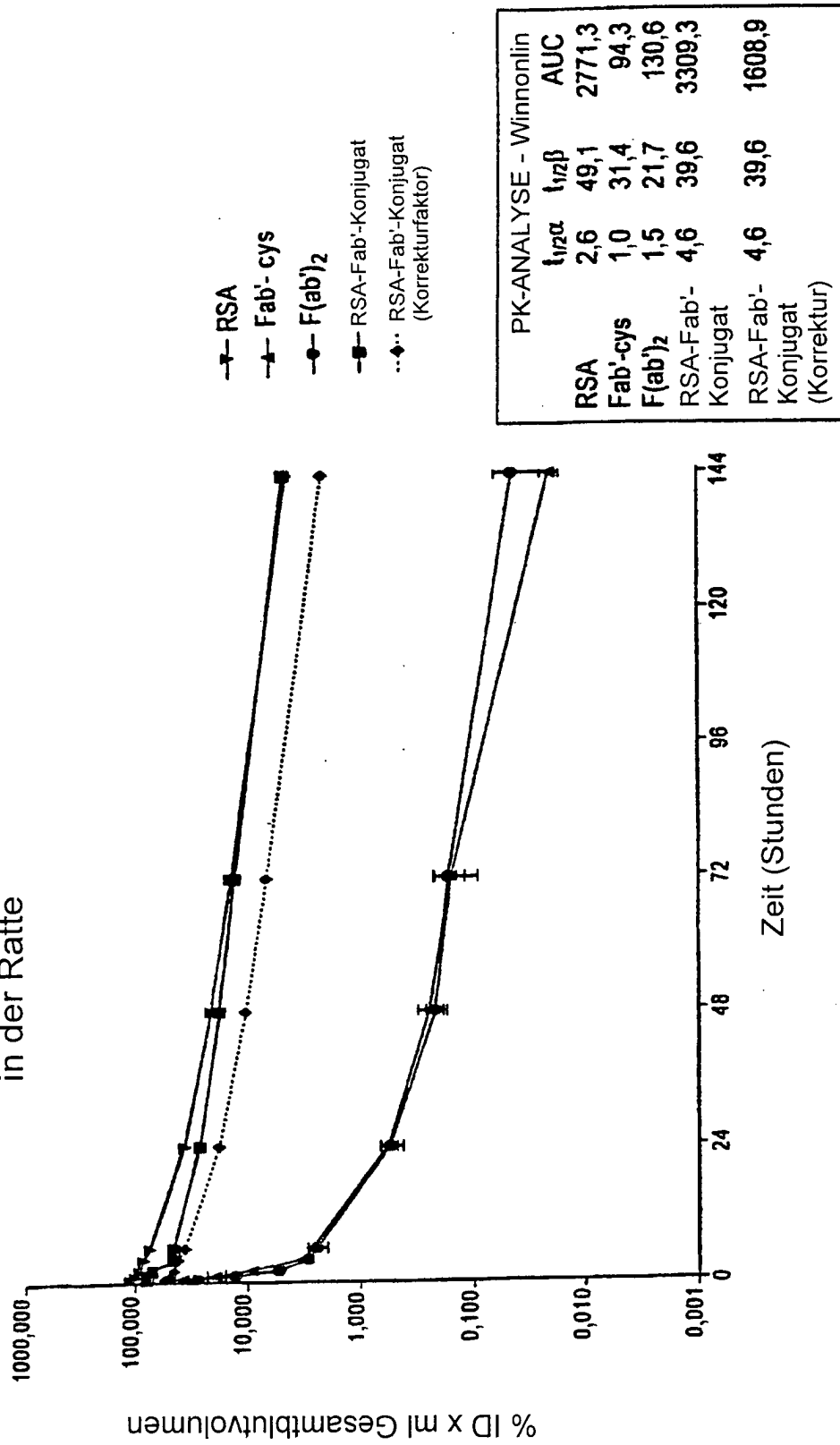


FIG. 2 Pharmakokinetik des RSA-Fab'-Konjugats oder der Kontrollen in der Ratte



**FIG. 3** Pharmakokinetik von RSA-Fab' oder Fab'-cys in der Ratte (untersucht durch ELISA oder Zytokinneutralisation)

PK-ANALYSE - Winnonlin			
	$t_{1/2\alpha}(h)$	$t_{1/2\beta}(h)$	AUC (0- $\infty$ ) (h $\cdot$ $\mu$ g/ml)
L929-Assay:			
RSA-Fab'-Konjugat	2,7	24,7	975
Fab'-cys	ND	ND	ND
ELISA-Assay:			
RSA-Fab'-Konjugat (Ligand-Albumin)	0,8	19,5	780
RSA-Fab'-Konjugat (Ligand-L-Kette)	1,3	21,6	824
Fab'-cys	ND	0,7	4

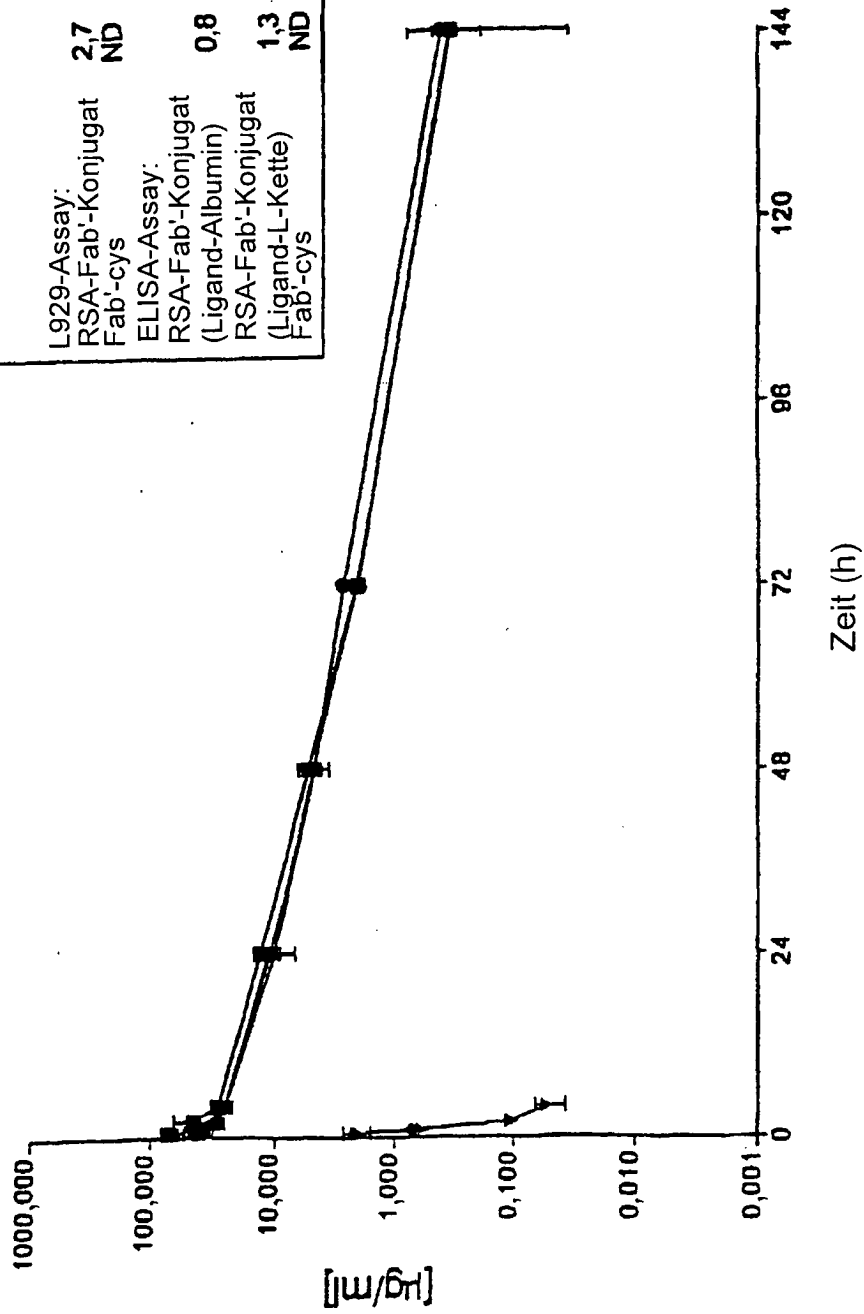
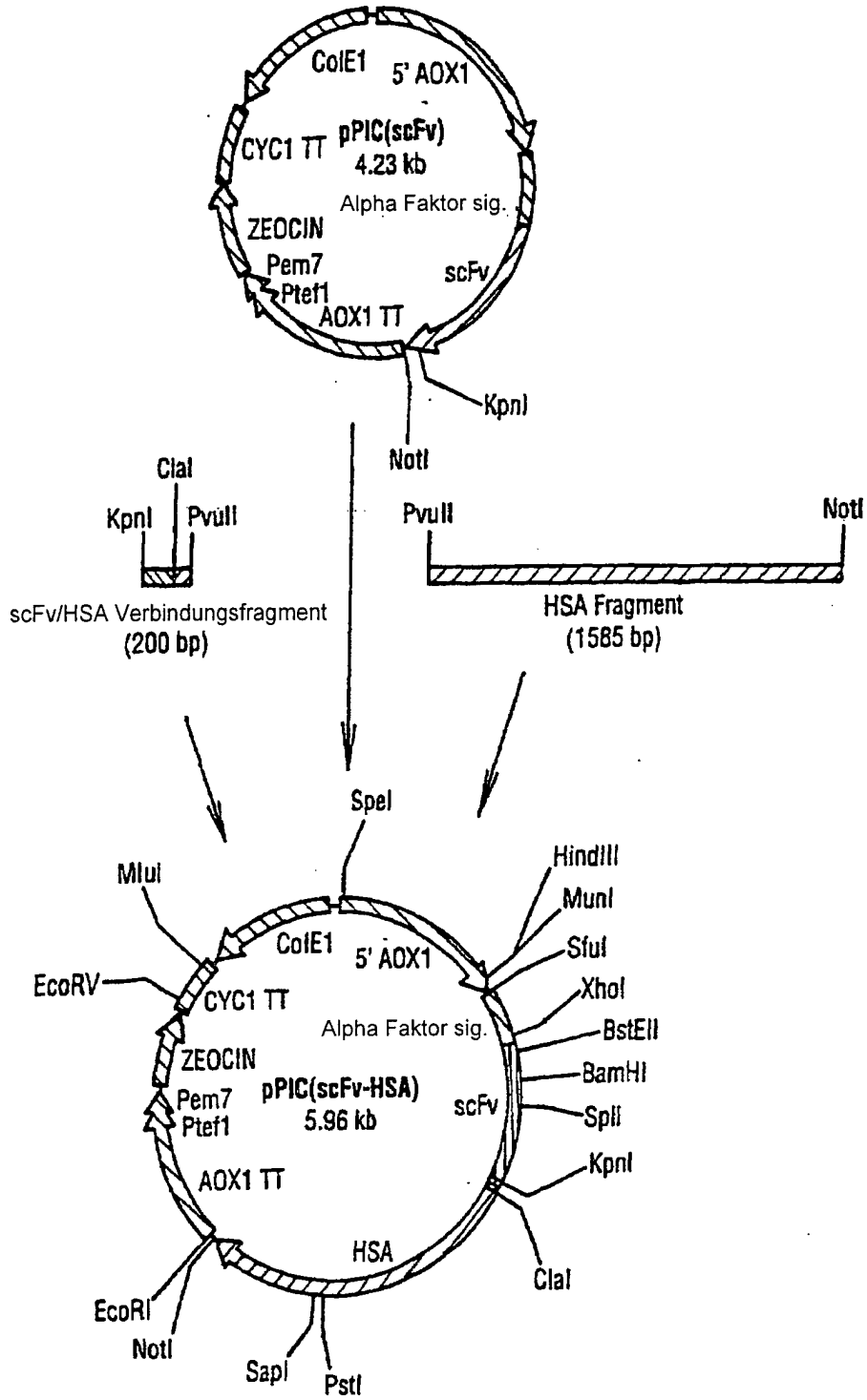
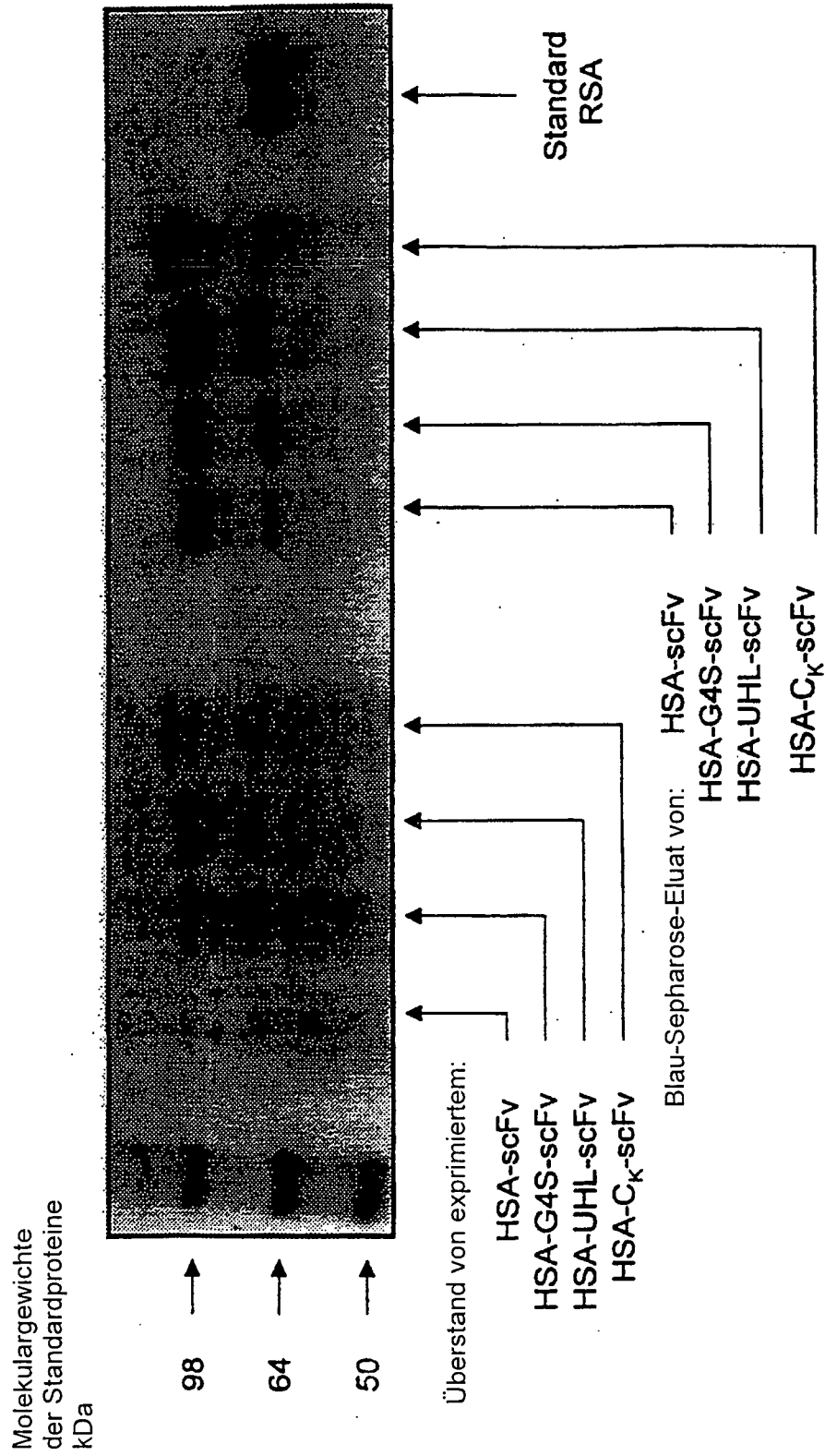


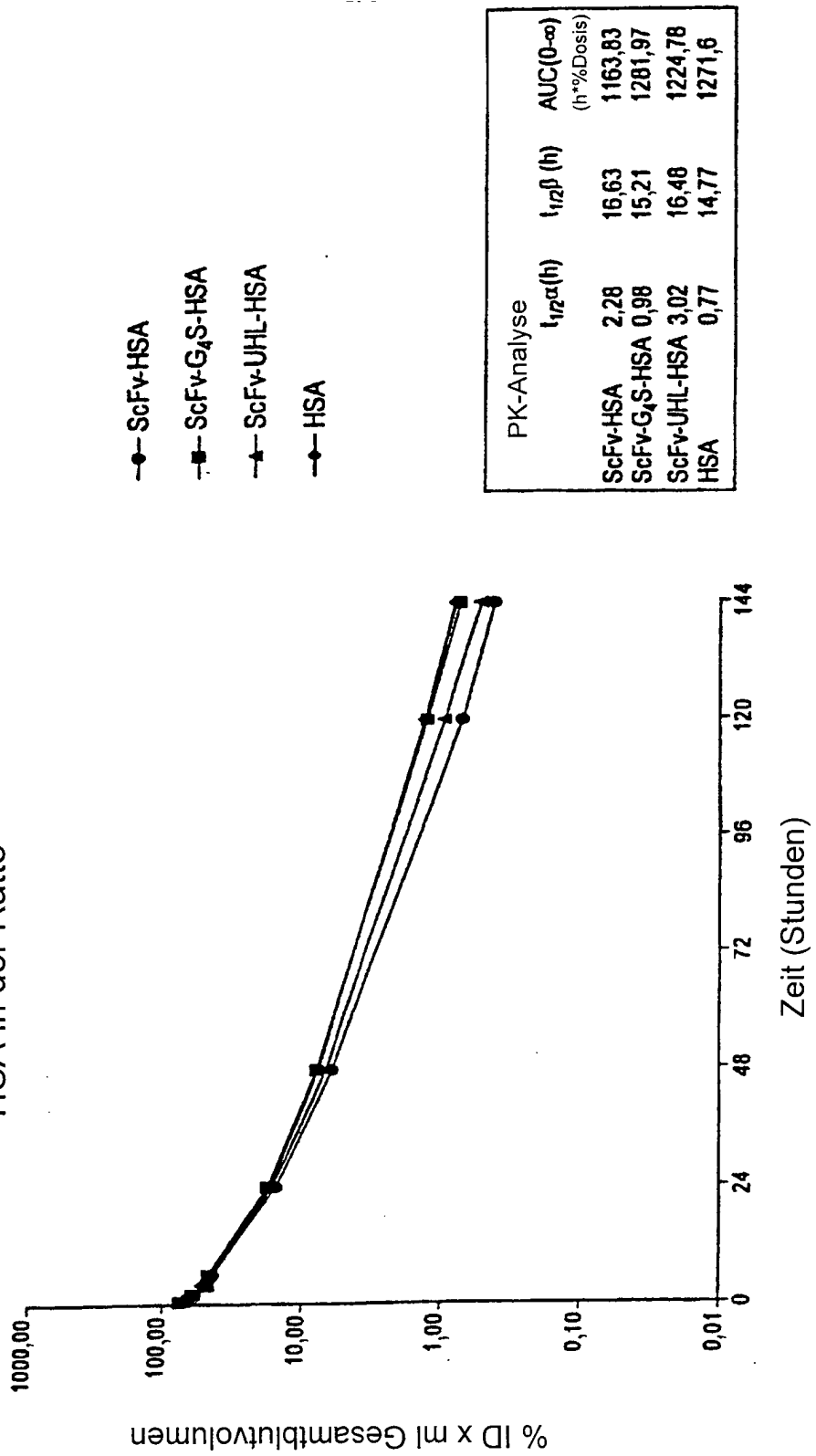
FIG. 4 Konstruktion von pPIC (scFv-HSA)



**FIG. 5** Reduzierende SDS-PAGE von HSA-scFv-Fusionsproteinen

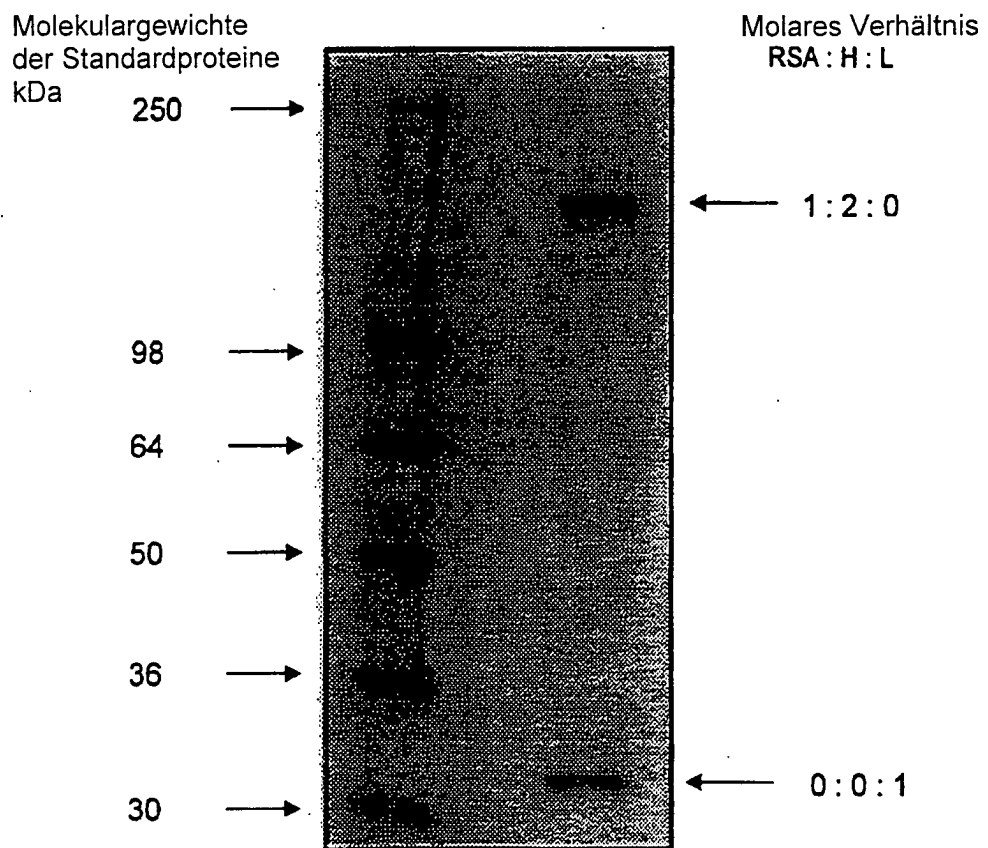


**FIG. 6** Pharmakokinetik von HSA-Fab'-Fusionsproteinen oder HSA in der Ratte





**FIG. 8** Reduzierende SDS-PAGE des HSA-F(ab')<sub>2</sub>-Konjugats



**FIG. 9** Scatchard-Plots der Bindung von RSA-F(ab')<sub>2</sub> oder F(ab')<sub>2</sub>-Kontrolle an Zellmembranen

