



(12) PATENT

(11) 346105

(13) B1

NORGE

(19) NO

(51) Int Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/14 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20082874	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2006.12.11 PCT/EP2006/011914
(22)	Inng.dag	2008.06.24	(85)	Videreføringsdag	2008.06.24
(24)	Løpedag	2006.12.11	(30)	Prioritet	2005.12.12, EP, 05027090
(41)	Alm.tilgj	2008.08.28			
(45)	Meddelt	2022.02.21			
(73)	Innehaver	E Hoffmann-La Roche AG, Grenzacherstrasse 124, 4070 BASEL, Sveits Manfred Brockhaus, Talweg 29, 4126 BETTINGEN, Sveits Walter Huber, Ziegelhofweg 62, 4303 KAISERAUGST, Sveits Hansruedi Loetscher, Frankenstrasse 18, 4313 MÖHLIN, Sveits Karl Weyer, Im Rumpel 16, 79415 BAD BELLINGEN, Tyskland Hans Koll, Bluetenanger 42, 85247 OBERROTH, Tyskland Kurt Lang, Langoner Strasse 10, 82377 PENZBERG, Tyskland Andreas Schaubmar, St. Klara Strasse 41, 82377 PENZBERG, Tyskland Diana Schuhbauer, Buchenstrasse 42, 4054 BASEL, Sveits Bernd Bohrmann, Rheingasse 63, 4058 BASEL, Sveits			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig	ZACCO NORWAY AS, Postboks 488, 0213 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	ANTISTOFFER MOT AMYLOID-BETA-4 MED GLYKOSYLERT ASPARAGIN I DEN VARIABLE REGIONEN			
(56)	Anførte publikasjoner	ENDO T. ET AL. Glycosylation of the variable region of immunoglobulin G--site specific n sugar Chains. Mol Immunol. 1995, vol. 32, no. 13, side 931-940. LEIBIGER H. ET AL. Variable domain-linked oligosaccharides of a human monoclonal Ig influence on antigen binding. Biochem J. 1999, vol. 338, Pt 2, side 529-538. WO 03070760 A2			
(57)	Sammendrag				

Den foreliggende oppfinnelsen er relatert til et rensset antistoffmolekylpreparat som er karakterisert ved at minst ett antigenbindende sete omfatter en glykosylert asparagin (Asn) i den variable regionen av den tunge kjeden (VH)- Mer spesifikt er en farmasøytisk og en diagnostisk sammensetning omfattende nevnte antistoffmolekyl og antistoffblandinger tilveiebrakt som er i stand til å spesifikt gjenkjenne P-A4-peptidet/AP4. Den foreliggende oppfinnelsen er spesielt relatert til en blanding av antistoffer omfattende ett eller to glykosylerte antigenbindende seter med en glykosylert asparagin (Asn) i den variable regionen av den tunge kjeden, det vil si blandinger av isoformer av antistoffer som omfatter en glykosylert Asn i den variable regionen av den tunge kjeden (VI-). Også angitt er sammensetninger eller antistoffpreparater omfattende de spesifikt glykosylerte antistoffisoformene. Videre er de farmasøytiske og diagnostiske anvendelsene for disse antistoffene tilveiebrakt. Antistoffisoformene kan for eksempel bli benyttet i den farmasøytiske intervensjonen av amyloidogenese eller amyloid plakkdannelse og/eller i diagnostikken av det samme.

Den foreliggende oppfinnelsen er relatert til et rensset antistoffmolekylpreparat som blir karakterisert ved at minst ett antigenbindende sete omfatter en glykosylert asparagin (Asn) i den variable regionen av den tunge kjeden (V_H). Mer spesifikt er et rensset antistoffmolekyl tilveiebrakt som er i stand til å spesifikt gjenkjenne β -A4-peptid/ $A\beta_4$ og omfattende en glykosylering i den variable regionen av den tunge kjeden (V_H). Den foreliggende oppfinnelsen er relatert til en blanding av antistoffer omfattende ett eller to glykosylerte antigenbindende seter med en glykosylert asparagin (Asn) i den variable regionen av den tunge kjeden, det vil si blandinger av isoformer av antistoffer som omfatter en glykosylert Asn i den variable regionen av den tunge kjeden (V_H). Også angitt er sammensetninger eller antistoffpreparater omfattende de spesifikt glykosylerte antistoffisoformene. Videre er de farmasøytiske og diagnostiske anvendelsene for disse antistoffene tilveiebrakt. Antistoffisoformene kan for eksempel bli benyttet i den farmasøytiske intervensjonen av amyloidogenese eller amyloidplakkdannelse og/eller i diagnostikken av det samme.

Omkring 70 % av alle tilfeller av demens er på grunn av Alzheimers sykdom som er assosiert med selektiv skade av hjerneregioner og nervekretser kritisk for kognisjon. Alzheimers sykdom er karakterisert ved neurofibrillære sammenfiltringer spesielt i pyrimidale neuroner av hippocampus og tallrike amyloide plakk inneholdende for det meste en tett kjerne av amyloide avsetninger og uskadeliggjorte haloer.

De ekstracellulære, neurittiske plakkene inneholder store mengder av et dominerende fibrillært peptid kalt "amyloid β ", "A-beta", " $A\beta_4$ ", " β -A4" eller " $A\beta$ "; se Selkoe (1994), Ann. Rev. Cell Biol. 10, 373-403, Koo (1999), PNAS Vol. 96, s. 9989-9990, US 4 666 829 eller Glenner (1984), BBRC 12, 1131. Denne amyloid β er derivert fra "Alzheimer forløperprotein/ β -amyloid forløperprotein" (APP). APP-er er integrale membranglykoproteiner (se Sisodia (1992), PNAS Vol. 89, s. 6075) og er endo-proteolytisk kløyd i $A\beta$ -sekvensen ved en plasmamembranprotease, α -sekretase (se Sisodia (1992), loc. cit.). Ytterligere sekretaseaktivitet spesielt β -sekretase og γ -sekretaseaktivitet fører videre til den ekstracellulære frigjøringen av amyloid- β ($A\beta$) omfattende enten 39 aminosyrer ($A\beta_{39}$), 40 aminosyrer ($A\beta_{40}$), 42 aminosyrer ($A\beta_{42}$) eller 43 aminosyrer ($A\beta_{43}$); se Sinha (1999), PNAS 96, 11094-11053; Price (1998), Science 282, 1078 til 1083; WO 00/72880 eller Hardy (1997), TINS 20, 154.

Det er verdt å merke seg at $A\beta$ har flere naturlige forekommende former, hvorved de humane formene er referert til som de ovenfor nevnte $A\beta_{39}$, $A\beta_{40}$, $A\beta_{41}$, $A\beta_{42}$ og $A\beta_{43}$. Den mest fremtredende formen $A\beta_{42}$, har aminosyresekvensen (startende fra den

N-terminale enden):

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEKV.ID. NR.:

3). I A β 41, A β 40 og A β 39 er henholdsvis de C-terminale aminosyrene A, IA og VIA manglende. I A β 43-formen er et ytterligere treoninresidu omfattet ved den C-terminale
5 enden av den ovenfor avbildede sekvensen (SEKV.ID. NR.: 3).

Tiden nødvendig for å kjernedanne A β 40-fibriller ble vist til å være signifikant lengre enn å danne A β 42-fibriller; se Koo, loc. cit. and Harper (1997), Ann. Rev. Biochem. 66, 385-407. Som gjennomgått i Wagner (1999), J. Clin. Invest. 104, 1239-1332, er A β 42
10 mer hyppig funnet assosiert med neurittiske plakk og er betraktet til å være mer fibrillogen *in vitro*. Det ble også antydnet at A β 42 tjener som et "såkorn" i den kjernedannelsesavhengige polymeriseringen av ordnede, ikke-krystallinske A β -peptider; Jarrett (1993), Cell 93, 1055-1058.

- 15 Modifisert APP-prosessering og/eller genereringen av ekstracellulære plakk inneholdende proteinøse avsetninger, er ikke bare kjent fra Alzheimers patologi, men også fra individer som lider av andre neurologiske og/eller neurodegenererende lidelser. Disse lidelsene omfatter, bl.a. Downs syndrom, arvelig cerebral blødning med amyloidose hollandsk type, Parkinsons sykdom, ALS (amyotrofisk lateral sklerose),
20 Creutzfeldt Jakob sykdom, HIV-relatert demens og motorisk neuropati.

Inntil nå har bare begrensede, medisinske intervensjonsskjemaer for amyloidrelaterte sykdommer blitt beskrevet. Kolinesteraseinhibitorer slik som galantamin, rivastigmin eller donepezil har for eksempel blitt diskutert til å være fordelaktig i Alzheimers
25 pasienter med bare mild til moderat sykdom. Imidlertid har også ugunstige begivenheter blitt rapportert på grunn av kolinergisk virkning av disse medikamentene. Imens disse kolinergiskforsterkende behandlingene produserer noen symptomatiske fordeler, er terapeutisk respons ikke tilfredsstillende for flesteparten av pasienter behandlet. Det har blitt estimert at signifikant kognitiv forbedring bare forekommer i omkring 5 % av
30 behandlede pasienter og det er lite bevis for at behandling signifikant endrer forløpet av denne progressive sykdommen. Følgelig er det fortsatt et enormt klinisk behov for mer effektive behandlinger og spesielt den som arresterer eller forsinker progresjon av sykdommen.

- 35 NMDA-reseptoragonister, slik som memantin, har også blitt benyttet i senere tid. Ugunstige begivenheter har imidlertid blitt rapportert på grunn av den farmakologiske aktiviteten. En slik behandling med disse NMDA-reseptoragonistene kan videre bare bli

betraktet som en symptomatisk metode og ikke en sykdomsmodifiserende.

Immunmoduleringsmetoder for behandlingen av amyloidrelaterte lidelser har også blitt foreslått. WO 99/27944 angir konjugater som omfatter deler av A β -peptidet og bærer-
 5 molekyler hvorved nevnte bærermolekyler burde forsterke immunrespons. En annen aktiv immuniseringsmetode er nevnt i WO 00/72880, hvor også A β -fragmenter er benyttet for å indusere en immun respons.

Passive immuniseringsmetoder med generelle anti-A β -antistoffer har også blitt foreslått
 10 i WO 99/27944 eller WO 01/62801 og spesifikke, humaniserte antistoffer rettet mot deler av A β har blitt beskrevet i WO 02/46237, WO 02/088306 og WO 02/088307. WO 00/77178 beskriver antistoffer som binder et transisjonsstrinn adoptert ved β -amyloid under hydrolyse. WO 03/070760 angir antistoffmolekyler som gjenkjenner to diskontinuerlige aminosyresekvenser på A β -peptidet.

15 WO 03/016466 beskriver et humanisert anti-A β -antistoff som er modifisert for å unngå enhver potensiell glykosylering i sin tunge kjede, siden en glykosylering i variabel region(er) av antistoffer har blitt postulert i Wallick (1988) J. Exp. Med. 168, 1099-1109.

20 Endo T. et al., "Glycosylation of the variable region of immunoglobulin G—site specific maturation of the sugar chains", Molecular Immunology, 1995, vol. 32, nr. 13, s. 931-940 beskriver destrukspesifikke antistoffer som har et glykosyleringssete ved Asn54, Asn58 eller Asn60 i den tungkjede variable regionen. Endo et al. beskriver ikke
 25 en sammensetning omfattende antistoffmolekyler som er i stand til spesifikt å gjenkjenne β -A4 peptid/A β 4, hvor sammensetningen omfatter mindre enn 5% av et antistoffmolekyl som ikke har noe glykosylert asparagin i det variable området av tungkjeden.

30 Det tekniske problemet underliggende den foreliggende oppfinnelsen er å tilveiebringe samme midler og fremgangsmåter i den medisinske håndteringen av amyloide lidelser, spesielt midler og fremgangsmåter for reduksjonen av skadelige, amyloide plakk i pasienter med behov av en (korresponderende) medisinsk intervensjon.

35 Foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer et rensset antistoffmolekyl som blir karakterisert ved at minst et antigenbindende sete omfatter en glykosylert asparagin (Asn) i den variable regionen av den tunge kjeden (V_H). Det oppfunnede, rensede

antistoffet eller antistoffsammensetningen som tilveiebrakt her, er spesielt rettet mot A β og/eller et fragment av A β . Det rensede antistoffmolekylet som tilveiebrakt her, og spesielt antistoffsammensetningen eller antistoffpreparatet ifølge oppfinnelsen er nyttig i fremstillingen av en farmasøytisk eller diagnostisk sammensetning for behandlingen, forbedringen og for forebygging av en sykdom assosiert med amyloidose og/eller amyloid plakkdannelse. Et eksempel på en slik sykdom er Alzheimers sykdom.

Følgelig vedrører foreliggende oppfinnelse utførelsesformene som er karakterisert i patentkravene. Således vedrører den en sammensetning omfattende et antistoffmolekyl som er i stand til å spesifikt gjenkjenne β -A4-peptidet/A β 4, nevnte antistoffmolekyl er et monoglykosylert antistoffmolekyl eller et dobbeltglykosylert antistoffmolekyl eller der nevnte sammensetning omfatter en blanding av nevnte monoglykosylerte antistoffmolekyl og nevnte dobbeltglykosylerte antistoffmolekyl,

- der nevnte monoglykosylerte antistoffmolekyl omfatter en glykosylert asparagin (Asn) i posisjon 52 av SEKV.ID. NR.: 2 eller SEKV.ID. NR.: 6 i den variable regionen av den tunge kjeden (V_H) og der nevnte dobbeltglykosylerte antistoffmolekyl omfatter en glykosylert asparagin (Asn) i posisjon 52 av SEKV.ID. NR.: 2 eller SEKV.ID. NR.: 6 i den variable regionen av den tunge kjeden (V_H) til begge antigenbindende seter,
- der nevnte antistoffmolekyl omfatter en CDR1 i den variable tunge kjeden som vist i SEKV.ID. NR.: 10, en CDR2 i den variable tunge kjeden som vist i SEKV.ID. NR.: 12, en CDR3 i den variable tunge kjeden som vist i SEKV.ID. NR.: 14, en CDR1 i den variable lette kjeden som vist i SEKV.ID. NR.: 16, en CDR2 i den variable lette kjeden som vist i SEKV.ID. NR.: 18 og en CDR3 i den variable lette kjeden som vist i SEKV.ID. NR.: 20,

og hvorved nevnte sammensetning omfatter mindre enn 5 % av et antistoffmolekyl kjennetegnet ved at ingen antigenbindende seter av nevnte antistoffmolekyl omfatter en glykosylert asparagin (Asn) i den variable regionen av den tunge kjeden (V_H).

I sammenheng med denne oppfinnelsen ble det overraskende funnet at rensede antistoffmolekyler, hvor minst ett antigenbindende sete omfatter en N-forbundet glykosylering i den variable regionen av den tunge kjeden, er spesielt nyttig i for eksempel reduksjonen av amyloide plakk. Videre har det blitt funnet i sammenheng av denne oppfinnelsen at de glykosylerte antistoffene eller antistoffsammensetningene som tilveiebrakt her, er spesielt nyttige og virksomme i å krysse blod-hjernebarrieren/blod-hjerne-grensen *in vivo* som illustrert ved veldig virksom plakbinding.

Dette er i sterk motsetning til demonstrasjonen av den kjente teknikken. WO 03/016466 angir antistoffer som er spesifikt konstruert til å mangle et N-glykosyleringssete i den tunge kjeden og det er vist at glykosylering i variabel regionrammeverk har negativ effekt på antistoffbindingsaffinitet. Det er demonstrert i den kjente teknikken at det
 5 beskrevne anti-A β -antistoffet i en deglykosylert form av den tung kjedevariable CDR2-regionen har en markert høyere affinitet for syntetisk og renset A β -peptid *in vitro*.

Følgelig er den foreliggende oppfinnelsen relatert til et forbedret, renset antistoffmolekyl eller et antistoffpreparat, spesielt et antistoffmolekylpreparat som er rettet mot
 10 A β 4/A β -peptidet (amyloid β) og er sterkt effektivt *in vivo*. Forbedringen av det foreliggende antistoffmolekylet/antistoffpreparatet ligger i forsyningen av rensede antistoffmolekyler som omfatter minst én av deres variable regioner i den tunge kjeden en N-glykosylering, for eksempel i CDR2-regionen av nevnte variable region av den tunge kjeden. Som nevnt ovenfor er dette i kontrast til den kjente teknikken slik som WO
 15 03/016466, som viser at en slik N-glykosylering har blitt unngått i antistoffet rettet mot for eksempel A β .

Eksempler på et antistoffmolekyl av den foreliggende oppfinnelsen er immunglobulinmolekyler, for eksempel IgG-molekyler. IgG-er er karakterisert ved å omfatte to tunge
 20 og to lette kjeder (illustrert for eksempel i figur 14) og disse molekylene omfatter to antigenbindende seter. Nevnte antigenbindende seter omfatter "variable regioner" bestående av deler av de tunge kjedene (V_H) og deler av de lette kjedene (V_L). De antigenbindende setene er dannet ved sammenstillingen av V_H- og V_L-domenene. For generell informasjon om antistoffmolekyler eller immunglobulinmolekyler se også alminnelige
 25 tekstbøker, slik som Abbas "Cellular og Molecular Immunology", W.B. Saunders Company (2003).

For eksempel i forsyning av et immunglobulinmolekyl som karakterisert i denne oppfinnelsen, er et antistoff beskrevet hvor ett antigenbindende sete omfatter en
 30 glykosylert asparagin (Asn) i den korresponderende variable regionen av den tunge kjeden (V_H). nevnte antistoff er heretter referert til som "monoglykosylert antistoff"; se også figur 14.

Et immunglobulinmolekyl er tilveiebragt hvor begge antigenbindende seter omfatter en
 35 glykosylert asparagin (Asn) i den variable regionen av korresponderende tunge kjeder (V_H). Nevnte antistoffmolekyl er heretter referert til som "dobbelglykosylert antistoff", se figur 14.

Et immunglobulin hvor ingen antigenbindende seter omfatter en glykosylert asparagin (Asn) i den variable regionen av den tunge kjeden (V_H), er heretter referert til som "ikke-glykosylert antistoff".

5

Det monoglykosylerte ANTISTOFFET, det dobbelt-glykosylerte ANTISTOFFET og det ikke-glykosylerte ANTISTOFFET kan omfatte de identiske aminosyresekvensene eller forskjellige aminosyresekvenser. Betegnelsen "ANTISTOFF" omfatter, i henhold til antistoffmolekyler, spesielt rekombinant produserte antistoffmolekyler, slik som
 10 immunglobuliner. Som diskutert nedenfor omfatter imidlertid også betegnelsen "ANTI-STOFF-molekyl" kjente isomerformer og modifikasjoner av immunglobuliner, slik som enkelkjedeantistoffer eller enkelkjede Fv-fragmenter (scAB/scFv) eller bispesifikke antistoffkonstruksjoner, hvor nevnte isomerformer og modifikasjoner blir karakterisert til å omfatte minst én glykosylert V_H -region som definert her. Et spesifikt eksempel på
 15 en slik isoform eller modifikasjon kan være et sc(enkelt kjede)antistoff i formatet V_H - V_L eller V_L - V_H , hvor nevnte V_H omfatter den her beskrevne glykosyleringen. Bispesifikke scFv-er er også forestilt seg, for eksempel i formatet V_H - V_L - V_H - V_L , V_L - V_H - V_H - V_L , V_H - V_L - V_L - V_H , som omfatter den her beskrevne glykosyleringen i CDR-2-regionen.

20

I sammenheng av denne oppfinnelsen er betegnelsen "ANTISTOFF" i store bokstaver anvendt for å tilveiebringe bedre klarhet. Imidlertid er betegnelsen "antistoff" i små bokstaver også benyttet i sammenheng av denne søknaden. "ANTISTOFF"/"ANTI-STOFFER"/"antistoff" og "antistoffer" er benyttet vekslende.

25

Det monoglykosylerte ANTISTOFFET og det dobbelt-glykosylerte ANTISTOFFET er her tidligere referert til som "glykosylerte ANTISTOFF-isomerer". Et renset antistoffmolekyl karakterisert ved at minst ett antigenbindende sete omfatter en glykosylert asparagin (Asn) i den variable regionen av den tunge kjeden (V_H) er et monoglykosylert
 30 ANTISTOFF som er fritt for eller en veldig liten utstrekning assosiert med en isoform valgt fra et dobbelt-glykosylert ANTISTOFF og et ikke-glykosylert ANTISTOFF, det vil si et "renset monoglykosylert ANTISTOFF". Et dobbelt-glykosylert ANTISTOFF i sammenheng av denne oppfinnelsen, er fri for eller i et veldig lite omfang assosiert med en isoform valgt fra et monoglykosylert ANTISTOFF og et ikke-glykosylert ANTI-STOFF, det vil si et "renset, dobbelt-glykosylert ANTISTOFF".
 35

Betegnelsen "som er fritt for eller i en veldig lav utstrekning" angir det fullstendige

fraværet av de andre respektive (glykosylerings)isomerene eller et nærvær av en annen (glykosylert) isoform i en konsentrasjon på høyst 10 %, for eksempel høyst 5 %, for eksempel høyst 4 %, for eksempel høyst 3 %, for eksempel høyst 2 %, for eksempel høyst 1 %, for eksempel høyst 0,5 %, for eksempel høyst 0,3 %, for eksempel høyst 0,2 %. Videre informasjon med hensyn på dette er tilveiebrakt nedenfor og i de vedlagte eksemplene.

I sammenheng av denne oppfinnelsen er betegnelsen "monoglykosylert(e) antistoff(er)" eller "monoglykosylert(e) ANTISTOFF(ER)" relatert til antistoffmolekyler omfattende en N-glykosylering i én (V_H)-region av et individuelt antistoffmolekyl, for eksempel av et immunglobulin, for eksempel en IgG, for eksempel av en IgG1. Nevnte "monoglykosylerte form" omfatter for eksempel en glykosylering på én variabel region av den tunge kjeden, for eksempel ved en posisjon asparagin "Asn 52" som definert nedenfor. Denne "monoglykosylerte IgG1-formen eller monoglykosylerte isoformen" kan også omfatte som illustrert her, glykosyleringen i det godt konserverte glykosyleringssettet i Fc-delen, for eksempel asparagin Asn 306 i den ikke-variable Fc-delen.

Betegnelsen "dobbelglykosylert(e) antistoff(er)" eller "dobbelglykosylert(e) ANTISTOFF(ER)" i betydningen av denne oppfinnelsen, omslutter den her definerte glykosyleringen på begge variable regioner av tung kjede (V_H)-regionen. Igjen omfatter denne "dobbelglykosylerte formen" en glykosylering på den variable regionen av begge tunge kjeder, spesielt ved posisjon asparagin Asn 52 som detaljert beskrevet nedenfor og som eksemplifisert i de vedlagte eksemplene. Denne "dobbelglykosylerte IgG1-formen eller dobbelglykosylerte isoformen" kan også omfatte, som illustrert her, glykosyleringen i det godt konserverte glykosyleringssettet i den ikke-variable/konstante Fc-delen, spesielt på posisjon 306 av det eksemplifiserte immunoglobulinet. Vedlagte figur 14 illustrerer korresponderende antistoffmolekyler.

Antistoffer frie for en slik posttranslasjonell modifikasjon i den variable regionen, for eksempel i begge variable regioner av den tunge kjeden (begge (V_H)-regioner), er i sammenheng av denne oppfinnelsen betraktet som en ikke-glykosylert form", omfattende ingen glykosylering i den variable regionen av den tunge kjeden. Denne "ikke-glykosylerte formen" kan ikke desto mindre omfatte (a) glykosylering(er) i den konstante regionen (C-region) av antistoffet, for eksempel og mest alminnelig ved det godt konserverte glykosyleringssettet av Fc-delen, spesielt asparagin (Asn) 306 i den ikke-variable/konstante Fc-delen som definert her, se også SEKV.ID. NR.: 6.

Den glykosylerte asparaginen (Asn) i den variable regionen av den tunge kjeden (V_H) kan være i den komplementaritetsbestemmende regionen 2 (CDR2-region). Nevnte glykosylerte asparagin (Asn) i den variable regionen av den tunge kjeden (V_H) kan være i posisjon 52 av den variable regionen som definert nedenfor og som vist i SEKV.ID.

- 5 NR.: 2 (eller i posisjon 52 av SEKV.ID. NR.: 6 omfattende også Fc-delen av en antistoff tung kjede som angitt her).

ANTISTOFF-isoformer kan også omfatte (a) ytterligere glykosylering(er) i den konstante/ikke-variable delen av antistoffmolekylene, for eksempel i Fc-delen av et IgG, for eksempel i Fc-delen i IgG1. Nevnte glykosylering i Fc-delen er relatert til en godt konserverte glykosylering, som blir karakterisert i å være lokalisert på posisjon Asn306 av den tunge kjeden, for eksempel i overensstemmelse med den følgende sekvensen:

QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINA
15 SGTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKGNTHK
PYGYVRYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
20 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEKV.ID. NR.: 6)

Denne sekvensen er også avbildet her nedenfor og CDR-ene, CH-regioner, tunge regioner, så vel som to N-glykosylerings seter (N52 og N306) er indikert:

QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS
AINASGTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
GKGNTHKPYGYVRYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
30 GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT
35 VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEKV.ID. NR.: 6)

innrammet: CDR1, 2, 3

understreket: CH1

kursiv: hengsle

understreket to ganger: CH2

stiplet understreket: CH3

- 5 **uthevet N**: N-forbundne glykosylerings seter

IgG-Fc-regionen av antistoffene av denne oppfinnelsen kan være en homodimer bestående av interkjede disulfidbundne hengsleregioner, glykosylerte CH2-domener som bærer N-forbundet oligosakkarid ved asparagin 306 (Asn-306) av CH2 og ikke-kovalent
10 parede CH3-domener. Oligosakkaridet av glykosylseringen med Asn-306 er av den komplekse biantenare typen og kan omfatte en kjerne heptasakkaridstruktur med variabel tilføyning av ytre armsukre.

Oligosakkaridet påvirker eller bestemmer Fc-struktur og funksjon (Jefferis (1998)
15 Immunol Rev. 163, 50-76). Effektorfunksjoner, som nummererer spesielt spesifikke IgG-Fc/effektorligandinteraksjoner, har blitt diskutert (Jefferis (2002) Immunol Lett. 82(1-2), 57-65 og Krapp (2003) J Mol Biol. 325(5), 979-89). Denne konserverte Fc-delen av Asn-306 korresponderer til "Asn-297" i Kabat-systemet (Kabat (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. utg., Public Health Service,
20 National Institutes of Health, Bethesda MD.)

Den eksemplifiserte, tunge kjeden kan bli kodet ved den følgende sekvensen:

caggtggaattggtggaaagcggcggcggcctggtgcaaccgggcggcagcctgcgtctgagctgcgcggcctccggatt
taccttagcagctatgcgatgagctgggtgcgccaagcccctgggaagggctcgcagtgagggtgagcgtattaatgcttctgg
25 tactcgtactattatgctgattctgtaagggtcgtttaccatttcacgtgataattcgaacacccctgtatctgcaaatgaaca
gcctgcgtgcggaagatacggccgtgtattatgcgcgctgtaagggttaatactcataagccttatggttatgttcgttattttg
atgtttggggccaaggcaccctggtagcgttagctcagcctccaccaagggccatcggtcttccccctggcaccctctcc
aagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtaaggactactccccgaaccggtagcgggtgctggaac
tcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacctccccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgac
30 cgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaa
agttgagcccagatatcgtgcgatcgtgcaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctg
gggggaccgtcagtccttcttcccccaaaaccaaggacacctcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtggt
ggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtagcggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaa
gccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggca
35 aggagtacaagtgaaggtctcaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctcaaagccaaagggcagccc
cgagaaccacaggtgtacacctgccccatccccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtaaaa
ggcttctatccagcagacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccg

gctggactccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcat
gctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaata (SEKV.ID.
NR.: 5).

- 5 Nevnte tunge kjede kan også omfatte (spesielt under dens rekombinante produksjon)
ytterligere sekvenser, slik som "ledersekvenser". Et korresponderende eksempel er
kodet ved den følgende sekvensen:
atgaacacctgtggttcttctctctgctggcagctcccagatgggtcctgtcc (etterfulgt ved)
caggtggaattggtgaaagcggcggcggcctggtgcaaccggcggcagcctgcgtctgagctgcgcggcctccggatt
10 tacttttagcagctatgcgatgagctgggtgcgccaagccctgggaagggtctcgagtggtgagcgtattaatgcttctgg
tactcgtacttattatgctgattctgttaagggtcgtttaccatttcacgtgataattcggaaacacccgtatctgcaaatgaaca
gcctgcgtgcggaagatacggcgtgtattattgcgcgctgtaagggttaatactcataagccttatggttatgttcgtattttg
atgtttggggccaaggcacctggtgacggttagctcagcctccaccaagggtccatcggtcttccccctggcacctctcc
aagagcacctctgggggcacagcggccctgggtgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgctgtggaac
15 tcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttcccggtgtcctacagtcctcaggactctactcctcagcagcgtggtgac
cgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaa
agttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacatgccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagttctcc
tcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacga
agacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggagcagcgt
20 acaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaagg
tctcaacaaagccctccagccccatcgagaaaacctctccaaagccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtaca
ccctgcccccatccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatccagcgacat
cgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccggtgctgactccgagcgtcct
tcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggct
25 ctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaata (SEKV.ID. NR.: 25)

den korresponderende aminosyresekvensen vil være:

MKHLWFFLLLVAAPRWVLS (etterfulgt ved)

- QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINA
30 SGTRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKGNTHK
PYGYVRYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
35 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEKV.ID. NR.: 26).

Sekvensen ovenfor omfatter også et "signalpeptid", hvor nevnte signalpeptid er proteolytisk kløyd ved vertssignalpeptidasen under den sekretoriske veien under produksjonen av de oppfunne antistoffmolekylene i vertsceller, slik som CHO-celler.

5

Alternativt kan nevnte tunge kjede bli kodet ved en nukleinsyresekvens som er optimalisert for rekombinant produksjon som eksemplifisert ved den følgende sekvensen:

```

10      1  atggagtttg ggctgagctg ggttttctct gttgctcttt taagaggtga
      51  ttcattggaga aatagagaga ctgagtgtga gtgaacatga gtgagaaaaa
      101  ctggatttgt gtggcatttt ctgataacgg tgcctctctg tttgcagggtg
      151  tccagtgt

15  etterfulgt ved

      ca ggtggagctg gtggagtctg ggggaggcct ggtccagcct
      201  ggggggtccc tgagactctc ctgtgcagcg tctggattca ccttcagtag
      251  ctatgccatg agctgggtcc gccaggctcc aggcaagggg ctcgagtggg
20      301  tgtccgccat aaacgccagc ggtaccgcga cctactatgc agactccgtg
      351  aagggccgat tcaccatctc cagagacaat tccaagaaca cgctgtatct
      401  gcaaataaac agcctgagag ccgaggacac ggctgtgtat tactgtgcga
      451  gaggcaaggg gaacacccac aagccctacg gctacgtacg ctactttgac
      501  gtgtggggcc aaggaaccct ggtcaccgtc tcctcagggtg agtcctcaca
25      551  acctctctcc tgcggccgca gcttgaagtc tgaggcagaa tcttgtccag
      601  ggtctatcgg actcttgtga gaattagggg ctgacagttg atgggtgacaa
      651  tttcagggtc agtgactgtc tggtttctct gaggtgagac tggaatatag
      701  gtcaccttga agactaaaga ggggtccagg ggcttttctg cacaggcagg
      751  gaacagaatg tggacaatg acttgaatgg ttgattcttg tgtgacacca
30      801  agaattggca taatgtctga gttgcccaag ggtgatctta gctagactct
      851  ggggtttttg tcgggtacag aggaaaaacc cactattgtg attactatgc
      901  tatggactac tggggtaag gaacctcagt caccgtctcc tcaggtaaga
      951  atggcctctc caggctctta tttttaacct ttgttatgga gttttctgag
      1001  cattgcagac taatcttgga tatttgccct gagggagccg gctgagagaa
35      1051  gttgggaaat aaatctgtct agggatctca gagccttttag gacagattat
      1101  ctccacatct ttgaaaaact aagaatctgt gtgatgggtg tgggtggagtc
      1151  cctggatgat gggataggga ctttggaggg tcatttgagg gagatgctaa

```

12

1201 aacaatccta tggctggagg gatagttggg gctgtagttg gagattttca
 1251 gtttttagaa tgaagtatta gctgcaatac ttcaaggacc acctctgtga
 1301 caaccattht atacagtatc caggcatagg gacaaaaagt ggagtggggc
 1351 actttcttta gatttgtgag gaatgttcca cactagattg tttaaaactt
 5 1401 catthgttg aaggagctgt cttagtgatt gagtcaaggg agaaaggcat
 1451 ctagcctcgg tctcaaaagg gtagttgctg tctagagagg tctgggtggag
 1501 cctgcaaaag tccagctthc aaaggaacac agaagtatgt gtatggaata
 1551 ttagaagatg ttgctthtac tcttaagttg gttcctagga aaaatagtta
 1601 aatactgtga cthtaaaatg tgagagggtt ttcaagtact catthththta
 10 1651 aatgtccaaa atththgtca atcaatthga ggtcttgtht gtgtagaact
 1701 gacattactt aaagthtaac cgaggaaagg gagtgaaggc ctctcatacc
 1751 ctattcagaa ctgactthta acaataataa attaagthta aaataththt
 1801 aaatgaattg agcaatgttg agttgagtca agatggccga tcagaaccgg
 1851 aacacctgca gcagctggca ggaagcaggc catgtggcaa ggctaththg
 15 1901 ggaagggaat ataaaaaac taggtaaaact tgtagctgtg gthtgaagaa
 1951 gtggtththga aacactctgt ccagccccac caaacggaaa gtccaggctg
 2001 agcaaaacac cacctgggtg atthgcattt ctaaaaataag ttgaggatth
 2051 agccgaact ggagaggthc tctthtaact tathgagthc aacctththaa
 2101 ththtagctt agtagththc gthtcccaa actthaagtht atcgactthc
 20 2151 aaaatgtatt tagaaththc gctcgtgaca gctthctggg gcaggccagg
 2201 cctgaccttg gctthggggc agggaggggg ctaagggtgag gcagggtggc
 2251 ccagcaggth cacacccaat gcccatgagc ccagacactg gacgctgaac
 2301 ctgcgggaca gthtaagaac caggggcctc tgcgcctggg ccagctctg
 2351 tccacacccg cggtcacatg gcaccacctc tcttgagcc tccaccaagg
 25 2401 gcccatcggg cthccccctg gcacctctc ccaagagcac ctctgggggc
 2451 acagcggccc tgggctgctt ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac
 2501 ggtgtcgttg aactcaggcg cctgaccag cggcgtgac accttccccg
 2551 ctgtcttaca gtctcagga ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg
 2601 cctccagca gcttgggcac ccagacctac atctgcaacg tgaatcacia
 30 2651 gccagcaac accaagggtg acaagaaagt tggtagagg ccagcacagg
 2701 gagggagggt gtctgctgga agccaggctc agcgtctctg cctggacgca
 2751 tcccggtat gcagccccag tccagggcag caaggcaggc cccgtctgcc
 2801 tcttcaaccg gagctctgct cgcacctcct catgctcagg gagagggtct
 2851 tctggcttht tccaggtc tgggcaggca caggctaggt gccctaacc
 35 2901 caggccctgc acacaaaggg gcaggtgctg ggctcagacc tgccaagagc
 2951 catatccggg aggacctgct cctgacctc agccccccc aaaggccaaa
 3001 ctctccactc cctcagctcg gacacctct ctctcccag attccagtaa

3051 ctcccaatct tctctctgca gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca
 3101 tgccaccgt gccaggtaa gccagcccag gcctcgccct ccagctcaag
 3151 gcgggacagg tgccctagag tagcctgcat ccaggacag gccccagccg
 3201 ggtgctgaca cgtccacctc catctcttcc tcagcacctg aactcctggg
 5 3251 gggaccgtca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga
 3301 tctcccgga ccttgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa
 3351 gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa
 3401 tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg
 3451 tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac
 10 3501 aagtgaagg tctccaacaa agcctccca gcccctatcg agaaaacat
 3551 ctccaaagcc aaaggtggga cccgtggggg gcgagggcca catggacaga
 3601 ggccggctcg gccacacctc tgccctgaga gtgaccgtg taccaacctc
 3651 tgtccctaca gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat
 3701 cccgggatga gctgaccaag aaccaggtea gcctgacctg cctggtcaaa
 15 3751 ggcttctatc ccagcgacat cgcctgggag tgggagagca atgggcagcc
 3801 ggagaacaac tacaagacca cgcctccgt gctggactcc gacggctcct
 3851 tcttctctta cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg
 3901 aacgtcttct catgctcctg gatgcatgag gctctgcaca accactacac
 3951 gcagaagagc ctctccctgt ccccgggcaa atga (SEKV.ID. NR.: 23)

20

Den "alternative" proteinsekvensen som vist ovenfor som SEKV.ID. NR.: 23, omfatter den samme kodende sekvensen som det første alternativet, imidlertid i en noe forskjellig genomisk organisering, slik som ytterligere introner og en noe forskjellig "leder-sekvens"/"signalsekvens". Nevnte "ledersekvens" kan også omfatte, som vist ovenfor, et
 25 (ytterligere) intron(er). Fagpersonen kan lett utlede fra sekvensen som vist her den korresponderende ekson/intron-strukturen ved konvensjonelle metoder.

Det eksemplifiserte antistoffet beskrevet her, kan også omfatte en lett kjede, nevnte lette kjede kan omfatte eller ha den følgende aminosyresekvensen

30

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR
 ATGVPARFSGSGGTDFTLTISSLEPEDFATYYCLQIYNMPITFGQGTKVEIKRTV
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
 EQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

35

(SEKV.ID. NR.: 8)

som kan bli kodet ved den følgende nukleinsyresekvensen:

gatatcgtgctgacccagagccccggcgaccctgagcctgtctccggcggaacgtgacccctgagctgcagagcgagcca
gagcgtgagcagcagctatctggcgtgtgtaccagcagaaaccaggtcaagcaccgctctattaatttatggcgcgagcagc
cgtgcaactgggggtcccggcgcgttttagcggctctggatccggcacggattttaccctgaccattagcagcctggaacctga
5 agactttgcgacttattattgccttcagattataatgcctattacctttggccagggtacgaaagtgaaattaaacgtacgggtg
gctgcaccatctgtcttcatcttccgcatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgctgctgaataacttct
atcccagagaggccaaagtacagtggaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcag
gacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaagcagactacgagaaacacaaagtctacgc
ctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag (SEKV.ID.
10 NR.: 7).

Også den "lette kjeden" av eksemplifisert antistoff beskrevet her, kan omfatte en "leder-
sekvens" som er spesielt nyttig i den tekniske produksjonen. En korresponderende
sekvens kan være (eller kan bli omfatte i for eksempel et vektorsystem) den følgende
15 sekvensen:

atgggtgtgcagaccaggtcttcatttctctgttgctctggtatctctggtgcctacggg (etterfulgt ved)
gatatcgtgctgacccagagccccggcgaccctgagcctgtctccggcggaacgtgacccctgagctgcagagcgagcca
gagcgtgagcagcagctatctggcgtgtgtaccagcagaaaccaggtcaagcaccgctctattaatttatggcgcgagcagc
20 cgtgcaactgggggtcccggcgcgttttagcggctctggatccggcacggattttaccctgaccattagcagcctggaacctga
agactttgcgacttattattgccttcagattataatgcctattacctttggccagggtacgaaagtgaaattaaacgtacgggtg
gctgcaccatctgtcttcatcttccgcatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgctgctgaataacttct
atcccagagaggccaaagtacagtggaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcag
gacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaagcagactacgagaaacacaaagtctacgc
25 ctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag (SEKV.ID.
NR.: 27).

Nevnte sekvens koder for den følgende aminosyresekvensen

30 MVLQTQVFISLLWISGAYG (etterfulgt ved)
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR
ATGVPARFSGSGGTDFTLTISSLEPEDFATYYCLQIYNMPITFGQGTKVEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYSLSSLTLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC
35 (SEKV.ID. NR.: 28).

Alternativt kan nevnte lette kjede også bli kodet ved en nukleinsyresekvens som er optimalisert for rekombinant produksjon som eksemplifisert ved den følgende sekvensen:

```

5      1  atggacatga gggtcctcgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctgttt
      51  cccaggtaag gatggagaac actagcagtt tactcagccc aggggtgctca
     101  gtactgcttt actattcagg gaaattctct tacaacatga ttaattgtgt
     151  ggacatttgt ttttatgttt ccaatctcag gcgccagatg t

10  etterfulgt ved

                                     gatatcgtg
     201  ttgacgcagt ctccagccac cctgtctttg tctccagggg aaagagccac
     251  cctctcctgc cgggccagtc agagtgttag cagcagctac ttagcctggt
     301  accagcagaa acctggccag gcgcccagge tcctcatcta tggcgcatcc
15     351  agcagggcca ctggcgtgcc agccaggttc agtggcagtg ggtctgggac
     401  agacttcaact ctcaccatca gcagcctgga gcctgaagat ttcgcgacct
     451  attactgtct gcagatttac aacatgccta tcacgttcgg ccaagggacc
     501  aaggtggaaa tcaaacgtga gtagaattta aactttgcgg ccgcctagac
     551  gtttaagtgg gagatttggg ggggatgagg aatgaaggaa cttcaggata
20     601  gaaaagggct gaagtcaagt tcagctccta aaatggatgt gggagcaaac
     651  tttgaagata aactgaatga cccagaggat gaaacagcgc agatcaaaga
     701  ggggcctgga gctctgagaa gagaaggaga ctcatccgtg ttgagtttcc
     751  acaagtactg tcttgagttt tgcaataaaa gtgggatagc agagttgagt
     801  gagccgtagg ctgagttctc tcttttgtct cctaagtttt tatgactaca
25     851  aaaatcagta gtatgtcctg aaataatcat taagctgttt gaaagtatga
     901  ctgcttgcca tgtagatacc atgtcttgct gaatgatcag aagaggtgtg
     951  actcttattc taaaatttgt cacaaaatgt caaatgaga gactctgtag
    1001  gaacgagtc cttgacagaca gctcaagggg tttttttcct ttgtctcatt
    1051  tctacatgaa agtaaatctg aaatgatcct ttttattata agagtagaaa
30    1101  tacagttggg tttgaactat atgttttaat ggccacggtt ttgtaagaca
    1151  tttggctcct tgttttccca gttattactc gattgtaatt ttatatcgcc
    1201  agcaatggac tgaaacggtc cgcaacctct tctttacaac tgggtgacct
    1251  cgcggctgtg ccagccatct ggcgttcacc ctgccgctaa gggccatgtg
    1301  aacccccgcg gtagcatccc ttgctccgcg tggaccactt tcctgaggca
35    1351  cagtgatagg aacagagcca ctaatctgaa gagaacagag atgtgacaga
    1401  ctacactaat gtgagaaaaa caaggaaagg gtgacttatt ggagatttca
    1451  gaaataaaat gcattttatta ttatatcccc ttattttaat tttctattag

```

16

1501 ggaattagaa agggcataaa ctgctttatc cagtgttata ttaaaagctt
 1551 aatgtatata atcttttaga ggtaaaatct acagccagca aaagtcattg
 1601 taaatattct ttgactgaac tctcactaaa ctccctctaaa ttatatgtca
 1651 tattaactgg ttaaattaat ataaatttgt gacatgacct taactggtta
 5 1701 ggtaggatat ttttcttcat gcaaaaatat gactaataat aatttagcac
 1751 aaaaatattt cccaatactt taattctgtg atagaaaaat gtttaactca
 1801 gctactataa tcccataaatt ttgaaaacta tttattagct tttgtgtttg
 1851 acccttccct agccaaaggc aactatttaa ggacccttta aaactcttga
 1901 aactacttta gagtcattaa gttatttaac cacttttaat tactttaaaa
 10 1951 tgatgtcaat tcccttttaa ctattaattt attttaaggg gggaaaggct
 2001 gtcataaatt ctattgtttt tcttggtaaa gaactctcag ttttcgtttt
 2051 tactacctct gtcaccaag agttggcatc tcaacagagg ggactttccg
 2101 agaggccatc tggcagttgc ttaagatcag aagtgaagtc tgccagttcc
 2151 tcccaggcag gtggcccaaga ttacagttga cctgttcttg tgtggctaaa
 15 2201 aattgtccca tgtggttaca aaccattaga ccagggtctg atgaattgct
 2251 cagaatattt ctggacacc aaatacagac cctggcttaa ggccctgtcc
 2301 atacagtagg ttagcttggt ctacaccaa ggaagccata cagaggctaa
 2351 tatcagagta ttcttggaag agacaggaga aaatgaaagc cagtttctgc
 2401 tcttacctta tgtgcttggt ttcagactcc caaacatcag gagtgtcaga
 20 2451 taaactggtc tgaatctctg tctgaagcat ggaactgaaa agaattgtagt
 2501 ttcagggaag aaaggcaata gaaggagcc tgagaatacg gatcaattct
 2551 aaactctgag ggggtcggat gacgtggcca ttctttgcct aaagcattga
 2601 gtttactgca aggtcagaaa agcatgcaa gccctcagaa tggctgcaaa
 2651 gagctccaac aaaacaattt agaactttat taaggaatag ggggaagcta
 25 2701 ggaagaaact caaaacatca agatttttaa tacgcttctt ggtctccttg
 2751 ctataattat ctgggataag catgctgttt tctgtctgtc cctaacatgc
 2801 cctgtgatta tccgcaaaca acacacccaa gggcagaact ttgttactta
 2851 aacaccatcc tgtttgcttc tttcctcagg aactgtggct gcaccatctg
 2901 tcttcatctt cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct
 30 2951 gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc agagaggcca aagtacagtg
 3001 gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag
 3051 agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg
 3101 agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca
 3151 tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt
 35 3201 **ag (SEKV.ID. NR.: 24)**

"Sekvensen" ovenfor for en eksemplifisert lett kjede har også en noe forskjellig genomisk struktur. Denne "alternative sekvensen" omfatter forskjellige og/eller ytterligere introner. Følgelig benytter utførelsesformene som beskriver den "tunge kjeden" her naturlige endringer.

5

I sammenheng av den foreliggende oppfinnelsen er betegnelsen "antistoffmolekyl" relatert til fullstendige immunglobulinmolekyler, for eksempel IgM-er, IgD-er, IgE-er, IgA-er eller IgG-er, slik som IgG1, IgG2, IgG2b, IgG3 eller IgG4, så vel som deler av slike immunoglobulinmolekyler, slik som Fab-fragmenter, Fab'-fragmenter, F(ab)2-fragmenter, kimære F(ab)2 eller kimære Fab'-fragmenter, kimære Fab-fragmenter eller isolerte V_H- eller CDR-regioner (nevnte isolerte V_H- eller CDR-regioner skal for eksempel bli integrert eller konstruert i korresponderende "rammeverk"). Også omfattet i betegnelsen "antistoffmolekyl" er diabodier og molekyler som omfatter et antistoff Fc-domene som et leveringsmiddel festet til minst én antigenbindende halvdel/peptid, for eksempel peptibodier som beskrevet i WO 00/24782. Følgelig og i sammenheng med denne oppfinnelsen, er betegnelsen "variabel region av den tunge kjeden (V_H)" ikke begrenset til en variabel region i et fullstendig immunglobulin, men er også relatert til de korresponderende delene av nevnte variable region av den tunge kjeden (V_H), slik som CDR-ene, enten alene eller i kombinasjon av CDR1, 2 og/eller 3 eller det korresponderende "rammeverk" av den variable regionen. Et antistoffmolekyl av den foreliggende oppfinnelsen kan derfor også være en antistoffkonstruksjon som omfatter, som antigenbindende sete, CDR-ene eller minst én CDR av en gitt variabel region av den glykosylerte, tunge kjeden (V_H). Nevnte korresponderende del av nevnte variable region av den tunge kjeden (V_H) i antistoffkonstruksjonen ifølge oppfinnelsen er glykosylert som definert her, og omfatter for eksempel en glykosylert asparagin (Asn) i det antigenbindende setet. Et eksempel på en slik "isolert del" av en variabel region av den tunge kjeden (V_H) er den her eksemplifiserte CDR2-regionen omfattet i SEKV.ID. NR.: 12 (eller kodet ved nukleinsyresekvens som vist i SEKV.ID. NR.: 11).

30 Videre er betegnelsen "antistoffmolekyl" relatert til modifiserte og/eller endrede antistoffmolekyler, slik som kimære, humaniserte eller fullstendig humaniserte antistoffer.

Nevnte "fullstendig humaniserte antistoff"-molekyler er også karakterisert og beskrevet som "fullstendig humane" antistoffer. Alle disse antistoffene kan bli generert ved metoder kjent i fagfeltet. Ved fagfremvisningsteknologi kan for eksempel rekombinante antistoffmolekyler bli generert på grunn av anvendelsen av *in vitro* modning som er

35

bruken av et fullstendig humant immunoglobulin γ , underklasse-1-rammeverk (IgG1) som beskrevet ved Knappik (2000) J Mol Biol. 296(1), 57-86 og Rauchenberger (2003) J Biol Chem. 278(40), 38194-205.

- 5 Som dokumentert i de vedlagte eksemplene er betegnelsen antistoff relatert til for eksempel et IgG-molekyl og for eksempel til et IgG1. Betegnelsen er også relatert til modifiserte eller endrede monoklonale eller polyklonale antistoffer, så vel som til rekombinant eller syntetisk genererte/syntetiserte antistoffer. Betegnelsen er også relatert til intakte antistoffer, så vel som til antistoff-fragmenter/deler derav, slik som
- 10 separerte lette og tunge kjeder, Fab, Fab/c, Fv, Fab', F(ab')₂. Betegnelsen "antistoff-molekyl" omfatter også antistoffderivater, de bifunksjonelle antistoffene og antistoff-konstruksjoner, slik som enkelkjede Fvs (scFv) eller antistoff-fusjonsproteiner. Også å forestille seg er katalytiske og/eller proteolytiske antistoffer som omfatter et glykosylert V_H-domene, for eksempel en glykosylert V_H-CDR som definert her. Betegnelsen
- 15 "antistoffmolekyl" er også relatert til rekombinant produserte antistoffmolekyler/antistoffkonstruksjoner som kan omfatte, i tillegg til én spesifisitet (for eksempel mot A β /A β), en annen eller en ytterligere spesifisitet. Slike konstruksjoner kan omfatte, men er ikke begrenset til, "bispesifikke eller "trispesifikke" konstruksjoner. Ytterligere detaljer om betegnelsen "antistoffmolekyl" ifølge oppfinnelsen er tilveiebrakt her
- 20 nedenfor.

- Som merket ovenfor er det også forestilt seg et enkeltkjedeantistoff, et kimært antistoff, et CDR-podet antistoff, en bivalent antistoffkonstruksjon, et antistoff-fusjonsprotein, et kryssklonet antistoff eller et syntetisk antistoff omfattende den her definerte glykosyleringen i minst ett antigenbindende sete, for eksempel i minst én variabel region av den
- 25 tunge kjeden definert her og som blir glykosylert. Når for eksempel enkelkjedeantistoffer er produsert er den her definerte "variable regionen av den tunge kjeden" ikke begrenset til en tung kjede i og for seg, men betyr også å være relatert til de korresponderende delene derivert fra en tung kjede av et fullstendig antistoff, for eksempel et fullstendig immunoglobulin, slik som et IgG. Slike deler kan være de korresponderende CDR-ene enten alene eller med deler av deres korresponderende rammeverk. Genetiske varianter av immunoglobulingener er også videre forestilt seg i sammenheng av denne oppfinnelsen. Genetiske varianter av for eksempel immunoglobulintung G-kjede underklasse 1 (IgG1) kan omfatte de G1m(17)- eller G1m(3)-
- 30 allotypiske markørene i CH1-domenet, eller den G1m(1) eller G1m(ikke-1)-allotypiske markøren i CH3-domenet. Her er fortrinnsvis et IgG1 av Gm(17)(z)- og Gm(1)(a)-allotypen benyttet. Antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen omfatter også modifiserte
- 35

eller mutante antistoffer, slik som mutant IgG med forsterket eller attenuert Fc-reseptor-binding eller komplementaktivering. I én utførelsesform er antistoffet tilveiebrakt i overensstemmelse med denne oppfinnelsen et fullstendig humanisert antistoff eller "fullstendig humant" antistoff.

5

Følgelig kan antistoffene ifølge oppfinnelsen også omfatte kryss-klonede antistoffer, det vil si antistoffer omfattende forskjellige antistoffregioner (for eksempel CDR-regioner) fra ett eller flere moder- eller affinitetsoptimaliserte antistoffer som beskrevet her. Disse kryssklonede antistoffene kan være antistoffer i flere forskjellige rammeverk, for eksempel et IgG-rammeverk, for eksempel et (humant) IgG1-, IgG2a- eller et IgG2b-rammeverk. Nevnte antistofframmeverk er for eksempel et mammalsk, for eksempel et humant rammeverk. Domene på de lette og tunge kjedene har den samme generelle strukturen og hvert domene omfatter fire rammeverksregioner, hvis sekvenser er relativt konserverte sammenføydd ved tre hypervariable domer kjent som komplementaritet-

15 bestemmende regioner (CDR1-3).

Som benyttet her er en "human rammeverksregion" relatert til en rammeverksregion som er hovedsakelig identisk (omkring 85 % eller mer, vanligvis 90-95 % eller mer) til rammeverksregionen av et naturlig forekommende, humant immunglobulin. Ramme-

20 verksregionen av et antistoff (for eksempel de kombinerte rammeverksregionene av de utgjørende lette og tunge kjedene) tjener til å posisjonere og stille opp CDR-ene. CDR-ene er hovedsakelig ansvarlige for binding til en epitop til et antigen. Det må bemerkes at ikke bare kryssklonede antistoffer beskrevet her kan bli presentert i et foretrukket (human) antistofframmeverk, men også antistoffmolekyler omfattende CDR-er fra

25 antistoffer som beskrevet her, kan bli introdusert i et immunglobulin rammeverk. Eksempler for rammeverk inkluderer IgG1, IgG2a og IgG2b. Mest foretrukket er humant rammeverk og humane IgG1-rammeverk, slik som den tunge kjeden av et ANTISTOFF som vist i blant annet SEKV.ID. NR.: 6.

30 I én utførelsesform kan ANTISTOFF-isoformer omfatte i den variable tunge kjederegionen en CDR1 omfattende de følgende aminosyrene:

GFTFSSYAMS (SEKV.ID. NR.: 10)

35 Nevnte CDR1 kan bli kodet ved den følgende nukleinsyresekvensen:

ggatttaccttagcagctatgcatgagc (SEKV.ID. NR.: 9)

ANTISTOFF-isoformer kan omfatte følgende **CDR2** i den variable regionen av den tunge kjeden:

5 AINASGTRTYADSVKG (SEKV.ID. NR.: 12)

(N: N-forbundet glykosyleringssete ved Asn-52 av en full tungkjede)

Nevnte **CDR2** kan bli kodet ved den følgende nukleinsyresekvensen:

10

gctattaatgcttctgggtactctgacttattatgctgattctgtaagggt (SEKV.ID. NR.: 11)

N-glykosyleringen i overensstemmelse med denne oppfinnelsen er for eksempel omfattet i nevnte **CDR2**-region og er lokalisert på korresponderende Asn52 av den variable regionen av den tunge kjeden, hvor nevnte variable region (V_H) er kodet ved et nukleinsyremolekyl som vist i SEKV.ID. NR.: 1 og som har en aminosyresekvens som vist i SEKV.ID. NR.: 2.

Videre kan antistoffisoformer omfatte i deres variable tungkjede-region en **CDR3** omfattende den følgende aminosyresekvensen:

20

GKGNTHKPYGYVRYFDV (SEKV.ID. NR.: 14)

Nevnte **CDR3** kan bli kodet ved den følgende nukleinsyresekvensen:

25

ggtaagggttaataactcataagccttatggttatgttcgttattttgatgtt (SEKV.ID. NR.: 13)

ANTISTOFF-isoformer kan omfatte en lett (L) kjede som kan bli karakterisert ved følgende CDR-er:

30

CDR1: RASQSVSSSYLA (SEKV.ID. NR.: 16)

agagcgagccagagcgtgagcagcagctatctggcg (SEKV.ID. NR.: 15)

35 **CDR2:** GASSRAT (SEKV.ID. NR.: 18)

ggcgcgagcagccgtgcaact (SEKV.ID. NR.: 17)

CDR3: LQIYNMPI (SEKV.ID. NR.: 20)

cttcagatttataatatgcctatt (SEKV.ID. NR.: 19)

5

ANTISTOFF-isoformer kan omfatte ytterligere potensielle glykosyleringsseter (som kjent i fagfeltet omfattende Asn-X-Ser/Thr-motivene) i aminosyresekvensen av de tunge kjedene av antistoffet, for eksempel i det godt konserverte glykosyleringssettet ved Asn 306 i den ikke-variable Fc-delen (korresponderende til "Asn297" i Kabat-systemet (Kabat (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. utgave, Bethesda, Md.: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine), nevnte tunge kjeder er eller omfatter sekvensen som tilveiebrakt ovenfor, det vil si i SEKV.ID. NR.: 6 (som kodet ved SEKV.ID. NR.: 5).

10

15 I én utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen er ANTISTOFF-isoformene karakterisert ved at minst ett antigenbindende sete omfatter en glykosylert asparagin (Asn) i den variable regionen av den tunge kjeden (V_H), nevnte V_H er kodet ved

(a) et nukleinsyremolekyl omfattende nukleotidsekvensen vist i SEKV.ID. NR.: 1:

20

CAGGTGGAATTGGTGGAAAGCGGCGGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCG
GCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCT
ATGCGATGAGCTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGG
GTGAGCGCTATTAATGCTTCTGGTACTCGTACTTATTATGCTGATTCT
25 GTTAAGGGTCGTTTTACCATTTACAGTGATAATTCGAAAAACACCCTG
TATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTA
TTGCGCGCGTGGTAAGGGTAATACTCATAAGCCTTATGGTTATGTTTCG
TTATTTTGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA
(SEKV.ID. NR.: 1);

30

(b) et nukleinsyremolekyl som koder for et polypeptid som har aminosyresekvensen som vist i SEKV.ID. NR.: 2:

35

QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV
SAINASGTRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGKGNTHKPYGYVRYFDVWGQGTLVTVSS (SEKV.ID. NR.: 2; "N" i

uthevet tekst representerer det her definerte Asn på posisjon 52 av den variable regionen av den tunge kjeden);

- 5 (c) et nukleinsyremolekyl som hybridiserer til nukleinsyremolekylet av (a) eller (b) og som koder for et polypeptid som er i stand til å binde til β -A4-peptidet/A β 4 som vist i den følgende aminosyresekvensen

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
(SEKV.ID. NR.: 3)

10

eller et fragment derav som omfatter minst 15 aminosyrer;

- 15 (d) et nukleinsyremolekyl som hybridiserer til nukleinsyremolekylet av (a) eller (b) og som koder for et polypeptid som er i stand til å binde til minst to regioner av β -A4-peptidet/A β 4 som vist i den følgende aminosyresekvensen

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
(SEKV.ID. NR.: 3)

20

eller til minst to regioner av et fragment av SEKV.ID. NR.: 3 som omfatter minst 15 aminosyrer

- 25 hvorved nevnte to regioner på β -A4-peptidet/A β 4 eller nevnte fragment derav omfatter aminosyrene på posisjon 3 til 6 og på posisjon 18 til 26 av SEKV.ID. NR.: 3; eller

- (e) en nukleinsyresekvens som er degenerert til en nukleinsyresekvens som definert i enhver av (a) til (d).

- 30 Fagpersonen er klar over det faktum at betegnelsen "nukleinsyremolekyl som hybridiserer til nukleinsyremolekylet av (a) eller (b) og som koder for et polypeptid som er i stand til å binde til minst to regioner på β -A4-peptidet/A β 4" som benyttet her, er relatert til en kodende tråd av et dobbelttrådet nukleinsyremolekyl hvorved den ikke-kodende tråden hybridiserer til det ovenfor identifiserte nukleinsyremolekylet (a) og (b).

35

Som bemerkt ovenfor kan det rensede antistoffmolekylet omfattende den her definerte Asn-glykosyleringen, blant annet bli karakterisert og beskrevet som et antistoffmolekyl

hvor den variable regionen omfattende en glykosylert Asn er omfattet i en tung kjede valgt fra gruppen bestående av:

- 5 (a) et tungkjede-polypeptid kodet ved et nukleinsyremolekyl som vist i SEKV.ID. NR.: 5, 23 eller 25;
- (b) et tungkjede-polypeptid som har aminosyresekvensen som vist i SEKV.ID. NR.: 6 eller 26;
- 10 (c) et tungkjede-polypeptid kodet ved et nukleinsyremolekyl som hybridiserer til nukleinsyremolekylet av (a) og som koder for et polypeptid som er i stand til å binde til β -A4-peptidet/A β 4 som vist i den følgende aminosyresekvensen

15 DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
(SEKV.ID. NR.: 3)

eller et fragment derav som omfatter minst 15 aminosyrer; eller

- 20 (d) et tungkjede-polypeptid kodet ved et nukleinsyremolekyl som hybridiserer til nukleinsyremolekylet av (a) og som koder for et polypeptid som er i stand til å binde minst to regioner på β -A4-peptidet/A β 4 som vist i den følgende aminosyresekvensen

25 DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
(SEKV.ID. NR.: 3)

eller til minst to regioner av et fragment av SEKV.ID. NR.: 3 som omfatter minst 15 aminosyrer

- 30 hvorved nevnte to regioner av β -A4-peptidet/A β 4 eller nevnte fragment derav omfatter aminosyrene på posisjon 3 til 6 og på posisjon 18 til 26.

Det ovenfor identifiserte antistoffet (for eksempel et eksemplifisert antistoff ifølge oppfinnelsen) kan også omfatte en L-kjede med den følgende aminosyresekvensen:

35 DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR
ATGVPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFATYYCLQIYNMPITFGQGTVKVEIKRTV

AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEKV.ID. NR.: 22)

- 5 eller en L-kjede som for eksempel kodet ved den følgende nukleinsyresekvensen:

gatactgtgctgacccagagccccggcgaccctgagcctgtctccggcggaacgtgacccctgagctgcagagcgagcca
gagcgtgagcagcagctatctggcgtgtaccagcagaaaccaggtcaagcaccgcgtctattaatttatggcgcgagcagc
cgtgcaactgggggtcccggcgcgttttagcggctctggatccggcacggattttaccctgaccattagcagcctggaacctga
10 agactttgcgactattattgccttcagattataatatgcctattacctttggccagggtacgaaagttgaaattaaacgtacgggtg
gctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgctgctgtaataacttct
atcccagagaggccaaagtacagtggaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgctcacagagcag
gacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaagcagactacgagaaacacaaagtctacgc
ctgcgaagtacccatcagggcctgagctcgcccgctcacaagagcttcaacaggggagagtgttag (SEKV.ID.
15 NR.: 21).

Som beskrevet ovenfor kan det rensede antistoffmolekylet omfattende den her definerte
Asn-glykosyleringen i den tunge kjeden, ytterligere omfatte en lett kjede valgt fra
gruppen bestående av:

20

- (a) et lettkjede-polypeptid kodet ved et nukleinsyremolekyl som vist i SEKV.ID.
NR.: 7, 21, 24 eller 27;
- (b) et lettkjede-polypeptid som har aminosyresekvensen som vist i SEKV.ID. NR.:
25 8, 22 eller 28;
- (c) et lettkjede-polypeptid kodet ved et nukleinsyremolekyl som hybridiserer til
nukleinsyremolekylet (a) og som koder for et polypeptid som er i stand til å
binde til β -A4-peptidet/A β 4 som vist i den følgende aminosyresekvensen

30

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGGVIA
(SEKV.ID. NR.: 3)

eller et fragment derav som omfatter minst 15 aminosyrer; eller

35

- (d) et lettkjede-polypeptid kodet ved et nukleinsyremolekyl som hybridiserer til
nukleinsyremolekylet (a) og som koder for et polypeptid som er i stand til å

binde til minst to regioner på β -A4-peptidet/A β 4 som vist i den følgende aminosyresekvensen

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGGVIA
(SEKV.ID. NR.: 3)

5

eller til minst to regioner av et fragment av SEKV.ID. NR.: 3 som omfatter minst 15 aminosyrer.

- 10 Betegnelsen "hybridisering" eller "hybridiserer" som benyttet her i sammenheng av nukleinsyremolekyler/DNA-sekvenser kan relatere til hybridiseringer under stringente eller ikke-stringente forhold. Om ikke videre spesifisert er forholdene fortrinnsvis ikke-stringente. Nevnte hybridiseringsforhold kan bli etablert i henhold til konvensjonelle protokoller beskrevet i for eksempel Sambrook, Russell "Molecular Cloning, A
- 15 Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001); Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989), eller Higgins og Hames (Eds.) "Nukleinsyre hybridization, a practical approach" IRL Press Oxford, Washington DC, (1985).
- 20 Reguleringen av forhold er godt kjent for fagpersoner og kan bli bestemt i henhold til protokoller beskrevet i fagfeltet. Deteksjonen av bare signifikant hybridiserende sekvenser vil derfor vanligvis kreve stringente hybridiserings- og vaskeforhold slik som 0,1 x SSC, 0,1 % SDS ved 65 °C. Ikke-stringente hybridiseringsforhold for deteksjonen av homologer eller ikke eksakt komplementære sekvenser kan bli satt ved 6 x SSC, 1 %
- 25 SDS ved 65 °C. Som er godt kjent utgjør lengden av proben og sammensetningen av nukleinsyren som skal bli bestemt, videre parametere for hybridiseringsforholdene. Merk at variasjoner av forholdene ovenfor kan bli utført gjennom inkluderingen og/eller substitusjonen av alternative, blokkerende reagenser benyttet for å undertrykke bakgrunn i hybridiseringseksperimenter. Typiske blokkerende reagenser inkluderer
- 30 Denhardts reagens, BLOTTO, heparin, denaturert laksesperm-DNA og kommersielt tilgjengelige merkevareformuleringer. Inkluderingen av spesifikke, blokkerende reagenser kan kreve modifikasjon av hybridiseringsforholdene beskrevet ovenfor på grunn av problemer med forenlighet. Hybridisering av nukleinsyremolekyler omfatter også fragmenter av de ovenfor beskrevne molekyler. Slike fragmenter kan representere nukleinsyresekvenser som koder for et ikke-funksjonelt antistoffmolekyl eller et
- 35 ikke-funksjonelt fragment derav eller for en CDR som definert her, og som har en lengde på minst 12 nukleotider, fortrinnsvis minst 15, mer foretrukket minst 18, mer

foretrukket minst 21 nukleotider, mer foretrukket minst 30 nukleotider, enda mer foretrukket minst 40 nukleotider og mest foretrukket minst 60 nukleotider. Videre inkluderer nukleinsyremolekyler som hybridiserer med ethvert av de ovenfor nevnte nukleinsyremolekylene, også komplementære fragmenter, derivater og alleliske varianter av disse molekylene. Et hybridiseringskompleks refererer i tillegg til et kompleks mellom to nukleinsyresekvenser i kraften av dannelsen av hydrogenbindinger mellom komplementære G- og C-baser og mellom komplementære A- og T-baser; disse hydrogenbindingene kan bli ytterligere stabilisert ved basestablingsinteraksjoner. De to komplementære nukleinsyresekvensene hydrogenbinder i en antiparallell konfigurasjon.

Et hybridiseringskompleks kan bli dannet i løsning (for eksempel Cot- eller Rot-analyse) eller mellom én nukleinsyresekvens til stede i løsning og en annen nukleinsyresekvens immobilisert på en fast støtte (for eksempel membraner, filtre, ships, nåler eller glass-slides, hvortil for eksempel celler har blitt fiksert). Betegnelsene komplementære og komplementaritet refererer til den naturlige bindingen av polynukleotider under tillatelige salt- og temperaturforhold ved base-paring. Sekvensen "A-G-T" binder for eksempel til den komplementære sekvensen "T-C-A". Komplementaritet mellom to enkelttrådede molekyler kan være "partiell" hvor bare noen av nukleinsyrene binder, eller den kan være fullstendig når total komplementaritet eksisterer mellom enkelttrådede molekyler. Graden av komplementaritet mellom nukleinsyretråder har

signifikante effekter på effekten og styrken av hybridisering mellom nukleinsyretråder. Dette er av spesiell viktighet i amplifiseringsreaksjoner som avhenger av binding mellom nukleinsyretråder.

Betegnelsen "hybridiserende sekvenser" refererer fortrinnsvis til sekvenser som viser en sekvensidentitet på minst 40 %, fortrinnsvis minst 50 %, mer foretrukket minst 60 %, enda mer foretrukket minst 70 %, spesielt foretrukket minst 80 %, mer spesielt foretrukket minst 90 %, enda mer spesielt foretrukket minst 95 % og mest foretrukket minst 97 % identitet med en nukleinsyresekvens som beskrevet ovenfor kodende for et antistoffmolekyl. Betegnelsen "hybridiserende sekvenser" refererer videre fortrinnsvis til sekvenser som koder for et antistoffmolekyl som har en sekvensidentitet på minst 40 %, fortrinnsvis minst 50 %, mer foretrukket minst 60 %, enda mer foretrukket minst 70 %, spesielt foretrukket minst 80 %, mer spesielt foretrukket minst 90 %, enda mer spesielt foretrukket minst 95 % og mest foretrukket minst 97 % identitet med en aminosyresekvens av antistoffmolekylet som beskrevet her ovenfor.

I overensstemmelse med den foreliggende oppfinnelsen refererer betegnelsen "identisk" eller "prosent identitet" i sammenhengen av to eller flere nukleinsyre eller aminosyre-

sekvenser, til to eller flere sekvenser eller undersekvenser som er de samme, eller som har en spesifisert prosentandel av aminosyresiduer eller nukleotider som er de samme (for eksempel 60 % eller 65 % identitet, fortrinnsvis 70-95 % identitet, mer foretrukket minst 95 % identitet) når sammenlignet og oppstilt for maksimal overensstemmelse

5 over et vindu av sammenligning, eller over en angitt region som målt ved å benytte en sekvenssammenligningsalgoritme som kjent i fagfeltet, eller ved manuell oppstilling og visuell inspeksjon. Sekvenser som for eksempel har 60 % til 95 % eller større sekvensidentitet, er betraktet til å være vesentlig identiske. En slik definisjon gjelder også komplementet av en testsekvens. Fortrinnsvis eksisterer den beskrevne identiteten over

10 en region som er minst omkring 15 til 25 aminosyrer eller nukleotider i lengde, mer foretrukket over en region som er omkring 50 til 100 aminosyrer eller nukleotider i lengde. Fagpersoner vil kjenne til hvordan å bestemme prosent identitet mellom/blant sekvenser ved å for eksempel benytte algoritmer slik som dem basert på CLUSTALW computerprogram (Thompson Nucl. Acids Res. 2 (1994), 4673-4680) eller FASTDB

15 (Brutlag Comp. App. Biosci. 6 (1990), 237-245) som kjent i fagfeltet.

Selv om FASTDB-algoritmen vanligvis ikke betrakter interne, ikke-tilpassede delelser eller tilføyinger i sekvenser, det vil si åpninger, i sin kalkulasjon, kan dette bli korrigert manuelt ved å unngå en overestimering av % identitet. CLUSTALW tar

20 imidlertid sekvensåpninger i betraktning i sine identitetskalkulasjoner. Også tilgjengelig for fagpersoner er BLAST- og BLAST 2.0-algoritmene (Altschul, Nucl. Acids Res. 25 (1997), 3389-3402; Altschul, J. Mol. Evol. 36 (1993), 290-300; Altschul, J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410). BLASTN-programmet for nukleinsyresekvenser benytter som standarder en ordlengde (W) på 11, en forventning (E) på 10, M = 5, N = 4, og en

25 sammenligning av begge tråder. For aminosyresekvenser benytter BLASTP-programmet som standarder en ordlengde (W) på 3, og en forventning (E) på 10. BLOSUM62-scoringsmatrisen (Henikoff Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89, (1989) 10915) benytter oppstillinger (B) på 50, forventning (E) på 10, M = 5, N = 4, og en sammenligning av begge tråder.

30 Videre er den foreliggende oppfinnelsen også relatert til nukleinsyremolekyler hvor sekvensene er degenerert i sammenligning med sekvensen av det ovenfor beskrevne, hybridiserende molekylet. Når benyttet i overensstemmelse med den foreliggende oppfinnelsen betyr betegnelsen "er degenerert som et resultat av den genetiske koden" at

35 på grunn av overfloden av den genetiske koden koder forskjellige nukleotidsekvenser for den samme aminosyren.

For å bestemme hvorvidt et aminosyresresidu eller nukleotidresidu i en gitt antistoff-sekvens korresponderer til en bestemt posisjon i aminosyresekvensen eller nukleotid-sekvensen av enhver av for eksempel SEKV.ID. NR.: 1, 5, 23 og 25, kan fagpersonen benytte midler og fremgangsmåter godt kjent i fagfeltet, for eksempel oppstillinger, enten manuelt eller ved å benytte computerprogrammer slik som dem nevnt videre nedenfor i sammenheng med definisjonen av betegnelsen "hybridisering" og grader av homologi.

For eksempel kan BLAST 2.0 som står for Basic Local Alignment Search Tool BLAST (Altschul (1997), loc. cit.; Altschul (1993), loc. cit.; Altschul (1990), loc. cit.), bli benyttet for å søke for lokale sekvensoppstillinger. BLAST som diskutert ovenfor, produserer oppstillinger av både nukleotid og aminosyresekvenser for å bestemme sekvenslikhet. På grunn av den lokale naturen av oppstillingene er BLAST spesielt nyttig i å bestemme eksakte tilpasninger eller i å identifisere lignende sekvenser. Den fundamentale enheten av BLAST-algoritmeresultat er High-scoring Segment Pair (HSP). En HSP består av to sekvensfragmenter av vilkårlige, men like lengder hvis oppstilling er lokalt maksimal og for hvilke oppstillingsskåringen tilfredsstiller eller overskrider en terskel eller avskjæringsscore satt ved brukeren. BLAST-metoden er å søke for HSP-er mellom en spørsmålssekvens og en databasesekvens, for å evaluere den statistiske signifikansen av alle tilpasninger funnet og å rapportere bare de tilpasningene som tilfredsstiller den brukervalgte terskelen av signifikans. Parameteren E etablerer den statistisk signifikante terskelen for å rapportere databasesekvenstilpasninger. E er tolket som den øvre grensen for den forventede hyppigheten av tilfeldig forekomst av en HSP (eller sett av HSP-er) i sammenhengen av det fullstendige databasesøket. Enhver databasesekvens hvis tilpasning tilfredsstiller E, er rapportert i programresultatet.

Analoge computerteknikker ved å benytte BLAST (Altschul (1997), loc. cit.; Altschul (1993), loc. cit.; Altschul (1990), loc. cit.) er benyttet for å søke identiske eller relaterte molekyler i nukleotiddatabaser slik som GenBank eller EMBL. Denne analysen er mye raskere enn multiple membranbaserte hybridiseringer. Sensitiviteten av computersøket kan i tillegg bli modifisert for å bestemme hvorvidt enhver bestemt tilpasning er kategorisert eksakt eller lik. Basisen av søket er produktskåringen som er definert som:

$$\frac{\% \text{ sekvensidentitet} \times \% \text{ maksimal BLAST-scoring}}{100}$$

35

100

og den tar i betraktning både graden av likhet mellom to sekvenser og lengden av

sekvenstilpasningen. Med en produktscoring på 40 vil for eksempel tilpasningen være eksakt innenfor en 1-2 % feil; og ved 70 vil tilpasningen være eksakt. Lignende molekyler er vanligvis identifisert ved å selekttere de som viser produktscoringer mellom 15 og 40, selv om lavere scoringer kan identifisere relaterte molekyler. Et annet
 5 eksempel på et program i stand til å generere sekvensoppstillinger, er CLUSTALW-computerprogrammet (Thompson, Nucl. Acids Res. 2 (1994), 4673-4680) eller FASTDB (Brutlag Comp. App. Biosci. 6 (1990), 237-245), kjent i fagfeltet.

I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen glykosylerte
 10 ANTISTOFF-isoformer hvor glykosyleringen på Asn i V_H-regionen er valgt fra gruppen bestående av

- (a) en sukkerstruktur av den biantenære komplekstypen uten kjernefucosylering;
- 15 (b) en sukkerstruktur av den biantenære hybridtypen;
- (c) en sukkerstruktur av den biantenære oligomannosetypen; og
- (d) en biantenær struktur av enhver av strukturene som tilveiebragt i vedlagte figur 5
 20 eller vedlagte figur 27.

Den korresponderende sukkerstrukturen omfatter i én utførelsesform av antistoffet/antistoffene av denne oppfinnelsen ikke en kjernefucosylering.

25 Den korresponderende N-glykosyleringen kan hovedsakelig bestå av sukkerstrukturer av den biantenære komplekstypen ($\geq 75\%$; hovedsakelig 80-90 %) uten kjernefukosylering og sterkt sialidert med opptil 80 % av antenner. Mindre sukkerstrukturer tilhører henholdsvis den biantenære hybrid- og oligomannosetypen ($\leq 25\%$) og er også vist i vedlagte figurer 5 og 27. Glykosyleringsstrukturene i den variable regionen er
 30 resistente for kloyving med N-glykosidase F fra proteinet (aminosyrepolypeptid).

De dominante, komplekse, biantenære sukkerstrukturene kan være videre karakterisert
 - ved å inneholde én eller to sialinsyrer festet til enten den ene eller andre antennen eller til begge antennene. Sialinsyren er av N-acetylneuraminsyretypen
 35 og er mest sannsynlig bundet i alfa-2,3-forbindelse til de terminale beta-1,4-forbundne galaktosene.

- ved å mangle kjernefukosylering, det vil si mangle fukoseresiduet festet i alfa-1,6-forbindelsen til det innerste N-acetylglukosaminet ved den reduserende enden av sukkerkjeden.
- 5 Hybridsukkerstrukturene kan være videre karakterisert
 - ved å inneholde en kompleks type antenne (en laktosaminylenhet (GlcNAc-Gal) festet til kjernesukkerstrukturen) som én arm av den biantenære strukturen. Denne armen inneholder hovedsakelig N-acetylneuraminsyre festet til den terminale beta-1,4-forbundne galaktosen.
 - 10 - ved å ha én opp til 3 ytterligere mannosesubenheter festet til kjernesukkerstrukturen som den andre antennen.
 - ved å mangle kjernefukosylering, det vil si mangle fukoseresiduet festet i alfa-1,6-forbindelsen til det innerste N-acetylglukosaminet ved den reduserende enden av sukkerkjeden.
 - 15

Oligomannosetype-sukkerstrukturene kan være ytterligere karakterisert

- 20 - ved å inneholde 4 (Man4 →GlcNAc2), 5 (Man5→GlcNAc2) eller 6 (Man6→GlcNAc2) mannosesubenheter i den fullstendige sukkerstrukturen, det vil si inkluderende 3 forgrenede mannosesubenheter til stede i en typisk N-forbundet kjernesukkerstruktur.
- 25 - ved å mangle kjernefukosylering, det vil si mangle fukoseresiduet festet i alfa 1→6-forbindelse til det innerste N-acetylglukosaminet ved den reduserende enden av sukkerkjeden.

En sammensetning er tilveiebragt som omfatter et antistoffmolekyl som blir
 30 karakterisert ved at ett antigenbindende sete omfatter en glykosylert asparagin (Asn) i den variable regionen av den tunge kjeden (V_H) og et antistoffmolekyl som blir karakterisert ved at to antigenbindende seter omfatter en glykosylert asparagin (Asn) i den variable regionen av den tunge kjeden (V_H), det vil si en sammensetning omfattende monoglykosylert ANTISTOFF og dobbeltglykosylert ANTISTOFF, og er heretter
 35 referert til som ANTISTOFFSAMMENSETNING. Betegnelsen ANTISTOFFSAMMENSETNING er også relatert til sammensetninger som omfatter molekyler omfattende minst én glykosylert V_H -region som definert her eller minst én

glykosylert CDR av nevnte V_H-region, hvorved nevnte molekyler blant annet kan være immunglobuliner eller immunglobulinisoformer og modifikasjoner som beskrevet ovenfor. Nevnte sammensetning kan for eksempel omfatte enkeltkjedeantistoffer (scFv-er) eller bispesifikke molekyler omfattende glykosylerte V_H-deriverte CDR-regioner.

- 5 Ytterligere definisjoner av ANTISTOFFSAMMENSETNINGEN av denne oppfinnelsen er tilveiebrakt nedenfor.

ANTISTOFFSAMMENSETNINGEN omfatter ikke eller omfatter bare i en veldig liten grad "i V_H ikke-glykosylerte" antistoffmolekyler, det vil si antistoffer som ikke omfatter
10 den her definerte glykosyleringen i den variable regionen, spesielt den variable delen av den tunge kjeden (V_H).

I sammenheng av denne oppfinnelsen og spesielt i sammenheng av antistoffblandingene tilveiebragt her, betyr betegnelsen "omfatter ikke eller omfatter bare i en
15 veldig lav utstrekning ikke-glykosylerte antistoffmolekyler" at ANTISTOFFSAMMENSETNINGEN omfatter mindre enn 10 %, for eksempel mindre enn 5 %, for eksempel mindre enn 4 %, for eksempel mindre enn 3 %, for eksempel mindre enn 2 %, for eksempel mindre enn 1 %, for eksempel mindre enn 0,5 eller mindre av den/en ikke-glykosylerte isoformen som beskrevet her.

20

I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen følgelig et antistoffpreparat omfattende monoglykosylerte og/eller dobbeltglykosylerte antistoffer (nevnte glykosylering er lokalisert i den variable regionen av den tunge kjeden) og som er fri for antistoffmolekyler uten glykosylering i den variable regionen.

25

Igjen er betegnelsen "fri for antistoffmolekyler uten glykosylering i den variable regionen" relatert til antistoffpreparater/antistoffblandinger/antistoffsamlinger som omfatter høyst 10 %, for eksempel høyst 5 %, for eksempel høyst 4 %, for eksempel høyst 3 %, for eksempel høyst 2 %, for eksempel høyst 1 %, for eksempel høyst 0,5 %, for eksempel høyst 4 %, for eksempel høyst 3 %, for eksempel høyst 2 %, for eksempel
30 høyst 1 %, for eksempel høyst 0,5 %, for eksempel høyst 0,3 %, for eksempel høyst 0,2 % ikke-glykosylerte isoformer som beskrevet her.

Det er også beskrevet en sammensetning som ikke omfatter mer enn 0,5 %
35 antistoffisoformer som er ikke-glykosylerte i deres variable regioner som for eksempel er ikke-glykosylerte i den variable regionen av den tunge kjeden.

Som bemerket ovenfor i én utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen, er en blanding av mono- og dobbeltglykosylerte antistoffer, for eksempel immunglobuliner, tilveiebragt, hvor nevnte blanding er fri for antistoffmolekyler uten glykosylering i den variable regionen. Antistoffer frie for en slik posttranslasjonell modifikasjon i den

5 variable regionen, for eksempel i begge variable regioner av den tunge kjeden (begge (V_H)-regioner), er i sammenheng av denne oppfinnelsen betraktet som "ikke-glykosylert form" omfattende ingen glykosylering i den variable regionen av den tunge kjeden. Denne "ikke-glykosylerte formen" kan likevel ikke desto mindre omfatte (a) glykosylering(er) i den konstante regionen (C-regionen) av antistoffet, for eksempel og

10 mest alminnelig ved det godt konserverte glykosyleringssettet av Fc-delen, spesielt asparagin (Asn) 306 i den ikke-variable/konstante Fc-delen som definert her.

De glykosylerte ANTISTOFF-isoformene på egenhånd eller som en kombinasjon av monoglykosylerte og dobbeltglykosylerte isoformer er veldig nyttige og fordelaktige

15 terapeutisk antistoffpreparater for behandlingen av Alzheimers sykdom (AD) og andre amyloidrelaterte lidelser slik som Downs syndrom, arvelig cerebral blødning med amyloidose hollandsk type, Parkinsons sykdom, ALS (amyotrofisk lateral sklerose), Creutzfeldt Jakob sykdom, HIV-relatert demens og motorisk neuropati. De glykosylerte antistoffisoformene på egenhånd eller som en kombinasjon av monoglykosylerte og

20 dobbeltglykosylerte isoformer er også unike diagnostiske verktøy.

Begge glykosylerte isofomer som beskrevet her, viser forbedret og sterkt effektiv hjernepenetrering *in vivo*. Effektiv hjernepenetrering og spesifikk binding til amyloid- β -plakk kan bli demonstrert i PS2APP-mus, en musemodell for AD-relatert amyloidose.

25 Videre kan forbedret spesifisitet for genuine, humane amyloid- β -plakk ved immunhistokjemiske farginger *in vitro* med signifikant redusert uspesifikk klebrighet, bli detektert. Den minimale, effektive konsentrasjonen for forenlig farging av humane amyloid- β -plakk ble bestemt til å være 10 ng/ml, som dokumentert i de vedlagte eksemplene.

30 Som dokumentert i de vedlagte eksemplene viste separasjonen og karakteriseringen av forskjellig glykosylerte antistoffer, for eksempel immunglobuliner at glykosyleringen av den variable regionen av den tunge kjeden har en overraskende påvirkning på antigen-bindingen til A β -peptider, den diagnostiske verdien, den farmakologiske profilen og

35 funksjonelle aktiviteten. De rensede antistoffmolekylene kan bli underkastet MS-analytiske metoder, bindingsstudier (Biocore) og epitopkartlegging (Pepspot-analyse) binding til løselig A β , dissosiasjon av aggregert A β og mikroskopisk analyse av binding

til β -amyloidplakk *in vivo* og *in vitro*.

I én utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen er det rensede ANTISTOFFET eller ANTISTOFFSAMMENETNINGEN i stand til spesifikt å gjenkjenne β -A4-peptidet/A β 4.

Følgelig, og som beskrevet her, er rensed ANTISTOFF eller ANTISTOFFSAMMEN-
SETNING relatert i en spesifikk utførelsesform til ANTISTOFF eller ANTISTOFF-
SAMMENSETNING i stand til spesifikt å gjenkjenne to regioner (den N-terminale
regionen og den sentrale/midtre delen) av A β /A β 4.

Betegnelsen "spesifikk gjenkjenning" betyr i overensstemmelse med denne oppfin-
nelsen at antistoffmolekylet er i stand til å spesifikt interagere med og/eller binde til
minst to aminosyrer av hver av de to regionene av β -A4 som definert her. Nevnte
betegnelse er relatert til spesifisiteten av antistoffmolekylet, det vil si til dets evne til å
diskriminere mellom de spesifikke regionene av β -A4-peptidet som definert her og en
annen, ikke relatert region av β -A4-peptidet eller et annet, ikke APP-relatert protein/-
peptid (relatert) testpeptid. Følgelig kan spesifisitet bli bestemt eksperimentelt ved
metoder kjent i fagfeltet og metoder som angitt og beskrevet her. Slike metoder
omfatter, men er ikke begrenset til, Western blot, ELISA-, RIA-, ECL-, IRMA-tester og
peptidskanninger. Slike metoder omfatter også bestemmelsen av K_D -verdier som blant
annet illustrert i de vedlagte eksemplene. Peptidskannet (pepspot-test) er rutinemessig
benyttet for å kartlegge lineære epitoper i et polypeptidantigen. Den primære sekvensen
av polypeptidet er suksessivt syntetisert på aktivert cellulose med peptider overlappende
på hverandre. Gjenkjenningen av bestemte peptider ved antistoffet som skal bli testet
for dets evne til å detektere eller gjenkjenne et spesifikt antigen/epitop, er skåret ved
rutinemessig fargeutvikling (sekundært antistoff med et enzym eller en farge, slik som
pepperrotperoksidase eller 4-klornaftol eller hydrogenperoksid) ved en kjemo-
luminescens reaksjon eller lignende middel kjent i fagfeltet. I tilfellet av blant annet
kjemiluminescensreaksjoner eller anvendelsen av et sekundært fluorescerende antistoff,
kan reaksjonen bli kvantifisert. Om antistoffet reagerer med et bestemt sett av over-
lappende peptider kan man utlede den minimale sekvensen av aminosyrer som er
nødvendig for reaksjon; se illustrative eksempler tilveiebrakt i henhold til denne
oppfinnelsen.

Den samme testen kan vise to distanserte klynger av reaktive peptider som indikerer gjenkjenningen av en diskontinuerlig, det vil si konformasjonsmessig epitop i det antigene polypeptidet (Geysen (1986), Mol. Immunol. 23, 709-715).

- 5 I tillegg til pepspot-testen kan standard ELISA-test bli utført. Som demonstrert i de vedlagte eksemplene kan små heksapeptider bli koblet til et protein og belagt på en immunplate og reagert med antistoffer som skal bli testet. Scoringen kan bli utført ved standard fargeutvikling (for eksempel sekundært antistoff med pepperrotperoksidase og tetrametylbenzidin med hydrogenperoksid). Reaksjonen i bestemte brønner er scoret
 10 ved den optiske tettheten, for eksempel ved 450 nm. Vanlig bakgrunn (= negativ reaksjon) kan være 0,1 OD, vanligvis kan positiv reaksjon være 1 OD. Dette betyr at forskjellen (forhold) positiv/negativ kan være mer enn 10 ganger. Ytterligere detaljer er gitt i de vedlagte eksemplene. I tillegg er kvantitative metoder for bestemmelse av spesifisiteten og evnen av "spesifikk gjenkjenning" de her definerte to regionene av β -
 15 A4-peptidet gitt her nedenfor.

- Betegnelsen "to regioner av β -A4-peptidet" er relatert til to regioner som er relatert til for eksempel de N-terminale aminosyrene 3 til 6 og en sentral/middels epitop på posisjonsaminosyrer 18 til 24 av SEKV.ID. NR.: 3 (β -A4-peptidet). Som dokumentert i
 20 de vedlagte kravene detekterer spesielt den dobbeltglykosylerte ANTISTOFF A-isoformen tilveiebrakt og eksemplifisert her (se vedlagte eksempler), to deler av A β -molekylet, den første delen omfattende aminosyre 1 til 10 i den N-terminale enden og den andre delen omfattende aminosyrer 17 til 26 av den sentrale/midtre delen av A β (som vist i SEKV.ID. NR.: 3). I antistoffblandingen tilveiebrakt her og omfattende de
 25 mono-, så vel som de dobbeltglykosylerte isoformene av antistoffene som tilveiebrakt her, kan følgelig de to regionene også noe høyere så omfatte for eksempel aminosyrer 1 til 10 (eller til 11 eller til 12) av en kortere del derav og aminosyrer 17 til 26 (eller aminosyrer 16 til 27) eller en kortere del omfattet mellom aminosyrer 17 til 26, slik som for eksempel aminosyrene 19 til 26 eller 20 til 26). Betegnelsen " β -A4-peptid" i
 30 sammenheng med denne oppfinnelsen er relatert til den her ovenfor beskrevne A β 39, A β 41, A β 43, spesielt til A β 40 og A β 42. A β 42 er også avbildet i vedlagte SEKV.ID. NR.: 3. Det må bemerkes at betegnelsen "to regioner av β -A4-peptidet" også er relatert til en "epitop" og/eller en "antigenisk determinant" som omfatter de her definerte to regionene av β -A4-peptidet eller deler derav. I overensstemmelse med denne opp-
 35 finnelsen er nevnte to regioner av β -A4-peptidet separert (på nivået av aminosyre-sekvensen) i den primære strukturen av β -A4-peptidet ved minst én aminosyre, for eksempel ved minst to aminosyrer, for eksempel ved minst tre aminosyrer, for eksempel

- ved minst fire aminosyrer, for eksempel ved minst fem aminosyrer, for eksempel ved minst seks aminosyrer. Som vist her og som dokumentert i de vedlagte kravene, detekterer/interagerer de oppfunne antistoffene/antistoffmolekylene med og/eller binder til to regioner av β -A4-peptidet som definert her, hvorved nevnte to regioner er
- 5 separert (på det primære strukturnivået av aminosyresekvensen) ved minst én aminosyre og hvor sekvensen som separerer nevnte to regioner/"epitop" kan omfatte mer enn sju aminosyrer, mer enn 8 aminosyrer, mer enn 10 aminosyrer eller til og med omkring 14 aminosyrer.
- 10 Betegnelsen "to regioner av β -A4-peptidet" kan også være relatert til en konformasjonsmessig epitop eller en diskontinuerlig epitop bestående av nevnte to regioner eller deler derav; se også Geysen (1986), loc. cit. I sammenheng av denne oppfinnelsen er en konformasjonsmessig epitop definert ved to eller flere atskilte aminosyresekvenser separert i den primæresekvensen som kommer sammen på overflaten når polypeptidet
- 15 foldes til det native proteinet (Sela, (1969) Science 166, 1365 og Laver, (1990) Cell 61, 553-6). Antistoffmolekylene av den foreliggende oppfinnelsen er forestilt seg å spesifikt binde til/interagere med en konformasjonsmessig epitop(er) bestående av og/eller omfattende de to regionene av β -A4 beskrevet her eller deler derav som angitt her nedenfor. "Antistoffmolekylene" av den foreliggende oppfinnelsen er tenkt til å omfatte en
- 20 samtidig og uavhengig dobbel spesifisitet til (a) et aminosyrestrekke omfattende aminosyrer 1 til 11 (eller (a) del(er) derav) av β -A4 og (b) et aminosyrestrekke omfattende aminosyrer 16 til 27 (eller (a) del(er) derav av β -A4(SEKV.ID. NR.: 3). Fragmenter eller deler av disse strekkene omfatter minst to, i de fleste tilfeller minst tre, aminosyrer.
- 25 Antistoffmolekyler, for eksempel immunoglobuliner, kan blant annet bli uttrykt i tre systemer; a) i transfekterte, humane, embryonale nyreceller inneholdende Epstein barr-virus-kjerneantigenet (HEK 293 EBNA, Invitrogen), b) i transient transfekterte, kinesiske hamsterovarieceller (CHO), og c) i stabilt transfekterte CHO-cellelinjer (CHO K1 og CHO K1 SV, Lonza Biologics). De tre forskjellige antistoffmolekylene (ikke-,
- 30 mono- eller dobbelt-glykosylerte) kan bli separert ved spesifikke rensetrinn, omfattende protein A-rensing, kationbytterkromatografi, så vel som størrelseskolonneseparasjon som detaljert beskrevet nedenfor.

I én utførelsesform av oppfinnelsen er antistoffmolekylet rekombinant produsert i for eksempel i en CHO-celle eller i en HEK 293-celle, fortrinnsvis CHO-celler. I en bestemt utførelsesform kan de ovenfor identifiserte glykosyleringsmønstrene bli oppnådd etter ekspresjon i CHO-celler. CHO-celler er veldig kjent i fagfeltet og omfatter

blant annet CHO-cellene som benyttet i den eksperimentelle delen, slik som CHO K1 eller CHO K1 SV-celler. Alminnelig benyttede HEK 293-celler er HEK 293 EBNA.

Den rekombinante ekspresjonen av det glykosylerte, oppfunne antistoffet er utført som vist i eksemplene i et eukaryot ekspresjonssystem, spesielt i CHO-celler. Ytterligere ekspresjonsceller, det vil si eukaryote celler, kan imidlertid bli forestilt seg. Eukaryote celler omfatter for eksempel sopp eller dyreceller. Eksempler på egnede soppceller er gjærceller, for eksempel dem av slekten *Saccharomyces*, for eksempel dem av arten *Saccharomyces cerevisiae*. Egnede dyreceller er for eksempel insekts-celler, vertebrate celler, for eksempel mammalske celler, slik som for eksempel NSO, MDCK, U2-OSHela, NIH3T3, MOLT-4, Jurkat, PC-12, PC-3, IMR, NT2N, Sk-n-sh, CaSki, C33A. Humane cellelinjer er også forestilt seg. Disse vertscellene, for eksempel CHO-celler, tilveiebringer posttranslasjonelle modifikasjoner til antistoffmolekylene ifølge oppfinnelsen, inkluderende lederpeptid eller signalsekvens fjerning, folding og samling av H (tunge) og L (lette) kjeder og viktigst glykosylering av molekylet ved korrekte seter, det vil si i den variable regionen av den tunge kjeden. Slikt signalpeptid eller ledersekvens er proteolytisk kløyd ved vertssignalpeptidasen under den sekretoriske veien under dens rekombinante produksjon i for eksempel CHO-celler. Ytterligere egnede cellelinjer kjent i fagfeltet, er oppnåelige fra cellelinjedeponeringer, slik som American Type Culture Collection (ATCC). I overensstemmelse med den foreliggende oppfinnelsen er det videre forestilt seg at primære celler/cellekulturer kan fungere som vertsceller. Nevnte celler er spesielt derivert fra insekter (slik som insekter av arten *Drosophila* eller *Blatta*) eller pattedyr (slik som menneske, svin, mus eller rotte). Nevnte vertsceller kan også omfatte celler fra og/eller derivert fra cellelinjer, slik som neuroblastomcellelinjer.

Følgelig er antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen preparert ved å benytte et rekombinant ekspresjonssystem. Et eksempel på slikt system, som poengtert ovenfor, er mammalske ekspresjonssystem ved å benytte kinesiske hamsterovarie(CHO)-celler. Disse kan bli benyttet med glutaminsyntetase(GS)-systemet (WO 87/04462; WO 89/01036; Bebbington, 1992, *Biotechnology* (N Y), 10, 169-75). Dette systemet involverer transfeksjonen av en CHO-celle med et gen kodende for GS-enzymet og de ønskede antistoffgenene. CHO-celler er så selektert som vokser i glutaminfritt medium og er også utsatt for inhibering av GS-enzymet ved å benytte metioninsulfoksimin (MSX). For å overleve vil cellene amplifisere GS-enzymekspresjonen og medvirkende ekspresjonen av mAb.

- Et annet mulig ekspresjonssystem er CHO dhfr-systemet, hvor CHSO-cellene mangler dihydrofolatreduktase (dhfr-) og avhenger av tymidin og hypoksantin for vekst. CHO dhfr-modercellelinjen er transfektert med antistoffet og dhfr-enet muliggjør på denne måten seleksjonen a CHO-celletransformanter av dhfr+-fenotypen. Seleksjon er utført i
- 5 fravær av tymidin og hypoksantin. Ekspresjon av antistoffgenet kan bli økt ved amplifisering ved å benytte metotreksat (MTX). Dette medikamentet er en direkte inhibitor av dhfr-enzymet og tillater isolasjon av resistente kolonier som amplifiserer deres dhfr-gen-kopitall og derfor antistoffgenet tilstrekkelig til å overleve under disse forholdene.
- 10 Rensede antistoffmolekyler, for eksempel immunglobuliner, kan bli fremstilt ved en metode omfattende trinnene av
- (a) rekombinant å uttrykke et heterologt nukleinsyremolekyl kodende for et antistoffmolekyl som definert her ovenfor i en mammalske celle, for eksempel en
 - 15 CHO eller en HEK 293-celle; og
 - (b) å rense nevnte rekombinant uttrykte antistoffmolekyl ved en metode omfattende trinnene av
 - 20 (b1) protein A-kolonnerensing;
 - (b2) ionebytterkolonnerensing, for eksempel en kationbytterkromatografi; og eventuelt
 - 25 (b3) størrelseseksklusjonskolonnerensing.

Renseprotokollen kan omfatte ytterligere trinn, slik som ytterligere konsentrasjonstrinn, for eksempel diafiltrering eller analytiske trinn, som for eksempel involverer analytiske kolonner. Metoden/prosessen kan også omfatte virusinaktiveringstrinn og/eller virale

30 fjerningstrinn, for eksempel via filtreringer/nanofiltreringer. Det er også forestilt seg og gjennomførbart at bestemte trinn er repetert (for eksempel kan to ionebytterkromatografitrinn bli utført) eller at bestemte trinn (for eksempel størrelseseksklusjonskromatografi) kan bli utelatt.

- 35 Protein A er en gruppe spesifikke ligand som binder til Fc-regionen av de fleste IgG1-isotyper. Det er syntetisert ved noen stammer av *Staphylococcus aureus* og kan bli

isolert derifra og koblet til kromatografiske kuler. Flere typer av gelpreparater er tilgjengelig kommersielt.

Et eksempel på en protein A-kolonne som kan bli benyttet, er en MabSelect(varenavn)-kolonne. Ideelt er kolonnen ekvilibrert med 25 mM Tris/HCl, 25 mM NaCl, 5 mM EDTA, cellekultursupernatanten er lastet på kolonnen, kolonnen er vasket med 1 M Tris/HCl pH 7,2 og antistoffet er eluert ved pH 3,2 ved å benytte 100 mM eddiksyre.

Kationbytterkromatografi benytter interaksjoner mellom positivt ladede grupper i en stasjonær fase og prøven som er i den mobile fasen. Når en svak kationbytter (for eksempel CM Toyopearl 650®) er benyttet, er de følgende kromatografiske trinnene utført: Etter preekvilibrering med 100 mM eddiksyre, pH 4, lasting av protein A-eluat og vasking med 100 mM eddiksyre, pH 4, er antistoffet eluert og fraksjonert ved å benytte trinn på 250 mM natriumacetat (pH 7,8-8,5) og 500 mM natriumacetat (pH 7,8-8,5). Med det første trinnet er en blanding av dobbeltglykosylert isoformfraksjon og monoglykosylert isoformfraksjon normalt eluert, ved å benytte det andre trinnet er den ikke-glykosylerte isoformfraksjonen normalt eluert.

Fra en sterk kationbytter (for eksempel SP Toyopearl 650) kan antistoffet bli eluert ved salttrinn: Etter ekvilibrering av kolonnen med 50 mM eddiksyre pH 5,0, lasting av protein A-eluatet med pH 4, er det første elueringsstrinnet ved å benytte 50 mM eddiksyre og 210 nM natriumklorid, utført. Så er et andre elueringsstrinn av 50 mM eddiksyre og 350 nM natriumklorid benyttet. Ved det første salttrinnet er en blanding av den dobbeltglykosylerte isoformfraksjonen og monoglykosylerte isoformfraksjonen normalt eluert, ved det andre salttrinnet er den ikke-glykosylerte isoformen normalt eluert.

I tillegg kan antistoffet også bli eluert fra en sterk kationbytterkolonne (for eksempel SP-Sepharose®) ved en saltgradient: Etter preekvilibrering, lasting og vasking av kolonnen med pH 4,5, er en saltgradient benyttet fra 50 mM MES pH 5,8 til 50 mM MES /1 M natriumklorid pH 5,8. Her er dobbeltglykosylert isoform, monoglykosylert isoform og ikke-glykosylert isoformfraksjonen normalt eluert separat. I det følgende kan dobbeltglykosylert isoformfraksjon og monoglykosylert isoformfraksjon bli forent for å resultere i produktsamlingen og/eller en ønsket antistoffblanding.

Ytterligere rensing av blandingen av dobbelt- og monoglykosylerte antistoffmolekyler, for eksempel immunglobuliner, kan bli utført ved størrelseseksklusjonskromatografi. Et eksempel på en nyttig kolonne er en Superdex 200®-kolonne. Eksempler på kjørings-

buffere inkluderer histidin/natriumklorid, for eksempel 10 mM histidin/125 mM natriumklorid/pH 6, og fosfatbufret salt (PBS).

Anionbytterkromatografi i metoden for gjennomstrømming, etterfulgt ved en konsentrasjon/diafiltrering, er et alternativt rensetrinn. Q Sepharose® er her et eksempel på et resin for anionbyttrinn. Eluatet fra SP-kromatografien kan for eksempel bli tre ganger fortynnet med 37,5 mM Tris/HCl, pH 7,9 og passert over en Q Sepharose-kolonne preekvilibrert med 25 mM Tris/83 mM natriumacetat. Gjennomstrømningen er samlet, justert til pH 5,5 og konsentrert ved ultrafiltrering ved å for eksempel benytte en Hydrosart 30 kD® membran. I det følgende kan konsentratet bli diafiltrert mot for eksempel 10 volum av 20 mM histidin/HCl pH 5,5.

Den ovenfor beskrevne renseprotokollen kan også omfatte et ytterligere trinn (c) et analytisk kromatografitrinn, slik som anvendelsen av en Mono-S HR5/5-kolonne. Ytterligere trinn slik som diafiltrering, for eksempel for konsentrasjon av antistoffmolekylet, er imidlertid også forestilt seg.

I én utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen er en sammensetning, antistoffpreparat eller antistoffsamling tilveiebrakt omfattende antistoffmolekyler som beskrevet her eller antistoffmolekyler som fremstilt ved fremgangsmåten tilveiebrakt ovenfor. I denne utførelsesformen av oppfinnelsen omfatter nevnte sammensetning mono- eller dobbeltglykosylerte antistoffer. I en annen utførelsesform omfatter nevnte sammensetning mono- og dobbeltglykosylerte (i den variabler regionen(e) av den tunge kjeden(e)) antistoffer og nevnte sammensetning er derivert for antistoffmolekyler som mangler glykosyleringen i den variable regionen. I sammenheng av denne utførelsesformen er betegnelsen "antistoffsamling" relatert til en blanding av mono- og dobbeltglykosylerte (i den variabler regionen(e) av den tunge kjeden(e)) antistoffer som kan ha blitt individuelt isolert og er så kombinert til én blanding. Antistoffblandingerne eller antistoffsamlingene tilveiebrakt her, kan omfatte 50 % monoglykosylerte og 50 % dobbeltglykosylerte antistoffer, som definert her. Også forestilt seg er imidlertid forholdene på 30/70 til 70/30. Fagpersonen er likevel klar over at også andre forhold er forestilt seg i antistoffblandingerne av denne oppfinnelsen. For eksempel kan også 10/90 eller 90/10, 20/80 eller 80/20, så vel som 40/60 eller 60/40, bli benyttet i sammenheng av denne oppfinnelsen. Også dokumentert i eksemplene omfatter et spesielt nyttig forhold i ANTISTOFFBLANDINGENE ifølge oppfinnelsen dobbeltglykosylert og mono-glykosylert antistoff som definert her ovenfor, i et forhold fra 40/60 til 45/55.

Sammensetningene tilveiebrakt her er spesielt nyttige i diagnostikk eller i en farmasøytisk sammensetning.

5 Følgelig tilveiebringer oppfinnelsen diagnostiske eller farmasøytiske sammensetninger omfattende

- (a) et antistoffmolekyl som definert ovenfor, omfattende et antigenbindende sete med en glykosylert Asn;
 - 10 (b) et antistoffmolekyl som definert ovenfor, omfattende to antigenbindende seter med en glykosylert Asn; eller mest foretrukket
 - (c) en kombinasjon av antistoffmolekyler (a) til (b).
- 15 Kombinasjonen (c) som tilveiebragt her, omfattende antistoffmolekylet/molekylene omfattende ett antigenbindende sete med en glykosylert Asn og antistoffmolekylet/-molekylene omfattende to antigenbindende seter med en glykosylert Asn, er fri for ikke-glykosylerte (med hensyn på den variable regionen av den tunge kjeden) isoformer. Som poengtert ovenfor er betegnelsen "fri for ikke-glykosylert (med hensyn på den
- 20 variable regionen av den tunge kjeden) isoform" relatert til kombinasjoner/antistoffsamlinger/antistoffpreparater, hvor mindre enn 5 %, for eksempel mindre enn 4 %, mindre enn 3 %, mindre enn 2 %, mindre enn 1 % eller til og med mindre enn 0,5 % av antistoffarten i nevnte sammensetning er ikke-glykosylert i den variable regionen av den tunge kjeden. Som demonstrert i eksemplene kan nevnte kombinasjoner/antistoff-
- 25 samlinger/antistoffpreparater omfatte nesten ingen (mindre enn 0,5 %) ikke-glykosylerte isoformer. Prosentandelen og/eller mengden av en gitt glykosyleringsisoform (som definert her, for eksempel glykosylering i den variable regionen av den tunge kjeden, se blant annet vedlagt figur 14) i en gitt ANTISTOFFSAMMEN-
- 30 SETNING kan enkelt bli bestemt ved metoder kjent i fagfeltet. Disse metodene omfatter, men er ikke begrenset til, massespektrometri. SDS-PAGE-analyse ione-
- bytting, HPLL, ELISA og lignende.

Som vist i de vedlagte eksemplene er den spesifikke og sensitive immundekorasjonen av genuine Alzheimers β -amyloidplakk ved antistoffene ifølge oppfinnelsen

35 demonstrert *in vitro* med immunhistokjemiske fargingeksperimenter ved å benytte frysesenitt av humant hjernevæv fra AD-pasienter. Effektiv farging av β -amyloidplakk fra hjerneskliver ble demonstrert også med humane anti-A β -antistoffer fra pasienter

vaksinert med A β (Hock, 2002, Nature Medicine, 8, 1270-1275). Videre er immundekorasjon også demonstrert i en transgen dyremodell som skisserer human β -amyloid-plakkbyrde (Richards, 2003, J. Neuroscience, 23, 8989-9003). I lignende dyremodeller har det blitt demonstrert at denne plakbindingen fører til deres fjerning og påfølgende til en forbedring av sykdomsrelaterte symptomer, mens involveringen av Fc-avhengige prosesser har blitt diskutert (Bard, 2000, Nature Medicine, 6, 916-919; Wilcock, 2003, Neurobiology Disease, 15, 11-20; Wilcock, 2004, J. Neuroscience, 24, 6144-6151). Videre ble effektiv binding av anti-A β -antistoffer til β -amyloidplakk rapportert til å korrelere med langsommere sykdomsprogresjon (Hock, 2002, Nature Medicine, 8, 1270-1275; Hock, 2003, Neuron, 38, 547-554). Denne og post-mortem-analyse av humant hjernevev antyder at fagocytose av mikroglia-celler er mekanistisk involvert i plakfjerningen hos menneske (Nicoll, 2003, Nature Medicine, 9, 448-452). Antistoffet av den foreliggende oppfinnelsen eller omfattet spesielt i farmasøytiske sammensetninger er derfor et humant IgG1, som hovedsakelig er ansvarlig for FcR-avhengige prosesser i mennesker. Den effektive β -amyloidplakk-immundekorasjonen av antistoffene ifølge oppfinnelsen/blandingene ifølge oppfinnelsen antyder at medikamentet vil være virksomt for passiv immunisering for å fjerne eksisterende og hindre dannelse av β -amyloidplakk hos mennesker.

I tillegg burde antistoffer fortrinnsvis krysse blod-hjerne-barrieren for å nå deres sted av bestemmelse. For molekyler av stor størrelse slik som humane IgG-er, er denne prosessen dramatisk redusert, slik at bare omkring 0,1 til 0,2 % av plasmakonsentrasjonen av et antistoff kan bli nådd i CSF. Mekanismen av plakfjerning er fortsatt et emne for kontroversielle debatter, som kanskje kan involvere perifere effekter av A β -peptidet (Dodart, 2002, Nature Neuroscience, 5: 452-457). Det genererte, terapeutiske antistoffet eller de korresponderende oppfinneriske blandinger av mono- og dobbelt-glykosylert antistoff (i den variable regionen av den tunge kjeden) ifølge oppfinnelsen har også egenskapen til å depolymerisere A β -multimerer *in vitro* uten involvering av Fc-avhengige prosesser og til å binde til løselige A β -monomerer og oligomerer i CSF, siden nøytralisering av løselige monomere A β -peptider eller oligomere A β -peptider (for eksempel aggregeringsintermediater) også kan bidra til total amyloidreducerende effekt (Du, 2003, Brain, 126: 1-5).

Sammensetningene ifølge oppfinnelsen kan bli administrert i fast eller flytende form og kan blant annet være i en form av (a) pulver(e), (a) tablett(er), (a) løsning(er) eller (en) aerosol(er). Nevnte sammensetning kan omfatte ett eller flere antistoffer/antistoff-

molekyler ifølge oppfinnelsen mest foretrukket en blanding av mono- og dobbelt-glykosylerte antistoffer som tilveiebrakt her.

Det er foretrukket at nevnte farmasøytiske sammensetning eventuelt omfatter en farmasøytisk akseptabel bærer og/eller fortynningsmiddel. Den her angitte farmasøytiske sammensetningen kan spesielt være nyttig for behandlingen av neurologiske og/eller neurodegenererende lidelser. Nevnte lidelser omfatter, men er ikke begrenset til, Alzheimers sykdom, amyotrofisk lateral sklerose (ALS), arvelig cerebral blødning med amyloidose hollandsk type, Downs syndrom, HIV-demens, Parkinsons sykdom og neuronale lidelser relatert til aldring. Den farmasøytiske sammensetningen ifølge oppfinnelsen er blant annet forestilt seg som potent inhibitor av amyloid plakkdannelse eller som et potent stimulator for depolymeriseringen av amyloidplakk. Derfor tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen farmasøytiske sammensetninger omfattende forbindelsen ifølge oppfinnelsen som skal bli benyttet for behandlingen av amyloidogene sykdommer/lidelser. Betegnelsen "amyloidogen sykdom/lidelse" inkluderer enhver sykdom assosiert med eller forårsaket ved dannelsen eller avsetningen av amyloide fibriller og/eller patologisk APP-proteolyse. Eksemplarisk amyloidogen sykdom inkluderer, men er ikke begrenset til, Alzheimers sykdom (AD), Downs syndrom, demens assosiert med Lewy legemedannelse, Parkinsons sykdom med demens, mild kognitiv svekkelse, cerebral amyloid angiopati og vaskulær demens. Forskjellige amyloidogene sykdommer er definert og/eller karakterisert ved naturen av polypeptidkomponenten av de amyloide avsetningene. For eksempel er amyloid- β -proteinet karakteristisk for de amyloide avsetningene funnet i individer som har Alzheimers sykdom.

Eksempler på egnede farmasøytiske bærere, tilsetninger og/eller fortynningsmidler er godt kjent i fagfeltet og inkluderer fosfatbufrede saltløsninger, vann, emulsjoner, slik som olje/vannemulsjoner, ulike typer av fuktemidler, sterile løsninger og så videre. Sammensetninger omfattende slike bærere kan bli formulert ved godt kjente konvensjonelle metoder. Egnede bærere kan omfatte ethvert materiale, som når kombinert med det anti-A β -spesifikt bindende midlet eller antistoffet, beholder bindingen med høy affinitet av A β og er ikke-reaktiv med individets immunsystemer inkluderende tilsetninger, overflateaktive stoffer, tonisitetmidler og lignende; se Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16. utgave, Osol, A. Ed. Disse farmasøytiske sammensetningene kan bli administrert til individet ved en egnet dose. Administrasjon av de egnede sammensetningene kan bli utført ved forskjellige måter, for eksempel ved parenteral, subkutan, intraperitoneal, topikal, intrabronkial, intrapulmonal og intranasal

administrasjon og, om ønsket, for lokal behandling, intralesjonal administrasjon. Parenterale administrasjoner inkluderer intraperitoneal, intramuskulær, intradermal, subkutan, intravenøs eller intraarteriell administrasjon. Det er spesielt foretrukket at nevnte administrasjon er utført ved injeksjon og/eller levering, for eksempel til et sted i
 5 en hjernearterie eller direkte inn i hjernevev. Sammensetningene ifølge oppfinnelsen kan også bli administrert direkte til målstedet, for eksempel ved biolistisk levering til et eksternt eller internt målsted, slik som hjernen.

Farmasøytiske sammensetninger omfattende de her beskrevne glykosylerte antistoffene,
 10 er preparert ved blanding av antistoffet som har den ønskede graden av renhet med eventuelle fysiologisk akseptable bærere, tilsetninger, stabilisatorer, overflateaktive stoffer, buffere og/eller tonisitettsmidler. Akseptable bærere, tilsetninger og/eller stabilisatorer er ikke-toksiske for mottakere ved doseringene og konsentrasjonene benyttet, og inkluderer buffere slik som fosfat, citrat og andre organiske syrer; anti-
 15 oksidanter inkluderende askorbinsyre, glutation, cystein, metionin og sitronsyre; konserveringsmidler (slik som etanol, benzylalkohol, fenol, m-kresol, p-klor-m-kresol, metyl eller propylparabener, benzalkoniumklorid eller kombinasjoner derav); amino-syrer slik som arginin, glysin, ornitin, lysin, histidin, glutaminsyre, asparbinsyre, isoleucin, leucin, alanin, fenylalanin, tyrosin, tryptofan, metionin, serin, prolin og
 20 kombinasjoner derav; monosakkarider, disakkarider og andre karbohydrater; Lav-molekylær vekt (mindre enn omkring 10 residuer) polypeptider; proteiner, slik som gelatin eller serumalbumin; chelaterende midler slik som EDTA; sukker slik som trehalose, sukrose, laktose, glukose, mannose, maltose, galaktose, fruktose, sorbose, raffinose, glukosamin, N-metylglukosamin (såkalt "Meglumin"), galaktosamin og
 25 neuraminsyre; og/eller ikke-ioniske, overflateaktive stoffer slik som Tween, Brij Plurionics, Triton-X eller polyetylen glykol (PEG).

Den farmasøytiske sammensetningen kan være i en flytende form, en lyofilisert form eller en flytende form rekonstituert fra en lyofilisert form, hvor det lyofiliserte
 30 preparatet skal bli rekonstituert med en steril løsning for administrasjon. Standard-prosedyren for rekonstituering av en lyofilisert sammensetning er å tilføre tilbake et volum av rent vann (vanligvis ekvivalent med volumet fjernet under lyofilisering), imidlertid kan også løsninger omfattende antibakterielle midler bli benyttet for produksjonen av farmasøytiske sammensetninger for parenteral administrasjon; se også Chen
 35 (1992) Drug Dev Ind Pharm 18, 1311-54.

Eksemplariske antistoffkonsentrasjoner i den farmasøytisk sammensetningen kan variere fra omkring 1 mg/ml til omkring 200 mg/ml eller fra omkring 50 mg/ml til omkring 200 mg/ml, eller fra omkring 150 mg/ml til omkring 200 mg/ml. For klarhet er det fremhevet at konsentrasjonene indikert her er relatert til konsentrasjonen i en væske
5 eller i en væske som er nøyaktig rekonstituert fra en fast form.

En vannholdig formulering av antistoffet kan bli preparert i en pH-bufret løsning, for eksempel ved pH varierende fra omkring 4,0 til omkring 7,0, eller fra omkring 5,0 til omkring 6,0, eller alternativt omkring 5,5. Eksempler på buffere som er egnet for en pH
10 innenfor dette området, inkluderer fosfat-, histidin-, citrat-, succinat-, acetatbuffere og andre organiske syrebuffere. Bufferkonsentrasjonen kan være fra omkring 1 mM til omkring 100 mM, eller fra omkring 5 mM til omkring 50 mM, avhengig av for eksempel bufferen og den ønskede tonisiteten av formuleringen.

15 Et tonisetsmiddel kan bli inkludert i antistoff-formuleringen for å modulere tonisiteten av formuleringen. Eksemplariske tonisetsmidler inkluderer natriumklorid, kaliumklorid, glyserin og enhver komponent fra gruppen av aminosyrer, sukker, så vel som kombinasjoner derav.

20 Fortrinnsvis er den vannholdige formuleringen isoton, selv om hypertone eller hypotone løsninger kan være egnet. Betegnelsen "isoton" angir en løsning som har den samme tonisiteten som en annen løsning hvorved den er sammenlignet, slik som fysiologisk saltløsning og blodserumet. Tonisetsmidler kan bli benyttet i en mengde på omkring 5 mM til omkring 350 mM, spesielt i en mengde av 105 mM til 305 mM.

25 Et overflateaktivt stoff kan også bli tilføyd til antistoff-formuleringen for å redusere aggregering av det formulerte antistoffet og/eller minimalisere dannelsen av små partikler i formuleringen og/eller redusere adsorpsjon. Eksemplariske overflateaktive stoffer inkluderer polyoksyetylenorbitanfettsyreestere (Tween), polyoksyetylenalkyl-
30 etere (Brij), alkylfenylpolyoksyetylenetere (Triton-X), polyoksyetylen-polyoksypropylen-kopolymer (Poloxamer, Pluronic) og natriumdodecylsulfat (SDS). Foretrukkede polyoksyetylenorbitan-fettsyreestere er polysorbat 20, (solgt under varenavnet Tween 20™) og polysorbat 80 (solgt under varenavnet Tween 80™). Foretrukket er polyetylenpolypropylenkopolymerer er dem solgt under navnene Pluronic® F68 eller
35 Poloxamer 188™. Foretrukkede polyoksyetylenalkyletere er dem solgt under varenavnet Brij™. Eksemplariske konsentrasjoner av overflateaktivt stoff kan variere fra omkring 0,001 % til omkring 1 % vekt/volum.

Et lyobeskyttelsesmiddel kan også bli tilføyd for å beskytte den ustabile, aktive ingrediensen (for eksempel et protein) mot destabiliserende forhold under lyofiliseringsprosessen. For eksempel inkluderer kjente lyobeskyttelsesmidler sukkere (inkluderende 5 glukose og sukrose); polyoler (inkluderende mannitol, sorbitol og glyserin); og aminosyrer (inkluderende alanin, glysin og glutaminsyre). Lyobeskyttende midler er generelt benyttet i en mengde på omkring 10 mM til 500 nM.

Formuleringen kan inneholde de ovenfor identifiserte midlene (det vil si glykosylert 10 antistoff, overflateaktivt stoff, buffer, stabilisator og/eller tonisitettsmiddel) og er hovedsakelig fri for ett eller flere konserveringsmidler, slik som etanol, benzylalkohol, fenol, m-kresol, p-klor-m-kresol, metyl eller propylparabener, benzalkoniumklorid og kombinasjoner derav. I en annen utførelsesform kan et konserveringsmiddel bli inkludert i formuleringen, for eksempel ved konsentrasjoner varierende fra omkring 15 0,001 til omkring 2 % (vekt/volum).

Antistoff-formuleringen som her er beskrevet kan være en flytende eller lyofilisert formulering egnet for parenteral administrasjon som kan omfatte:

- 20 - omkring 1 til omkring 200 mg/ml av de her beskrevne glykosylerte antistoffene eller ANTISTOFFSAMMENSETNING,
- omkring 0,001 til omkring 1 % av minst ett overflateaktivt stoff;
- 25 - omkring 1 til omkring 100 mM av en buffer;
- eventuelt omkring 10 til omkring 500 mM av en stabilisator og/eller omkring 5 til omkring 305 mM av et tonisitettsmiddel;
- 30 - ved en pH på omkring 4,0 til omkring 7,0.

Den parenterale formuleringen som her er beskrevet kan være en flytende eller lyofilisert formulering omfattende:

- 35 - omkring 1 til omkring 200 mg/ml av de her beskrevne glykosylerte antistoffene eller ANTISTOFFSAMMENSETNING,

46

- 0,04 % Tween 20 vekt/volum,
- 20 mM L-histidin,
- 5 - 250 mM sukrose,
- ved pH 5,5.

Den parenterale formuleringen som er beskrevet her kan også omfatte en lyofilisert
10 formulering omfattende:

- 15 mg/ml av de her beskrevne glykosylerte antistoffene eller ANTISTOFF-SAMMENSETNING,
- 15 - 0,04 % Tween 20 vekt/volum,
- 20 mM L-histidin,
- 250 mM sukrose,
- 20 - ved pH 5,5;

eller

- 25 - 75 mg/ml av de her beskrevne glykosylerte antistoffene eller ANTISTOFF-SAMMENSETNING,
- 0,04 % Tween 20 vekt/volum,
- 30 - 20 mM L-histidin,
- 250 mM sukrose,
- ved pH 5,5;

35

eller

47

- 75 mg/ml av de her beskrevne glykosylerte antistoffene eller ANTISTOFF-SAMMENSETNING,
 - 0,02 % Tween 20 vekt/volum,
 - 5 - 20 mM L-histidin,
 - 250 mM sukrose,
 - 10 - ved pH 5,5;
- eller
- 75 mg/ml av de her beskrevne glykosylerte antistoffene eller ANTISTOFF-SAMMENSETNING,
 - 15 - 0,04 % Tween 20 vekt/volum,
 - 20 mM L-histidin,
 - 20 - 250 mM Trehalose,
 - ved pH 5,5;
- 25 eller
- 75 mg/ml av de her beskrevne glykosylerte antistoffene eller ANTISTOFF-SAMMENSETNING,
 - 30 - 0,02 % Tween 20 vekt/volum,
 - 20 mM L-histidin,
 - 250 mM Trehalose,
 - 35 - ved pH 5,5.

Den parenterale formuleringen som her er beskrevet kan også omfatte en flytende formulering omfattende:

- 5 - 7,5 mg/ml av de her beskrevne glykosylerte antistoffene eller ANTISTOFF-SAMMENSETNING,
- 0,022 % Tween 20 vekt/volum,
- 120 mM L-histidin,
- 10 - 250 125 mM sukrose,
- ved pH 5,5;
- 15 eller
- 37,5 mg/ml av de her beskrevne glykosylerte antistoffene eller ANTISTOFF-SAMMENSETNING,
- 20 - 0,02 % Tween 20 vekt/volum,
- 10 mM L-histidin,
- 125 mM sukrose,
- 25 - ved pH 5,5;
- eller
- 30 - 37,5 mg/ml av de her beskrevne glykosylerte antistoffene eller ANTISTOFF-SAMMENSETNING,
- 0,01 % Tween 20 vekt/volum,
- 35 - 10 mM L-histidin,
- 125 mM sukrose,

- ved pH 5,5;
- eller
- 5 - 37,5 mg/ml av de her beskrevne glykosylerte antistoffene eller ANTISTOFF-SAMMENSETNING,
- 0,02 % Tween 20 vekt/volum,
- 10 - 10 mM L-histidin,
- 125 mM trehalose,
- 15 - ved pH 5,5;
- eller
- 37,5 mg/ml av de her beskrevne glykosylerte antistoffene eller ANTISTOFF-SAMMENSETNING,
- 20 - 0,01 % Tween 20 vekt/volum,
- 10 mM L-histidin,
- 25 - 125 mM trehalose,
- ved pH 5,5;
- 30 eller
- 75 mg/ml av de her beskrevne glykosylerte antistoffene eller ANTISTOFF-SAMMENSETNING,
- 35 - 0,02 % Tween 20 vekt/volum,
- 20 mM L-histidin,

- 250 mM Trehalose,
- ved pH 5,5;
- 5 eller
- 75 mg/ml av de her beskrevne glykosylerte antistoffene eller ANTISTOFF-SAMMENSETNING,
- 10 - 0,02 % Tween 20 vekt/volum,
- 20 mM L-histidin,
- 15 - 250 mM mannitol,
- ved pH 5,5;
- eller
- 20 - 75 mg/ml av de her beskrevne glykosylerte antistoffene eller ANTISTOFF-SAMMENSETNING,
- 0,02 % Tween 20 vekt/volum,
- 25 - 20 mM L-histidin,
- 140 mM natriumklorid,
- 30 - ved pH 5,5;
- eller
- 150 mg/ml av de her beskrevne glykosylerte antistoffene eller ANTISTOFF-SAMMENSETNING,
- 35 - 0,02 % Tween 20 vekt/volum,

- 20 mM L-histidin,
 - 250 mM trehalose,
 - 5 - ved pH 5,5.
- eller
- 10 - 150 mg/ml av de her beskrevne glykosylerte antistoffene eller ANTISTOFF-SAMMENSETNING,
 - 0,02 % Tween 20 vekt/volum,
 - 15 - 20 mM L-histidin,
 - 250 mM mannitol,
 - ved pH 5,5.
 - 20 eller
- 150 mg/ml av de her beskrevne glykosylerte antistoffene eller ANTISTOFF-SAMMENSETNING,
 - 25 - 0,02 % Tween 20 vekt/volum,
 - 20 mM L-histidin,
 - 30 - 140 mM natriumklorid,
 - ved pH 5,5.
- eller
- 35 - 10 mg/ml Abeta-antistoff,

52

- 0,01 % Tween 20 vekt/volum,
- 20 mM L-histidin,
- 5 - 140 mM natriumklorid,
- ved pH 5,5.

Den farmasøytiske sammensetningen som her er beskrevet kan være den flytende
10 formuleringen som omfatter:

- 10 mg/ml Abeta-antistoff,
- 0,01 % Tween 20 vekt/volum,
- 15 - 20 mM L-histidin,
- 140 mM natriumklorid,
- 20 - ved pH 5,5.

Den farmasøytiske sammensetningen som her er beskrevet kan være den lyofiliserte
formulering som omfatter:

- 25 - 75 mg/ml Abeta-antistoff,
- 0,04 % Tween 20 vekt/volum,
- 20 mM L-histidin,
- 30 - 250 mM sukrose,
- ved pH 5,5.

35 Betegnelsen "her beskrevne glykosylerte antistoffer" i sammenheng av eksemplifiserte
formuleringer, kan omfatte i denne oppfinnelsen de her definerte monoglykosylerte

antistoffene, de her definerte dobbeltglykosylerte antistoffene, så vel som blandinger derav.

Doseringsregimet vil bli bestemt av den avhandlende legen og kliniske faktorer. Som er
 5 godt kjent i de medisinske fagfeltene, avhenger doseringer for enhver pasient av mange faktorer, inkluderende pasientens størrelse, kroppsoverflateareal, alder, den bestemte forbindelsen som skal bli administrert, kjønn, tid og rute for administrasjon, generell helse og andre medikamenter som blir administrert samtidig. Proteinøst farmasøytisk aktivt materiale kan være til stede i mengder mellom 1 ng og 20 mg/kg kroppsvekt per
 10 dose, for eksempel mellom 0,1 mg til 10 mg/kg kroppsvekt, for eksempel mellom 0,5 mg til 5 mg/kg kroppsvekt; imidlertid er doser under eller over dette eksemplariske området forestilt seg, spesielt ved å ta i betraktning de tidligere nevnte faktorene. Om regimet er en kontinuerlig infusjon, burde den også være i området fra 1 µg til 10 mg per kilogram av kroppsvekt per minutt.

15

De farmasøytiske sammensetningene som beskrevet her, kan bli formulert til å være kortvirkende, raskt frigjørende eller lenge virkende eller opprettholdt frigjøring. De farmasøytiske sammensetningene kan herav også være egnet for sakte frigjøring eller for kontrollert frigjøring.

20

Preparater med en opprettholdt frigjøring kan bli preparert ved å benytte metoder godt kjent i fagfeltet. Egnede eksempler på preparater med opprettholdt frigjøring inkluderer semipermeable matriser av faste hydrofobe polymerer inneholdende antistoffet hvor matrisen er i formen av en formet partikkel, for eksempel filmer eller mikrokapsler.
 25 Eksempler på matriser med opprettholdt frigjøring inkluderer polyestere, kopolymerer av L-glutaminsyre og etyl-L-glutamat, ikke-degraderbar etylen-vinylacetat, hydrogeler, polylaktider, degraderbare melkesyre-glykolsyre-kopolymerer og poly-D-(-)-3-hydroksysmørsyre. Mulig tap av biologisk aktivitet og mulige endringer i immuno-genisitet av antistoffer omfattet i preparater med opprettholdt frigjøring, kan bli forebygget ved å benytte hensiktsmessige tilsetningsstoffer, ved å kontrollere fuktighets-
 30 innhold og ved å utvikle spesifikke, polymere matrisesammensetninger.

Progresjon kan bli monitorert ved periodisk bestemmelse. Sammensetningene, det vil si de mono- og/eller dobbeltglykosylerte antistoffene ifølge oppfinnelsen eller en blanding
 35 derav, kan bli administrert lokalt eller systemisk. Det bør merkes at perifert administrerte antistoffer kan gå inn i sentralnervesystemet, se blant annet Bard (2000), Nature Med. 6, 916-919. Preparater for parenteral administrasjon inkluderer sterile,

- vannholdige eller ikke-vannholdige løsninger, suspensjoner og emulsjoner. Eksempler på ikke-vannholdige løsningsmidler er propylenglykol, polyetylglykol, vegetabiliske oljer slik som olivenolje og injiserbare, organiske estere, slik som etyloleat. Vannholdige bærere inkluderer vann, alkoholholdige/vannholdige løsninger, emulsjoner eller
- 5 suspensjoner, inkluderende salt og bufrede medier. Parenterale leveringsmidler inkluderer natriumkloridløsning, Ringers dekstrose, dekstrose og natriumklorid, Ringers tilsatt laktat, eller fikserte oljer. Intravenøse leveringsmidler inkluderer væske og næringsmiddel, supplerende midler, elektrolyttsupplerende midler (slik som dem basert på Ringers dekstrose) og lignende. Konserveringsmidler og andre tilsetningsstoffer kan
- 10 også være til stede, slik som for eksempel antimikrobielle midler, antioksidanter, chelaterende midler og inerte gasser og lignende. Videre kan den farmasøytiske sammensetningen ifølge oppfinnelsen omfatte ytterligere midler avhengig av den tiltenkte anvendelsen og farmasøytiske sammensetningen. Nevnte midler kan være medikamenter som virker på sentralnervesystemet, slik som neurobeskyttende faktorer,
- 15 kolinesteraseinhibitorer, agonister av M1-muskarinreseptor, hormoner, antioksidanter, inhibitorer av inflammasjon og så videre. Det er spesielt foretrukket at nevnte farmasøytiske sammensetning videre omfatter midler slik som for eksempel neurotransmittere og/eller substitusjonsmolekyler for neurotransmittere, vitamin E eller alfa-lipoinsyre.
- 20 Fagpersonen, nærmere bestemt, men ikke begrenset til, biokjemikere, biologer, kjemikere, farmasøyter og grupper av nevnte yrkesgrupper, er raskt i en posisjon å arbeide og generere de ovenfor nevnte farmasøytiske sammensetningene. Medisinsk personale øvet i fagfeltet, slik som behandlende leger, er også klar over hvordan slike farmasøytiske sammensetninger kan bli administrert til en pasient med behov for
- 25 behandling med de her definerte, farmasøytiske sammensetningene. En slik administrasjon kan omfatte systemisk administrasjon, for eksempel via infusjoner og/eller injeksjoner. Den direkte administrasjonen av forbindelsene og/eller forbindelsesblandingen ifølge oppfinnelsen til hjernen er også imidlertid forestilt seg. Forbindelsen eller forbindelsesblandingen eller forbindelsesformuleringen kan for eksempel bli
- 30 administrert ved direkte intraventrikulær eller intratekal injeksjon til hjernen, fortrinnsvis via sakte infusjon for å minimalisere påvirkning på hjernegrunnvev. Sakte frigjøringsimplantat i hjernen kan også bli benyttet. Det er også forestilt seg at genterapimetoder er benyttet, for eksempel ved anvendelse av implanterte, rekombinante celler som produserer antistoffene som definert i denne oppfinnelsen.
- 35 Disse "rekombinante cellene" burde være i stand til å tilveiebringe de her definerte glykosyleringene i de variable regionene/delene av antistoffene beskrevet her, spesielt anti-A β -antistoffene ifølge oppfinnelsen. Som poengtert ovenfor er én fordel av

antistoffene/antistoffblandinger av den foreliggende oppfinnelsen deres evne til å krysse blod-hjernebarrieren og til å binde til amyloide plakk. De farmasøytiske sammensetningene ifølge oppfinnelsen beskrevet nedenfor, kan bli benyttet for behandlingen av alle typer av sykdommer som hittil er ukjente eller som er relatert til
 5 eller avhengig av patologisk APP-aggregering eller patologisk APP-prosessering. De kan være spesielt nyttige for behandlingen av Alzheimers sykdom og andre sykdommer hvor ekstracellulære avsetninger av amyloid- β viser seg å spille en rolle. De kan ønskelig bli benyttet i mennesker, selv om behandling av dyr også er omsluttet ved fremgangsmåtene, anvendelsene og sammensetningene beskrevet her.

10

I en foretrukket utførelsesform ifølge oppfinnelsen er sammensetningen ifølge oppfinnelsen som angitt her ovenfor, en diagnostisk sammensetning ytterligere eventuelt omfattende egnede midler for deteksjon. Den diagnostiske sammensetningen omfatter minst én av de ovenfor nevnte forbindelsene ifølge oppfinnelsen, det vil si de
 15 glykosylerte antistoffene beskrevet her.

Nevnte diagnostiske sammensetning kan omfatte forbindelsene ifølge oppfinnelsen, spesielt de glykosylerte antistoffmolekylene av den foreliggende oppfinnelsen, løselig form/flytende fase, men det er også forestilt seg at nevnte forbindelser er bundet
 20 til/festet til og/eller forbundet til en fast støtte.

Faste støtter kan bli benyttet i kombinasjon med den diagnostiske sammensetningen som definert her eller forbindelsen av den foreliggende oppfinnelsen kan bli direkte bundet til nevnte faste støtter. Slike støtter er godt kjent i fagfeltet og omfatter blant
 25 annet kommersielt tilgjengelige kolonnematerialer, polystyrenkuler, latekskuler, magnetiske kuler, kolloidmetallpartikler, glass og/eller silikonchips og overflater, nitrocellulosestrips, membraner, ark, duracytter, brønner og vegger av reaksjonskar, plastikkør og så videre. Forbindelsen(e) ifølge oppfinnelsen, spesielt antistoffene av den foreliggende oppfinnelsen, kan være bundet til mange forskjellige bærere.
 30 Eksempler på godt kjente bærere inkluderer glass, polystyren, polyvinylklorid, polypropylen, polyetylen, polykarbonat, dekstran, nylon, amyloser, naturlige og modifiserte celluloser, polyakrylamider, agaroser og magnetitt. Naturen av bæreren kan være enten løselig eller uløselig for formålene ifølge oppfinnelsen. Hensiktsmessige merker og metoder for merking har blitt identifisert ovenfor og er videre nevnte her
 35 nedenfor. Egnede metoder for fiksering/immobilisering av nevnte forbindelse(r) ifølge oppfinnelsen er godt kjent og inkluderer, men er ikke begrenset til, ioniske, hydrofobe, kovalente interaksjoner og lignende.

Det er spesielt foretrukket at den diagnostiske sammensetningen ifølge oppfinnelsen er benyttet for deteksjon og/eller kvantifisering av APP og/eller APP-prosesserende produkter, slik som amyloid- β eller for deteksjon og/eller kvantifiseringen av

5 patologiske og/eller (genetisk) modifiserte APP-kloyvingssider.

Som illustrert i de vedlagte eksemplene er de glykosylerte antistoffmolekylene som er oppfunnet, spesielt nyttige som diagnostiske reagenser i deteksjonen av genuine, humane, amyloide plakk i hjernesnitt av Alzheimers sykdomspasienter ved indirekte

10 immunfluorescens.

Det er foretrukket at nevnte forbindelser av den foreliggende oppfinnelsen som skal bli benyttet i en diagnostisk sammensetning, er detekterbart merket. Et utvalg av teknikker er tilgjengelige for merking av biomolekyler, er godt kjent for fagpersoner i fagfeltet og

15 er betraktet til å være innenfor rekkevidden av den foreliggende oppfinnelsen. Det er mange forskjellige merker og metoder for merking kjent for fagpersoner. Eksempler på typen av merker som kan bli benyttet i den foreliggende oppfinnelsen, inkluderer enzymer, radioisotoper, kolloidmetaller, fluorescerende forbindelser, kjemi-luminescerende forbindelser og bioluminescerende forbindelser.

20 Alminnelig benyttede merker omfatter blant annet fluorokromer (slik som fluorescein, rhodamin, Texas rød, og så videre), enzymer (slik som pepperrot peroksidase, β -galaktosidase, alkalisk fosfatase), radioaktive isotoper (slik som ^{32}P eller ^{125}I), biotin, digoksygenin, kolloidmetaller, chemo- eller bioluminescerende forbindelser (slik som

25 dioksetaner, luminol eller akridiniumer). Merkingprosedyrer, slik som kovalent kobling av enzymer eller biotinylgrupper, joderinger, fosforyleringer, biotinyleringer og så videre, er godt kjent i fagfeltet.

Deteksjonsmetoder omfatter, men er ikke begrenset til, autoradiografi, fluorescens-

30 mikroskopi, direkte og indirekte enzymatiske reaksjoner og så videre. Alminnelig benyttede deteksjonstester omfatter radioisotopiske eller ikke-radioisotopiske metoder. Disse omfatter blant annet Western-blotting, overleggstester, RIA (radioimmunttest) og IRMA (immun radioimmunometrisk test), EIA (enzymimmunttest), ELISA (enzym-forbundet immun sorbenttest), FIA (fluorescerende immunttest) og CLIA

35 (kjemoluminescerende immunttest).

- Videre tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen for anvendelsen av de glykosylerte antistoffmolekylene ifølge oppfinnelsen, eller et antistoffmolekyl produsert ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, eller en blanding av mono- og dobbeltglykosylerte antistoffer som tilveiebrakt her, for fremstillingen av en farmasøytisk eller diagnostisk sammensetning for forebyggingen, behandlingen og/eller diagnostikken av en sykdom assosiert med amyloidogenese og/eller amyloid plakkdannelse. Det er videre foretrukket at forbindelsene beskrevet her, spesielt antistoffmolekylene ifølge oppfinnelsen, blir benyttet i forebyggingen og/eller behandlingen av neuropatologier assosiert med modifisert eller unormal APP-prosessering og/eller amyloidogenese.
- 10 Antistoffmolekylene, for eksempel i formatet av (konstruerte) immunglobuliner, slik som antistoffer i et IgG-rammeverk, spesielt i et IgG1-rammeverk, eller i formatet av kimære antistoffer (spesielt fullstendig humaniserte antistoffer eller fullstendige antistoffer), bispesifikke antistoffer, enkel kjede Fvs (scFvs) eller bispesifikke scFvs og lignende, er benyttet i fremstillingen av de farmasøytiske sammensetningene
- 15 tilveiebrakt her. Antistoffmolekylene og blandingene tilveiebrakt her, er også nyttig i diagnostiske settinger som dokumentert i de vedlagte eksemplene siden antistoffmolekylene ifølge oppfinnelsen spesifikt interagerer med A β 4 og/eller amyloide avsetninger.
- 20 En oppfunnet anvendelse av forbindelsene av den foreliggende oppfinnelsen er derfor anvendelsen for fremstillingen av en farmasøytisk sammensetning for en neurologisk lidelse som vekker forbedring, for eksempel ved disintegrasjon av β -amyloide plakk, ved amyloid (plakk) fjerning eller ved passiv immunisering mot β -amyloid plakkdannelse. Som illustrert i de vedlagte eksemplene er de oppfunne antistoffmolekylene
- 25 spesielt nyttige i forebygging av A β -aggregering og i depolymerisering av allerede dannede amyloide aggregater. Følgelig kan de oppfunne, glykosylerte antistoffene eller en blanding av mono- og dobbeltglykosylerte antistoffer som beskrevet her, bli benyttet i reduksjonen av patologiske, amyloide avsetninger/plakk, i fjerningen av amyloide plakk/plakkforløpere, så vel som i neuronal beskyttelse. Det er spesielt fore-
- 30 stilt seg at antistoffmolekylene ifølge oppfinnelsen skal bli benyttet i *in vivo*-forebyggingen av amyloide plakk, så vel som i *in vivo*-fjerning av de på forhånd eksisterende, amyloide plakkavsetninger. Antistoffmolekylene eller blandingene ifølge oppfinnelsen kan videre bli benyttet i passive immuniseringsmetoder mot A β -peptid og aggregater av A β , det vil si amyloid β -plakk. Fjerning av A β 4/A β 4-avsetninger kan
- 35 blant annet bli oppnådd ved den medisinske anvendelsen av antistoffer av den foreliggende oppfinnelsen som omfatter en Fc-del. Nevnte Fc-del av et antistoff kan være spesielt nyttig i Fc-reseptormedierte immunresponser, for eksempel tiltrekkingen

av makrofager (fagocytiske celler og/eller mikroglia) og/eller hjelperceller. For medieringen av Fc-del-relaterte immunresponser, er antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen fortrinnsvis i et (humant) IgG1-rammeverk. Som diskutert her er det foretrukket individet som skal bli behandlet med de oppfunne antistoffmolekylene eller antistoffblandingen, et humant individ. Andre rammeverk, slik som IgG2a- eller IgG2b-rammeverk for de oppfunne antistoffmolekylene er også forestilt seg. Immunglobulinrammeverk i IgG2a og IgG2b-format er spesielt forestilt seg i musesettinger, for eksempel i forskningsmessige anvendelser av de oppfunne antistoffmolekylene, for eksempel i tester på transgene mus uttrykkende (human) villtype eller mutert APP, APP-fragmenter og/eller A β 4.

De ovenfor nevnte sykdommene assosiert med amyloidogenese og/eller amyloid plakkdannelse omfatter, men er ikke begrenset til, demens, Alzheimers sykdom, motorisk neuropati, Parkinsons sykdom, ALS (amyotrofisk lateral sklerose), scrapie, HIV-relatert demens, så vel som Creutzfeld-Jakob-sykdom, arvelig cerebral blødning med amyloidose hollandsk type, Downs syndrom og neuronale lidelser relatert til aldring. Antistoffmolekylene og oppfinnelsen og sammensetningene tilveiebrakt her, kan også være nyttige i forbedringen eller forebyggingen av inflammatoriske prosesser som er relatert til amyloidogenese og/eller amyloid plakkdannelse.

Følgelig er det beskrevet en fremgangsmåte for behandling, forebygging og/eller forsinkning av neurologiske og/eller neurodegenererende lidelser omfattende trinnet av å administrere til et individ som lider av nevnte neurologiske og/eller neurodegenererende lidelser og/eller til et individ mottakelig for nevnte neurologiske og/eller neurodegenerative lidelser en effektiv mengde av et anti-A β -antistoffmolekyl eller en blanding av de oppfunne mono- og/eller dobbeltglykosylerte A-beta-antistoffene som tilveiebrakt her og/eller en sammensetning som definert her ovenfor. Behandlingen som tilveiebrakt her kan omfatte administrasjonen av forbindelsene/sammensetningene av denne oppfinnelsen alene eller i form av en koterapibehandling, det vil si i kombinasjon med andre medikamenter eller medisiner. I en spesielt foretrukket utførelsesform ifølge oppfinnelsen er en fremgangsmåte for behandling, forebygging og/eller forsinkning av neurologiske og/eller neurodegenererende lidelser tilveiebrakt som omfatter trinnet av å administrere til en pasient med behov for en korresponderende, medisinsk intervensjon, antistoffblandingen omfattende mono- og dobbeltglykosylerte antistoffer rettet mot A β også tilveiebrakt her.

Betegnelsen "behandling" som benyttet her, forestiller seg administrasjonen av mono- og/eller dobbeltglykosylerte antistoffer (eller blandinger derav) som beskrevet her til en pasient med behov derav. Nevnte pasient kan være en human pasient, i én utførelsesform er et menneske som lider fra eller er mottakelig for en lidelse, relatert til patologisk

5 APP-prosessering. Følgelig omfatter betegnelsen "behandling" som benyttet her, den profylaktiske, så vel som den kurerende administrasjonen av forbindelsene eller forbindelsesblandingene tilveiebragt her.

En lidelse som skal bli behandlet ved forbindelsene og sammensetningen tilveiebrakt

10 her, er Alzheimers sykdom. Pasienter som har en diagnose for sannsynlig Alzheimers sykdom basert på the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association-kriteriene for denne diagnosen (NINCDS/ADRDA-kriteriene) Mckhann et al., 1984.

15 Også forestilt seg i sammenheng av denne oppfinnelsen er den medisinske anvendelsen av forbindelsene og/eller sammensetningene tilveiebrakt her i en "koterapi"-setting, for eksempel i tilfelle av APP-relaterte lidelser, slik som Alzheimers sykdom. I nevnte tilfelle er koterapi med godkjente medikamenter, slik som memantin, doneprezil, rivastigmin eller galantamin, forestilt seg.

20

I en annen utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen et sett omfattende minst ett glykosylert antistoffmolekyl som definert her eller blandingen av de oppfunnede mono- og/eller dobbeltglykosylerte fremgangsmåtene som tilveiebrakt her. Fordelaktig omfatter settet av den foreliggende oppfinnelsen videre eventuelt (a)

25 buffer/buffere, lagringsløsninger og/eller gjenværende reagenser eller materialer nødvendige for å utføre medisinske, forskningsmessige eller diagnostiske tester og formål. Deler av settet ifølge oppfinnelsen kan videre bli pakket individuelt i rør eller flasker eller i kombinasjon i beholdere eller multibeholderenheter.

30 Settet av den foreliggende oppfinnelsen kan fordelaktig bli benyttet for å blant annet å utføre fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen og kan bli benyttet i et utvalg av anvendelser referert her, for eksempel som diagnostiske sett som forskningsverktøy eller medisinske verktøy. I tillegg kan settet ifølge oppfinnelsen inneholde midler for deteksjon egnet for forskningsmessige, medisinske og/eller diagnostiske formål.

35 Fremstillingen av settet følger fortrinnsvis standard prosedyrer som er kjent for fagpersoner.

Figurene viser:

- Figur 1:** Plasmidkart som viser setene for innsetting av tung- og lett-kjedesequensene.
- Figur 2:** Eksempler på et analytisk kromatogram
- Figur 3:** kromatogram av en CMT-kolonne som beskrevet i teksten. Dobbelglykosylerte og monoglykosylerte isoformer er eluert i dobbelttopp 1, den ikke-glykosylerte isoformen er eluert i topp 2.
- Figur 4:** hel IgG ESI-MS-analyse av ANTISTOFF A-isoformer. Molekylær masse av hovedtopp er indikert i Da. A: ikke-glykosylert ANTISTOFF A; B: monoglykosylert ANTISTOFF A; C: dobbeltglykosylert ANTISTOFF A
- Figur 5:** Skjema av utledede ANTISTOFF N-glykosyleringsmønstre. Strukturer som forekommer bare partielt er indikert ved parentes. A: Kompleks type; B: hybrid type; C: oligomannosetype; GlcNAc = N-acetylglukosamin, Man = mannose; Gal = galaktose; Fuc = fucose; NeuAc = N-acetylneuraminsyre
- Figur 6:** Skjematisk presentasjon av karbohydratstrukturer ved Asn306 av ANTISTOFF A utledet fra MS og HPAEC-PAD-analyse. Strukturer som forekommer bare partielt er indikert ved parentes. GlcNAc = N-acetylglukosamin, Man = mannose; Gal = galactose; Fuc = fucose; NeuAc = N-acetylneuraminsyre
- Figur 7:** Binding av ANTISTOFF A-isoformer til immobilisert fibrillær A β 40 (Biacore sensor chip). Antistoffkonsentrasjon er lik 60 nM. Bindingskurve av en blanding av alle isoformer, det vil si før rensing, er også vist som indikert.
- Figur 8:** Epitop kartlegging av ANTISTOFF A-SAMMENSETNING ved pepspot-analyse. A) pepspot-signaler av indikerte, enkle overlappende dekaeptidspotter; B) densitometrisk analyse av signalintensitet av enkle overlappende dekaeptidspotter.

- Figur 9:** Depolymeriseringstest. ANTISTOFF A-SAMMENSETNING og ANTISTOFF A-isoformer inducerer frigjøring av biotinyleret A β fra aggregert A β
- 5 **Figur 10:** ANTISTOFF A-SAMMENSETNING og omfattende ANTISTOFF A-isoformer fanger løselig A β fra human ryggmargsvæske (CSF). Gjennomsnitt på 4 CSF-prøver fra Alzheimers sykdomspasienter analysert i samling på 2. To immunpresipiteringer, etterfulgt ved Western blot per samling med kvantifisering av fanget A β ved densitometri av Western blott. Den høyeste A β -verdien på en gitt serie av Western blott ble tatt som 100 %
- 10
- Figur 11:** Indirekte immunfluorescensfarging av humane, amyloide plakk med ANTISTOFF A-isoformer *in vitro*. Sterkt sensitiv og spesifikk deteksjon av genuine *eks vivo*-humane, β -amyloide plakk etter farging med 10 ng/ml ANTISTOFF A-konsentrasjon. Bundet ANTISTOFF A ble vist ved geit anti-human (H+L)-Cy3 for (A) ANTISTOFF A-SAMMENSETNING; (B) dobbeltglykosylert ANTISTOFF A; (C) monoglykosylert ANTISTOFF A; og (D) ikke-glykosylert ANTISTOFF A. Skalastolpe = 80 μ m
- 15
- 20
- Figur 12:** *In vivo*-immundekorasjon av PS2APP-transgene museplakk med glykosylerte ANTISTOFF A-isoformer vist ved konfokal mikroskopi. Immundekorasjon viser *in vivo*-binding av ANTISTOFF A-isoformer 3 dager etter en enkel dose av 1 mg av ANTISTOFF A-isoformer. Representative bilder av distribusjonen av ANTISTOFF A-isoformer er vist for den dobbelt- (A), mono- (B) og ikke-glykosylerte (C) ANTISTOFF A-isoformen. Skalastolpe = 80 μ m
- 25
- 30 **Figur 13:** Bindingsanalyse av anti-A β -antistoffer til celleoverflate APP. Antistoffbinding til humane APP-transfektete HEK293-celler og ikke-transfektete kontrollceller analysert ved flow cytometri.
- Figur 14:** Skjema av ANTISTOFF A ikke-, mono- og dobbeltglykosylerte antistoffmolekyler (immunglobuliner).
- 35

- Figur 15:** Totalt plakkareal (A), totalt plakkantall (B) og plakkantall og størrelses-
distribusjon (C) i thalamusregionen etter 5 måneders behandling med
ANTISTOFF A-SAMMENSETNING (som omfatter mono- og dobbelt-
glykosylert ANTISTOFF A), dobbeltglykosylert og monoglykosylert
ANTISTOFF A-isoformer (20 mg/kg ukentlig, intravenøst) eller
leveringsmiddel.
- Figur 16:** Totalt plakkareale (A), totalt plakkantall (B) og plakkantall og størrelses-
distribusjon (C) i hjernebarken og corpus callosum-region etter
5 måneders behandling med ANTISTOFF A-SAMMENSETNING (som
omfatter mono- og dobbeltglykosylert ANTISTOFF A),
dobbeltglykosylerte og monoglykosylerte ANTISTOFF A-isoformer (20
mg/kg ukentlig, intravenøst) eller leveringsmiddel.
- Figur 17:** Totalt plakkareale (A), totalt plakkantall (B) og plakkantall og størrelses-
distribusjon (C) i hippocampusregionen etter 5 måneders behandling med
ANTISTOFF A-SAMMENSETNING (som omfatter mono- og dobbelt-
glykosylert ANTISTOFF A), dobbeltglykosylerte og monoglykosylerte
ANTISTOFF A-isoformer (20 mg/kg ukentlig, intravenøst) eller
leveringsmiddel.
- Figur 18:** Totalt plakkareale (A), totalt plakkantall (B) og plakkantall og størrelses-
distribusjon (C) i subiculumregionen etter 5 måneders behandling med
ANTISTOFF A-SAMMENSETNING (som omfatter mono- og dobbelt-
glykosylert ANTISTOFF A), dobbeltglykosylerte og monoglykosylerte
ANTISTOFF A-isoformer (20 mg/kg ukentlig, intravenøst) eller
leveringsmiddel.
- Figur 19:** Måling av fluorescensintensitet av immunfarget ANTISTOFF A-
SAMMENSETNING bundet til amyloid- β -plakk etter to ganger ukentlig
dosering av 0,1 mg/kg med 1, 2 og 4 intravenøse tilføyinger til PS2APP-
mus. Analyse ble gjort 2 uker etter siste injeksjon.
- Figur 20:** Måling av fluorescensintensitet av immunfarget ANTISTOFF A-
SAMMENSETNING bundet til amyloid- β -plakk etter månedlig dosering
av 0,15 mg/kg med 2 og 3 intravenøse tilføyinger til PS2APP-mus.
Analyse ble gjort 2 uker etter siste injeksjon.

- Figur 21:** Måling av fluorescensintensitet av immunfarget ANTISTOFF A-SAMMENSETNING bundet til amyloid- β -plakk etter 4 to ganger ukentlige injeksjoner av 0,05, 0,1 og 0,30 mg/kg til PS2APP-mus, som antyder doserelatert amyloid-plakkbinding. Analyse ble gjort 2 uker etter siste injeksjon.
- Figur 22:** Måling av fluorescensintensitet av immunfarget ANTISTOFF A-SAMMENSETNING bundet til amyloid- β -plakk etter 3 månedlige injeksjoner av 0,075, 0,15 og 0,45 mg/kg til PS2APP-mus, som antyder doserelatert amyloid-plakkbinding. Analyse ble gjort 2 uker etter siste injeksjon.
- Figur 23:** Humane AD-hjernesnitt farget mot A β med anti-A β -murint, monoklonalt antistoff (BAP-2) etter 40 timers inkubering med ANTISTOFF A-SAMMENSETNING ved indikerte konsentrasjoner sammen med levende, differensierte, primærhumane makrofager (0,8 million celler/ml). Resultatene viser reduksjon i amyloid last som indikerer antigenavhengig, cellulær fagocytoseeffekt av ANTISTOFF A-SAMMENSETNING på amyloid- β -plakk. Skalastolpe = 300 μ m.
- Figur 24:** Doserespons av ANTISTOFF A-SAMMENSETNING på amyloid- β -plakk fra humane AD-hjernesnitt når inkubert med 0,8 millioner celler/ml. (A) viser totalt plakkareale og (B) fargeintensitet.
- Figur 25:** Fluorescensmikroskopi av P388D1-celler inkubert med 0, 0,1, 1 og 10 μ g/ml ANTISTOFF A-SAMMENSETNING (henholdsvis A til D).
- Figur 26:** Kvantitativ måling av doserespons av ANTISTOFF A-SAMMENSETNING ved å benytte A β -konjugerte fluorkuler og P388D1-celler (vist i relative fluorescensenheter, RFU). To uavhengige eksperimenter indikerer et betraktelig område av virkeevne for ANTISTOFF A-SAMMENSETNING.
- Figur 27:** Tabell som viser forskjellige glykanstrukturer av ANTISTOFF A i den konstante regionen av den tunge kjeden (Asn 306; første to kolonner) og

64

den variable regionen av den tunge kjeden (Asn 52; trede og fjerde kolonne).

Eksempler

- 5 De følgende ikke-begrensede eksemplene illustrerer oppfinnelsen.

Eksempel 1**Generering av ANTISTOFF A via kloningsteknikker**

I overensstemmelse med den foreliggende oppfinnelsen ble et IgG1-molekyl generert via alminnelige kloningsteknikker. ANTISTOFF A er i dets kodende sekvens og i dets uttrykte aminosyresekvens karakterisert ved dets variable region av den tunge kjeden (V_H). Det korresponderende eksemplet av en tung kjede er kodet ved en DNA-sekvens som følger:

```

10  caggtggaattggtggaaagcggcggcgccctggtgcaaccggcggcagcctgcgtctgagctgcgcggcctccggatt
    taccttagcagctatgcgatgagctgggtgcgccaagccctgggaagggtctcgagtggtgagcgtattaatgcttctgg
    tactcgtacttattatgctgattctgtaagggtcgtttaccatttcacgtgataattcgaaaaacaccctgtatctgcaaatgaaca
    gcctgcgtgcggaagatacggccgtgtattattgcgcgcgtgtaagggttaatactcataagccttatggttatgttcgttatttg
    atgttggggccaaggcaccctggtgacggttagctcagcctccaccaagggtccatcggtcttccccctggcaccctcctcc
15  aagagcacctctgggggcacagcggccctgggtgctgctgtaaggactacttccccgaaccggtgacggtgctgctggaac
    tcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgac
    cgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaaacaccaaggtggacaagaa
    agttgagccagatatctgctgatatctgcaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctg
    gggggaccgtcagttcttcttcccccaaaaccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggt
20  ggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaa
    gccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggca
    aggagtacaagtgcagggtcctcaaaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctcaaagccaaagggcagccc
    cgagaaccacaggtgtacacctgcccccatccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtgtaaa
    ggcttctatcccagcgacatgccgtggagtggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgt
25  gctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcat
    gctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga (SEKV.ID.
    NR: 5).

```

og koder for den følgende immunoglobulin H-kjeden:

```

30  QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINA
    SGTRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKGNTHK
    PYGYVRYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
    FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
35  KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
    TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
    DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL

```

TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEKV.ID. NR: 6)

- Den samme tunge kjeden kan også bli kodet ved en sekvens omfattende en ytterligere
5 "ledersekvens" som vist i den følgende sekvensen

atgaaacacctgtggttctctctgctggggcagctcccagatgggtcctgtcc
caggtggaattggtgaaagcggcggcgctgggtgcaaccgggcggcagcctgcgtctgagctgcgcggcctccggatt
taccttagcagctatgcatgagctgggtgccaagccctgggaagggtctcagtggtgagcgtattaatgcttctgg
10 tactcgtacttattatgctgattctgtaagggtcgtttaccatttcacgtgataattcgaaaaacacctgtatctgcaaatgaaca
gcctgcgtgcggaagatacggccgtgtattattgcgcgcgtgtaagggttaatactcataagccttatggttatgttcgttatttg
atgttggggccaaggcaccctgggtgacggttagctcagcctccaccaagggtccatcggttctccccctggcaccctcctcc
aagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctgggtcaaggactactccccgaaccggtgacggtgtcgtggaac
tcaggcgccctgaccagcggcgtgcacacctccccggtgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgac
15 cgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaa
agttgagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagctcttcc
tcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctccccgagccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacga
agacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagt
acaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaagg
20 tctcaacaaagccctccagccccatcgagaaaacctctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtaca
ccctgccccatccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatccagcgacat
cgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgcctcccgctggtgactccgacggctcct
tcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgttctctcatgctccgtgatgcatgaggt
ctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga (SEKV.ID. NR: 25)

- 25 Det korresponderende aminosyresekvensen vil være

MKHLWFFLLLVAAPRWVLS
QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINA
30 SGTRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKGNTHK
PYGYVRYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
35 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEKV.ID. NR: 26).

På lignende måte er den lette kjeden av ANTISTOFF A kodet ved den følgende nukleotidsekvensen:

5 gataatgctgacccagagcccggcgaccctgagcctgtctccggcggaacgtgcgaccctgagctgcagagcgagcca
gagcgtgagcagcagctatctggcgtggtaccagcagaaaccaggtcaagcaccgcgtctattaatttatggcgcgagcagc
cgtgcaactgggggtcccggcgcggttttagcggctctggatccggcacggattttaccctgaccattagcagcctggaacctga
agactttgcgacttattattgccttcagattataatatgcctattacctttggccagggtacgaaagtgaaattaaacgtacgggtg
gctgcaccatctgtcttcattctcccgcctatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgctgcctgctgaataacttct
10 atcccagagaggccaaagtacagtggaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcag
gacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaagcagactacgagaaacacaaagtctacgc
ctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgttag (SEKV.ID.
NR: 7)

15 og koder for den følgende aminosyresekvensen (L-kjede):

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR
ATGVPARFSGSGGTDFTLTISSLEPEDFATYYCLQIYNMPITFGQGTKVEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
20 EQDSKDSTYSLSSLTLISKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC
(SEKV.ID. NR: 8).

Igjen kan også her en "ledersekvens" bli benyttet og de korresponderende sekvensene vil være

25 atgggtgtgagacccaggtcttcatttctgttgctctggatctctggtgcctacggg
gataatgctgacccagagcccggcgaccctgagcctgtctccggcggaacgtgcgaccctgagctgcagagcgagcca
gagcgtgagcagcagctatctggcgtggtaccagcagaaaccaggtcaagcaccgcgtctattaatttatggcgcgagcagc
cgtgcaactgggggtcccggcgcggttttagcggctctggatccggcacggattttaccctgaccattagcagcctggaacctga
30 agactttgcgacttattattgccttcagattataatatgcctattacctttggccagggtacgaaagtgaaattaaacgtacgggtg
gctgcaccatctgtcttcattctcccgcctatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgctgcctgctgaataacttct
atcccagagaggccaaagtacagtggaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcag
gacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaagcagactacgagaaacacaaagtctacgc
ctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgttag (SEKV.ID.
35 NR: 27).

Denne sekvensen koder for den følgende aminosyresekvensen

MVLQTQVFISLLLWISGAYG
 DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR
 5 ATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFATYYCLQIYNMPITFGQGTKVEIKRTV
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
 EQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 (SEKV.ID. NR: 28).

10 Disse sekvensene ovenfor er kjent fra MAB31 som angitt i WO 03/070760.

De tunge og lette kjedene av det eksemplifiserte ANTISTOFF A kan imidlertid også være kodet ved en sekvens som vist nedenfor:

15 a) den tunge kjeden
 atggagtttgggctgagctgggttttctcgttgctctttaagaggtgattcatggagaaatagagagactgagtgtg
 agtgaacatgagtgagaaaaactggatttgtgtggcattttctgataacgggtgctccttctgttgcagggtgccagtgtc
 aggtggagctgggtggagctcgggggagggcctgggtccagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcgtct
 ggattcaccttcagtagctatgccatgagctgggtccgcccagggtccaggcaaggggctcgagtgggtgtccgcc
 20 ataaacgccagcggtagccgcacactactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattcca
 agaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggcaagg
 ggaacaccacacaagccctacggctacgtacgtactttgacgtgtggggccaaggaaacctgggtaccgtctcctc
 aggtgagtcctcacaacctctcctcgtcgggccgcagcttgaagtctgaggcagaatctgtccagggtctatcggac
 tcttgtgagaattaggggctgacagttgatgggtacaatttcagggtcagtgactgtctggtttctcgtagggtgagact
 25 ggaatataggtcaccttgaagactaaagaggggtccaggggcttttctgcacaggcagggaacagaatgtggaac
 aatgacttgaatgggtgattcttgtgtacaccaagaattggcataatgtctgagttgcccagggtgatcttagctag
 actctggggttttgcgggtacagagggaaaaaccactattgtgattactatgctatggactactgggtcaaggaa
 cctcagtcaccgtctcctcaggtaagaatggcctctccagggttttttaacctttgttatggagtttctgagcattg
 cagactaatcttgataatttgcctgagggagccggctgagagaagttgggaataaatctgtctagggatctcaga
 30 gcctttaggacagattatctccacatctttgaaaaactaagaatctgtgtgatggtgttgggtgagtccttgatgatg
 ggatagggactttggaggctcatttgaggagatgctaaaacaatcctatggctggaggatagttggggctgtag
 ttggagatttcagttttagaatgaagtattagctgcaacttcaaggaccacctctgtgacaaccattttatacagtat
 ccaggcatagggacaaaaagtgagtgagggtcatttcttagatttgtgaggaatgtccactagattgttataaa
 cttcatttgttgaaggagctgtcttagtgattgagtcaggggagaaaggcatctagcctcggtctaaaagggtagt
 35 tgctgtctagagaggtctgggtggagcctgcaaaagtcagcttcaaagggaacacagaagtatgtgtatggaatatt
 agaagatgttgcctttactcttaagtgtgttcctaggaaaaatagtaaatactgtgactttaaaatgtgagagggtttca
 agtactcatttttttaaatgtccaaaattttgtcaatcaatttgaggcttgttgtgtagaactgacattacttaagtttaa

69

ccgaggaatgggagtgaggctctctcataccctattcagaactgacttttaacaataataaattaagttaaaatatttt
 aatgaattgagcaatgttgagtgagtcagatggccgatcagaaccggaacacctgcagcagctggcaggaag
 caggctcatgtggcaaggctatttggggaagggaataaaaccactaggtaaactttagctgtggttgaaagaagt
 ggtttgaacactctgtccagccccaccaaacgaaagtcaggctgagcaaacaccacctgggtaatttgcatt
 5 tctaaaataagttgaggattcagccgaaactggagaggtcctctttaaacttattgagttcaaccttttaatttagcttga
 gtagttctagtttcccaaaacttaagtttatcgacttctaaaatgtatttagaattcgagctcgggtacagctttctggggca
 ggccaggcctgaccttggcttggggcagggagggggctaaggtgagggcaggtggcgccagcaggtgcacac
 ccaatgccatgagcccagacactggacgtgaacctcgcggacagtaagaaccaggggcctctgcgcctgg
 gcccagctctgtccacaccgcggtcacatggcaccactctcttgcagcctccaccaaggggcccatcggtcttcc
 10 ccctggcacccctcctcaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtaaggactacttccccg
 aaccgggtgacggtgtctggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgtcctacagctct
 caggactctactccctcagcagcgtggtgacctgcccctcagcagcttgggcaccagacctacatctgcaacgt
 gaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttggtgagaggccagcacaggaggaggagggtgtc
 tgctggaagccaggctcagcgtcctcctggacgcateccggctatgcagccccagtcaggggcagcaaggca
 15 ggccccgtctgcctcttaccggagcctctgcccggccactcatgtcaggagagggtcttctggcttttccc
 aggtcttgggcaggcacaggctaggtgcccctaaccaggccctgcacaaaaggggcaggtgtgggtcag
 acctgccaagagccatatccgggaggaccctgcccctgacctaaagcccaccccaaggccaaactctccactcc
 ctgagctcggacaccttctctcctcccagattccagtaactccaatcttctctgagagcccaaatctgtgacaa
 aactcacacatgcccacgtgcccaggtaagccagcccaggcctcgcctccagctcaaggcgggacaggtgc
 20 cctagagtagcctgcatccagggacaggccccagcgggtgctgacacgtccacctcatcttctcctcagcacct
 gaactcttggggggaccgtcagcttctcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccgacccctg
 aggtcacatgcgtggtggtgacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactgtgtgacggcgtg
 gaggtgcataatccaagacaaagccgaggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtgtcagcgtcctcac
 cgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaagccctcccagccccat
 25 cgagaaaacatctccaagccaaaggtgggaccctggggtgagaggccacatggacagaggccggctcg
 gccaccctctgcccagagtgaccgtgtaccaacctctgtccctacagggcagccccgagaaccacaggtgt
 acacctgccccatccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatc
 ccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccggtgt
 ggactccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtctt
 30 ctcatgtccgtgatgatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtccccgggcaaatga
 (SEKV.ID. NR: 23)

b) den lette kjeden
 atggacatgagggtcctcgctcagctcctggggtcctgctgctctgtttccaggttaaggatggagaacactagca
 35 gtttactcagcccagggtgctcagctactgtttactattcagggaattcttacaacatgattaattgtgtggacattt
 gttttatgtttcaatctcaggcgccagatgtgatctgtgtgacgcagctctccagccacctgtcttctccagg
 ggaaagagccacctctcctgcccgggagtcagagtgtagcagcagctacttagcctgggtaccagcagaacc

tggccaggcgcccaggctcctcatctatggcgcatccagcagggccactggcgtgccagccagggtcagtgga
 gtgggtctgggacagacttactctcaccatcagcagcctggagcctgaagattcgcgacctattactgtctgcag
 atttacaacatgcctatcacgttcggccaagggaaccaaggtggaaatcaaacgtgagtagaatttaaactttgcggc
 cgcttagacgtttaagtgggagatttggaggggatgaggaaatgaaggaaactcaggatagaaaagggtgaagtc
 5 aagttcagctcctaaaatggatgtgggagcaaactttgaagataaactgaatgaccagaggatgaaacagcgca
 gatcaaagaggggctggagctctgagaagagaaggagactcatccgtgtgagttccacaagtactgtcttgag
 ttttgcaataaaagtgggatagcagagttgagtgagccgtaggctgagttctctctttgtctcctaagttttatgacta
 caaaaatcagtagtatgtcctgaaataatcattaagctgtttaaagtatgactgctgccatgtagataccatgcttgc
 tgaatgatcagaagaggtgtgactcttattctaaaattgtcacaaaatgtcaaatgagagactctgtaggaacgagt
 10 ccttgacagacagctcaagggttttttcttctcatttctacatgaaagtaaattgaaatgatctttttattataag
 agtagaaatacagttgggttgaactatatgtttaatggccacggttttgtaagacatttggctctttgtttccagttat
 tactcgattgtaattttatatcgcagcaatggactgaaacgggtccgcaacctcttcttacaactgggtgacctcgcg
 gctgtgccagccatttggcgttcaccctgccgctaagggccatgtgaacccccgggtagcatccctgtcctccgcg
 tggaccactttctgaggcacagtgtatggaacagagccactaatctgaagagaacagagatgtgacagactaca
 15 ctaatgtgagaaaaacaaggaaagggtgacttattggagatttcagaaataaaatgcatttattattatattccctatttt
 aattttctattagggaattagaagggcataaactgctttatccagtgttatataaaagcttaattatataatcttttaga
 ggtaaaatctacagccagcaaaagtcattgtaaatattcttggactgaactctcactaaactccttaattatattgcat
 attactgggttaattaataataaatttggacatgaccttaactgggttaggtaggatatttttctcatgcaaaaatagact
 aataataatttagcacaataatttcccaactttaattctgtgatagaaaaatgttaactcagctactataatcccat
 20 aattttgaaaactatttattagctttgtgttgacccttccctagccaaaggcaactatttaaggacctttaaaactctg
 aaactacttttagagtcattaaagtatttaaccacttttaattactttaaaatgatgtcaattcccttttaactattaattttta
 aggggggaaaggctgtctataattctattgttttcttggtaaagaactctcagttttcttactacctgtgcacca
 agagttggcatctcaacagaggggactttccgagaggccatctggcagttgcttaagatcagaagtgaagtctgcc
 agttctcccaggcaggtggccagattacagttgacctgttctggtgtggctaaaaattgtcccatgtggttataaaa
 25 ccattagaccagggtctgatgaattgtcagaaatatttctggacacccaaatacagaccctggcttaaggccctgtcc
 atacagtaggttttagcttggctacaccaaagggaagccatacagaggctaataacagagtattcttgaagagacagg
 agaaaatgaaagccagtttctgtcttaccctatgtgtgtgttcagactccaaacatcaggaggtgcagataaact
 ggtctgaatctctgtcgaagcatggaactgaaagaatgtagtttcagggaagaaaggcaatagaagggaagcctg
 agaatacggatcaattctaaactctgaggggggtcggtgacgtggccattctttgcctaaagcattgagtttactgca
 30 aggtcagaaaagcatgcaaagccctcagaatggctgcaaagagctccaaacaaacaaatttagaactttattaagga
 atagggggaagctaggaagaaactcaaaacatcaagattttaatacgtcttctgtgtctcttataattatctggg
 ataagcatgctgtttctgtctgtccctaacatgccctgtgattatccgcaaacacacaccaagggcagaactttgtt
 acttaaacaccatcctgtttgtcttctcctcaggaactgtggctgcacacatctgtcttcatcttcccgcacatgatgag
 cagttgaaatctggaactgcctgtgtgtgtcgtctgaataacttctatccagagaggccaaagtacagtggag
 35 gtggataacgccctccaatcgggtaactccaggagaggtgcacagagcaggacagcaaggacagcacctaca
 gcctcagcagcacctgtacgtgagcaaaagcagactacgagaaacaaagtctacgcctgcgaagtcacccat
 cagggcctgagctcgccgtcacaaagagcttaacaggggagagtgtag (SEKV.ID. NR: 24)

Eksempel 1.1

Vektorkonstruksjon

- 5 Sekvenser for ANTISTOFF A stammer fra 2. modningsrunden etter primær screening av MorphoSys HuCAL-biblioteket, et syntetisk fagfremvisningsbibliotek. DNA-et for ANTISTOFF A ble opprinnelige tilveiebrakt i vektorer pMorph fra MorphoSys, Tyskland og korresponderer til Fab-uttrykkende vektorer i figur 2 i WO 03/070760, vedlegg p 6/43. I vektorkonstruksjonen for formålet av den foreliggende oppfinnelsen, er vektorer pEE6.1 og pEE 14.4 (begge kommersielt tilgjengelige fra Lonza Biologics
- 10 kodet til å oppnå en konstruksjon med begge kjeder i én vektor, se vedlagt figur 1; se WO 87/04462 eller WO 89/01036 . Den følgende kloningsstrategien ble benyttet:

- Ig kappa-kjeden ble isolert fra vektor MS-Roche #7.9.H7_Ig_kappa-kjede (som
- 15 beskrevet i WO 03/070760) ved PCR med primer ACGTAAGCTTGCCGCCACCATGGTGTTCAG (sens, HindIII; SEKV.ID. NR.: 29) og primer ACGTGAATTCCTAACACTCTCCCCTGTT (antisens, EcoRI; SEKV.ID. NR.: 30), innsatt i pCR 2.1 Topo TA og innskuddet ble fullstendig sekvensert. Ig-kappa-kjedeinnskuddet ble fjernet fra pCR Topo 2.1 ved HindIII/EcoRI-fordøying og
- 20 ligert inn i vektor pEE14.4 som HindIII/EcoRI-innskudd.

- Den Ig gamma 1 tunge kjeden ble klonet fra vektor pMorph MS-Roche #7.9.H7_IgG1 ved PCR med primer ACGTAAGCTTGCCGCCACCATGAAACACCTG (sens, HindIII; SEKV.ID. NR: 31) og primer ACGTGAATTCTCATTACCCGGAGACAG
- 25 (antisens, EcoRI; SEKV.ID. NR: 32), satt inn i pCR 2.1 Topo TA, og innskuddet ble fullstendig sekvensert. Det Ig gamma 1 tungkjede-innskuddet ble fjernet fra pCR Topo 2.1 ved HindIII/EcoRI-fordøying og ligert inn i vektor pEE 6.4 som HindIII/EcoRI-innskudd. Tungkjede-ekspresjonskassetten ble fjernet fra pEE 6.4 IgG1 ved NotI/SalI-fordøying og det isolerte fragmentet ble satt inn i SalI/NotI-fordøyd pEE14.4 kappa
- 30 resulterende i den endelige dobbeltgenkonstruksjonen pEE 14.4 mAb-31.

Eksempel 1.2:

Transfeksjon av CHO-celler og ekspresjon av ANTISTOFF A

- 35 Transfeksjoner ble utført i overensstemmelse med standard protokoller. Vertscellelinjen CHO K1 ble derivert fra Lonza Biologics arbeidscellebanken (WCB) # 028-W2 (Lonza,

2002, 1-179) og vertscellelinjen CHO K1 SV ble derivert fra Lonza Biologics master-cellebanken (MCB) #269-M (Lonza, 2003, 1-87).

Adherente CHO K1-celler derivert fra WCB # 028-W2 ble transfektert med vektoren
 5 pEE 14.4 MAb31 inneholdende både tung og kappa lettkjedegener ved liposomal
 transfeksjon (Fugene, Roche Diagnostics). Transfeksjonsisolater ble selektert i DMEM,
 GS-supplement (både JRH Biosciences), 10 % dialysert FCS (PAA Laboratories,
 CoS#R0-CEP 2001-083-Rev 00) og 50 µM metioninsulfoksimin (MSX fra Sigma).
 2 uker senere ble kolonier plukket og overført til 96 brønners plater og testet med
 10 ELISA for antistoffproduksjon. 4 kolonier med den høyeste ekspresjonen av
 ANTISTOFF A ble klonet ved en serie begrenset fortynning for å oppnå
 enkelcellederiverte kulturer, hvorav 82 kloner ble derivert etter én uke og ekspandert.

En av disse klonene ble selektert som én med den høyeste spesifikke produksjonsraten
 15 av 48 pg/celle/dag i adherent tilstand. Den ble videre subklonet ved begrensende
 fortynning for å oppnå de gode produsentene som uttrykker ANTISTOFF A med høy
 stabilitet (Pu, (1998) Mol Biotechnol, 10, 17-25). En suspensjonsvariant av CHO K1-
 cellene, CHO K1 SV-celler fra MCB #269-M, ble i tillegg transfektert med vektoren
 pEE 14.4 MAb31 ved elektroporering. Transfektanter ble selektert som tidligere og de
 20 resulterende klonene ble utsatt for enkeltcellekloning ved begrensende fortynning
 resulterende i flere høyt produserende kloner av ANTISTOFF A.

Eksempel 1.3

Tilpasning av kloner uttrykkende ANTISTOFF A til suspensjonskultur

25 Best vekstegenskaper av CHO K1-kloner ble bestemt i DHI-medier med forskjellige
 proteinhydrolysater. Celler ble til slutt tilpasset til DHI-medier uten glutamin
 (Invitrogen), som er en blanding av DMEM, Hams F12 og IMDM i de respektive
 forholdene av 1:1:2 (volum:volum:volum) (Schlaeger and Schumpp, 1992, J Immunol
 30 Methods, 146, 111-20) med de følgende modifikasjoner: soya og rishydrolysater: 0,2 %
soya HyPep 1510 og 0,2 % *ris HyPep 5603* (Kerry Bioscience), 0,03 % Pluronic F68
 (Invitrogen), 25 µM MSX (Sigma) og 5 % dialysert FCS (PAA Laboratories). FCS-
 konsentrasjon ble redusert gradvis inntil celler ikke vokser eksponentielt i serumfrie
 DHI-medier. Primære såkornbanker i serumfrie DHI-medier ble frosset fra flere
 35 rekombinante cellekloner.

CHO K1 SV-kloner ble tilpasset fra DMEM inneholdende 10 % dialysert FCS til suspensjonskultur i det kjemisk definerte CD-CHO-mediene med 25 μ M MSX (Gibco-Invitrogen) i en totrinnsprosedyre (Lonza). Cellebanker ble skapt i CD-CHO. Eventuelt kan hvilke som helst andre serumfrie og proteinfrie medier for CHO-celler bli benyttet for suspensjonskultur og som en base for uttrykking av antistoffet.

Eksempel 2

Produksjon av ANTISTOFF A

10 Produksjon av ANTISTOFF A (ved tilført-sats fermentering)

CHO-kloner ble preparert for fermentering fra stamkulturer i enten risteflasker eller spinnerkulturer som følger:

Et cryo-rør av de respektive klonene ble tint i de respektive dyrkningsmediene inneholdende 25 μ M MSX i en 100 ml risteflaske eller spinner med et nominelt volum på 50-75 ml.

Celler ble så ekspandert i etterfølgende splittings på 1:5 for å nå en stamkultur på 400-500 ml volum i enten risteflasker eller spinnere. Celler benyttet for inokulering av fermentere kan bli derivert fra disse stamkulturene opp til 90 dager etter dyrking. Utsåingsrekken utgjør et 2 x 1000 ml trinn i 2 l riskeflasker eller spinnere, etterfulgt ved inokulering av en 10 l fermentor som et videre kar. Alternativt kan 10 l fermentoren fungere som fôret-satskaret i seg selv eller som inokulat for 100 l fôr-sats fermentoren. MSX når til stede i dyrkningsmediene for seleksjon inntil inokuleringen av 10 l fermentoren, hvorved det ble ekskludert.

Fermenteringsprosess:

Dag 0: Start med $3-4 \times 10^5$ /ml celler (1:4 -1:5 splitting fra utsåingskultur)

Dag 2-3: start av fôring, celletetthet burde være omkring $1,5 \times 10^6$ /ml.

30 Fôring: Kontinuerlig eller bolusfôring ved 2 % per dag.

Isoformsammensetningen av ANTISTOFF A ble monitorert gjennom fermenteringen ved ionebyttekromatografi (se nedenfor).

35 Dag 14-18: Når viabiliteten av cellene startet å falle (50 %) og de forventede titerne ble nådd, ble cellesupernatanten høstet ved sentrifugering og/eller filtrering og filter-

sterilisert. Den ble lagret aseptisk og ytterligere prosessert som beskrevet i den neste delen.

- 5 Fermenteringen ble utført i overensstemmelse med standard protokoller, se for eksempel Werner, (1993), Arzneimittelforschung, 43, 1242-9 eller Rendall, (2003). Proceedings of the 18th ESACT meeting, 11.-14. mai 2003, 1, 701-704).

Eksempel 3

Rensing av ANTISTOFF A

- 10 Renseprosessen ble basert på tre kromatografiske trinn og et diafiltreringstrinn: Protein A affinitetskromatografi, ionebyttekromatografi, anionbyttekromatografi og diafiltrering ved å benytte en 100 kD membran. Geltypene og kolonnestørrelser var 1 l MabSelect (GE Healthcare, Art. 17-5199, kolonnediameter 9 cm, bunnlengde 18 +/- 2 cm), 0.4 l CM-Toyopearl 650M (Toso Bioscience, Art. 007972, liten ionekapasitet =
- 15 85 mikroekvivalenter/ml, diameter 5,0 cm, bunnlengde 20 +/- 2 cm), 1,3 l Q-Sepharose FF (GE Healthcare, Art.17-0510-04), diameter 9 cm, bunnlengde 20 +/- 2 cm. Kolonner ble kjørt ved romtemperatur. Fraksjoner ble lagret ved 2 – 8 °C. Deteksjon var ved 280 nm. En Biomax 100 ultrafiltreringsmodul med et areal på 0,1 m² (Millipore Corp. Art. P2B100A01) ble benyttet for konsentrasjon og diafiltrering.

20

Protein A-kromatografi

De følgende løsningene ble preparert ved å benytte renset vann:

- 25 Løsning A (ekvilibreringsbuffer): 25 mM Tris, 25 mM NaCl, 5 mM EDTA, justert til pH 7,1 +/-0,1 ved HCl

Løsning B (vaskebuffer 1): 100 mM eddiksyre justert til pH 4,5 +/-0,1 ved NaOH

- 30 Løsning C (elueringsbuffer): 100 mM eddiksyre justert til pH 3,2 +/-0,1 ved NaOH

Løsning D (vaskebuffer 2): 100 mM eddiksyre, 75 mM NaCl, pH 3 +/- 0,1

- Løsning E: (regenereringsbuffer): 2 M guanidiniumhydroklorid, 100 mM Tris, justert til
- 35 pH 7,5 +/-0,1 ved HCl

Løsning F (lagringsbuffer): 200 mM benzylalkohol, 100 mM eddiksyre, justert til pH 5,0 $\pm$ 0,1 ved natriumhydroksid

Kolonnen ble først ekvilibrert med 3 bunnvolum av løsning A

5

I det følgende ble det ladet med den klarede celledyrkningssupernatanten (45 l, 386 mg/l antistoff)

vasket med 5 bunnvolum av løsning A,

vasket med 3 bunnvolum av løsning B,

10

eluert med 3,5 bunnvolum av løsning C og eluatet ble samlet,

vasket med 3 kolonnevolum av løsning D og

regenerert med 2 kolonnevolum av løsning E

ekvilibrert med 3 bunnvolum av buffer A

og vasket med bunnvolum av buffer F for lagring.

15

En lineær strømningshastighet på 100 cm/timer ble benyttet for alle kromatografiske trinn.

Kolonnелasten var 17,4 g antistoff /l Mabselect gel og utbytte for den totale blandingen

20

av isoformer var 96 %.

Viral inaktivering

Den følgende løsning ble preparert ved å benytte renset vann:

25

Løsning G (justeringsløsning): 2 M natriumacetat

pH av protein A-eluatet ble justert til en pH mellom 3,5 til 3,7 ved tilsetting av konsentrert eddiksyre eller 2 M natriumacetat (løsning G). Den ble omrørt i 15 min og så justert til pH 4 $\pm$ 0,1 ved tilsetting av 2 M natriumacetat (løsning G).

30

Kationbytterkromatografi

De følgende løsningene ble preparert ved å benytte renset vann:

Løsning H (ekvibreringsbuffer): 100 mM eddiksyre, justert til pH 4,0 $\pm$ 0,1 ved NaOH

35

Løsning I (elueringsbuffer 1): 250 mM natriumacetat uten pH-justering, pH 7,8-8,5.

Løsning J: (elueringsbuffer 2): 500 mM natriumacetat uten pH-justering, pH 7,8-8,5.

Løsning K (regenereringsløsning): 0,5 M natriumhydroksid.

5 Løsning L (lagringsbuffer): 0,01 M natriumhydroksid.

Kolonnen ble først regenerert med 2 bunnvolumer av løsning K og deretter ekvilibert med 5 bunnvolumer av løsning H.

10 I det følgende ble den ladet med en alikvot av protein A-eluatet og vasket med 1 bunnvolum av løsning H.

Lukket ble den eluert med 6 bunnvolum av løsning I. I dette trinnet ble en blanding av de dobbeltglykosylerte og monoglykosylerte isoformene eluert. I det neste trinnet ble
15 3 bunnvolumer av løsning J benyttet for å eluere de ikke-glykosylerte isoformene.

Etter anvendelse ble kolonnen regenerert med 2 bunnvolumer av løsning K, lagret i 24 timer i denne bufferen og ble så vasket igjen med 2 bunnvolumer av løsning K. For lagring ble den vasket med 3 bunnvolumer av løsning L.

20

Et eksempel på kromatogram er vist i Fig. 3.

Fraksjoner av kromatografien ble analysert ved analytisk IEX som beskrevet nedenfor.

25 En lineær strømningshastighet på 100 cm/timer ble benyttet for alle kromatografiske trinn.

Kolonnelasten var 14,3 g antistoff/l CM-Toyopearl 650 M, og utbyttet var 79 % for blandingen av dobbeltglykosylerte og monoglykosylerte isoformer og 6,2 % for de
30 ikke-glykosylerte isoformene.

Gjennomstrømningskromatografi ved å benyttet Q-Sefarose FF

De følgende løsningene ble preparert i renset vann:

35 Løsning M (fortynningsbuffer): 37,5 mM Tris, justert til pH 7,9 +/- 0,1 ved eddiksyre

Løsning N (justeringsløsning): 2 M Tris

Løsning O (ekvilibreringsbuffer): 83 mM natriumacetat, 25 mM Tris, pH 7,5 +/- 0,1

Løsning P (regenereringsbuffer 1): 0,5 M NaOH/1M NaCl

5

Løsning Q (regenereringsbuffer 2): 0,2 M eddiksyre/1 M NaCl

Løsning R (lagringsbuffer): 0,01 M NaOH

10 Eluatet fra CMT-kolonnen (surt) ble først fortynnet 1:3 med løsning M og så justert til pH 7,5 med løsning N.

Kolonnen ble første ekvilibrert med 2 bunnvolum av løsning O og i det følgende ble det fortynnete eluatet fra CMT-kolonnen prosessert over kolonnen og gjennomstrømningen
15 ble samlet. Produkt ble vasket av kolonnen med løsning med O inntil absorpsjonen ved 280 nm var lavere enn 0,1 (gjennomstrømning samlet).

Kolonnen ble regenerert med 1,5 bunnvolum av løsning P, lagret i 1 time og så regenerert med flere enn 1,5 bunnvolumer av løsning P. Så ble kolonnen regenerert med
20 2 bunnvolumer av løsning Q og vasket med 3 bunnvolumer av løsning R og lagret.

En lineær strømningshastighet på 100 cm/timer ble benyttet for alle kromatografiske trinn.

25 Kolonnelasten var 3,5 g antistoff/l Q Sepharose FF, og utbyttet var 91 % for blandingen av dobbeltglykosylerte og monoglykosylerte isoformer.

Diafiltrering

Den følgende løsningen ble preparert ved å benytte rensset vann:

30

Løsning S (diafiltreringsbuffer): 20 mM histidin, justert til pH 5,5 ved HCl

En filterholder Pellicon 2 (Millipore Corp.) ble utstyrt med 1 ultrafiltreringsmodul type Biomax 100 (Millipore Corp., areal = 0,1 m², Art.P2B100A01). En WATSON-
35 MARLOW 501 U-pumpe utstyrt med silikonrør, ble benyttet for pumping. Systemet ble rensset med buffer O og så ble 3,8 liter (1,1 g antistoff/l) av gjennomstrømningen fra QS-kromatografi (justert til pH 5,5 ved konsentrert eddiksyre) konsentrert til 250-300 ml i

løpet av 1 time ved 4-11 °C. I det følgende ble en diafiltrering (V = konst.) mot 3 liter av buffer S (omkring 10 volum) utført (4-11 °C). Til slutt ble produktet sterilfiltrert ved å benytte et Millipac 20 filter (Millipore Corp.). Utbyttet av ultrafiltrerings/diafiltrerings-trinnet var 91 %. Konsentrasjonen av produktet var 15 mg/ml. Produktet kan bli frosset ved -70 °C.

Analytisk IEX-metode for analyse av fraksjoner

Kolonne: Mono-S HR 5/5 (GE Healthcare, Art. 17-0547-01)

10 Buffer 1: 50 mM morfolinoetansulfonsyre, justert til pH 5,8 ved natriumhydroksid

Buffer 2: 50 mM morfolinoetansulfonsyre, 1 M NaCl justert til pH 5,8 ved natriumhydroksid

Stromningshastighet: 1 ml/min

15 Deteksjon: 280 nm

Provelast: 36-72 µ

Gradient: Tid % buffer 2

	0 min	0
	1	0
20	25	63
	27	63
	28	0
	35	0

25 Et eksemplarisk kromatogram er gitt i Fig. 2.

Utbytter

Trinn	Isoform	Trinnutbytte
MabSelect (Protein A)	Blandinger av alle isoformer	96 %
CM-Toyopearl 650 M	Blanding av monoglykosylert ANTISTOFF A og dobbeltglykosylert ANTISTOFF A Innhold av ikke-glykosylert ANTISTOFF A <0,5 %	79 %
	Ikke-glykosylert ANTISTOFF A	6,2 %
Q-Sepharose FF	Blanding av monoglykosylert ANTISTOFF A og dobbeltglykosylert ANTISTOFF A Innhold av ikke-glykosylert ANTISTOFF A < 0,5 %	91 %
Konsentrasjon og diafiltrering	Blanding av monoglykosylert ANTISTOFF A og dobbeltglykosylert ANTISTOFF A Innhold av ikke-glykosylert ANTISTOFF A < 0,5 %	91 %

Eksempel 4

5 Karakterisering av ANTISTOFF A-isoformer ved SDS-PAGE

- SDS-PAGE-analyse ble utført ved å benytte standardprotokoller med 4-12 % NuPage gradient Bis-Tris-gel (Invitrogen) og markør MARK12 (Invitrogen) som kontroll.
- 1-3 µg av protein A-rensede supernatanter fra fermenteringer (Prod 01, 02, 03) eller spinnerkulturer (alle andre spor) ble lastet per brønn. Analysen under reduserende forhold resulterte i et enkelt bånd for topp 1 (dobbeltglykosylert ANTISTOFF A), et dobbelt bånd for topp 2 (monoglykosylert ANTISTOFF A) og et enkelt bånd for topp 3 (ikke-glykosylert ANTISTOFF A) i området av den molekylære vekten av de tunge kjedene. De molekylære vektene av de to båndene av topp 2 korresponderte til de molekylære vektene av henholdsvis topp 1 og topp 2.

Lignende resultater ble oppnådd ved å benytte flere ekspresjonssystemer slik som: transienttransfeksjon i HEK 293 EBNA-celler, transienttransfeksjon i CHO-celler og stabil ekspresjon i CHO-celler.

Eksempel 5

Karakterisering av ANTISTOFF A-isoformer ved massespektrometrisk (MS) analyse

En fullstendig ANTISTOFF masseprofil av alle ANTISTOFF A-isoformer ble bestemt
5 ved elektronspray ioniseringsmassespektroskopi (ESI-MS).

For dette ble en prøve av ANTISTOFF A preparert under ikke-reduserende forhold. Provene ble avsaltet i 2 % maursyre og 40 % acetonitril ved G25 gelfiltrering og benyttet for ESI-MS-analyse i et Q-Tof2 eller LCT-massespektrometriinstrument fra
10 Waters.

En separasjon ved molekylær masse er oppnådd med en forskjell på 1623 mellom ikke-glykosylert ANTISTOFF A og monoglykosylert ANTISTOFF A. Den forventede massen for ikke-glykosylert ANTISTOFF A fra aminosyresekvensen er 145 987 Da,
15 som er i god overensstemmelse med den eksperimentelt bestemte massen på 145 979 Da. På lignende måte er mono- og dobbeltglykosylerte ANTISTOFF A-isoformer forskjellig ved 1624 Da som indikert i figur 4. De observerte forskjellene i molekylære masser er compatible med N-glykosyleringsmønstre som er beskrevet i mer detalj her nedenfor.

20

Eksempel 6

Asn-52-glykosyleringsstruktur av ANTISTOFF A

Asn52 er del av sekvensen aaa-aaa-Asn-Ala-Ser-aaa-aaa av den variable delen av den tunge kjeden som korresponderer til N-glykosyleringskonsensussekvensen Asn-aaa-Ser/Thr. N-forbundet glykosylering av Asn52 ble bekreftet ved tryptisk peptidkartlegging av ANTISTOFF A-isoformer og massespektrometrisk evaluering av peptid
25 HC/T4 inneholdende Asn52. I tryptiske peptidkart av ikke-glykosylert ANTISTOFF A, viser eksklusivt et peptid korresponderende av masse til ikke-glykosylert HC/T4-peptid seg, som indikerer at Asn52 ikke var glykosylert, imens de mono- eller
30 dobbeltglykosylerte ANTISTOFF A-peptidene ble detektert korresponderende ved masse til HC/T4 inneholdende N-forbundne sukkerstrukturer.

For å ytterligere bekrefte glykosylering av konsensussekvensen i det typiske peptidet HC/T4 av den tunge kjeden, ble det glykosylerte HC/T4-peptidet isolert fra peptidkart
35 av glykosylert ANTISTOFF A-isoformer og analysert ved MALDI-massespektrometri før og etter inkubering med N-glykosidase F. Før N-glykosidase F-behandling ble masser oppnådd korresponderende til HC/T4-peptid inneholdende N-forbundne sukker-

strukturer. Massen av HC/T4-peptid behandlet med N-glykosidase F, korresponderte imidlertid til massen forventet til ikke-glykosylert HC/T4 +1Da, som forventet om en sukkerkjede var fjernet fra asparaginen ved N-glykosidase F (Asn til Asp-omdannelse).

- 5 Nærværet av N-acetylneuraminsyrer ved sukkerstrukturene festet til Asn52, indikerer videre nærværet av N-forbundne komplekse og hybridtype sukkerstrukturer. Derfor ble glykosylerte ANTISTOFF A-isoformer behandlet med N-glykosidase F, som fjernet N-sukker ved Asn306, men ikke ved Asn52, og med eller uten neuraminidase og analysert etter separasjon av HC og LC ved denaturering og reduksjon og avsalting. Massene
10 oppnådd for HC fra begge metoder er forskjellige ved omkring 291 Da eller 582 Da korresponderende til én eller 2 sialinsyrer. Derfor ble det også konkludert at N-forbundne sukker av komplekset og/eller hybridtypen var festet til Asn52.

- Denne Asn-52-glykosyleringen, en N-glykosylering, består hovedsakelig av sukker-
15 strukturer av den biantenære komplekse typen ($\geq 75\%$; hovedsakelig 80-90 %) uten kjernefukosylering og sterkt sialidert med opptil 80 % av de komplekstype-antenne-inneholdende N-acetyl-neuraminsyrene. Mindre sukkerstrukturer tilhørte henholdsvis den biantenære hybrid og oligomannosetypen ($\leq 25\%$) (figur 5 eller figur 27). Felles for alle Asn52-glykosyleringsstrukturer var resistensen for kløyving ved N-glykosidase
20 F fra intakte ANTISTOFF A.

Eksempel 7

Asn306-glykosyleringsstruktur av ANTISTOFF A

- Som poengtert ovenfor inneholdt ANTISTOFF A festet til asparagin 306 (Asn306) i Fc-
25 delen av den tunge kjeden (HC) en antistofftype glykosylering bestående av en kompleks biantenær oligosakkaridkjede. Det er godt kjent at antistoffer inneholder forskjellige isoformer av en slik kompleks biantenær oligosakkaridkjede som varierer i graden av terminal galaktosylering, sialyering og i graden av kjernefukosylering. I tillegg er det kjent at graden av mangel på kjernefukosylering i den Fc-lokaliserde
30 sukkerkjeden er viktig for *in vivo*-virkeevne av antistoffer, ettersom det er godt akseptert at graden av kjernefukosylering modulerer effektorfunksjoner av antistoffer.

- For ANTISTOFF A ble større, antistoff-typiske variasjoner (Routier (1997), Glyco-conjugate 14(2), 201-207; Raju (2003), BioProcess International, 44-52) i de Fc-
35 lokaliserte sukkerkjedene festet til Asn306, funnet med hensyn på terminal galaktosylering og kjernefukosylering.

Heterogeniteten i graden av terminal galaktosylering (G0:G1:G2-strukturer) ble bestemt til omkring 35-40 % G0-strukturer, omkring 45 % G1-strukturer og omkring 15-20 % G2-strukturer (for skjematisk demonstrasjon av strukturene se figur 6 eller figur 27).

- 5 Innholdet av Fc-sukkerstrukturer som mangler kjernefukosylering, det vil si som mangler fukoseenheten festet til innerste N-acetyl-glukosaminet av kjernesukkerstrukturen, er sannsynligvis viktig for et antistoff, ettersom nærværet eller fraværet av denne fukoseenheten kan modulere bindingen av antistoffet til Fc-reseptorer eller effektorceller, som derved påvirker aktivitet av disse cellene.

10

For ANTISTOFF A ble det relative innholdet av sukkerkjedeisoformer som mangler kjernefukosylering ved Asn 306, bestemt ved to forskjellige metoder som beskrevet i det følgende:

15 **A) Massespektrometri for fullstendig, glykosylert HC:**

Prøver av ANTISTOFF A ble denaturert og redusert til lett kjede (LC) og glykosylert HC i nærværet av 6 M guanidin-hydroklorid og 250 mM TCEP. De reduserte prøvene ble avsaltet i 2 % maursyre og 40 % acetonitril og benyttet for ESI-MS-analyse i et Q-Tof2 eller LCT-massespektrometerinstrument fra Waters. Fra m/z-spektrene oppnådd

20 ble det relative innholdet av de individuelle oligosakkaridisoformene kalkulert ved topphøyde av glykosylerte HC-er inneholdende de individuelle oligosakkaridisoformene fra valgte enkle m/z-tilstander. For kalkulerings av det relative innholdet av sukkerstrukturer som mangler kjernefukosylering, ble topphøyde av G0-struktur som mangler kjernefukose (G0-Fuc) relatert til summen av G0 + (G0-Fuc).

25

De respektive karbohydratstrukturene ble bestemt i henhold til forskjellene av massene oppnådd for glykosylert HC og for HC, hvis oligosakkaridstrukturer ble fjernet ved inkubering med N-glykosidase F før MS-analyse i kontrolleksperimenter.

30 **B) Kromatografisk analyse av frigjorte oligosakkarider ved HPEAC-PAD:**

Prøver av ANTISTOFF A ble inkubert med N-glykosidase F i natriumfosfatbuffer ved pH 7,2 for å frigjøre oligosakkaridkjedene fra Asn306 (sukkerstrukturene ved Asn52 ble ikke fjernet fra det intakte, ikke-denaturerte antistoffet under forholdene benyttet). De frigjorte sukkerkjedene ble separert fra ANTISTOFF A-proteinet ved sentrifugerings-

35 filtrering og ble analysert på en Carbo Pac PA200-kolonne fra Dionex i et BioLC-system, ved å benytte en natriumacetatgradient ved sterk alkalisk pH (pH, 13). Kolonnen benyttet var i stand til å løse opp ikke-fukosylerte fra fukosylerte oligo-

sakkaridkjeder. Tildeling av de individuelle toppene oppnådd til respektive karbohydratstrukturer, ble gjort ved sammenligning av retensjonstidene med dem fra egnede oligosakkaridstandarter analysert på Carbo Pac PA200-kolonnen og ved å bestemme den molare massen av toppene separert og samlet ved MALDI-massespektrometri. For

5 kalkulering av det relative innholdet av sukkerstrukturer som mangler kjernefukosylering, ble summen av areal-% av alle strukturer som mangler kjernefukose, dannet.

Analysene av henholdsvis flere satser (kombinasjoner av dobbelt- og monoglykosylerte

10 ANTISTOFF A-isoformer) og avrensede ANTISTOFF A-isoformer, viste at innholdet av ikke-fukosylerte Asn306-forbundne oligosakkaridkjeder henholdsvis var i området av ~ 14 % – 27 % (målt ved MS) og 6 % - 26 % (målt ved HPAEC-PAD).

Eksempel 8

15 **Bestemmelse av K_D -verdier for ANTISTOFF A-SAMMENSETNING og isoformer (for eksempel ikke-, mono- eller dobbeltglykosylert antistoff ifølge oppfinnelsen) binder til A β 1-40 og A β 1-42 fibre *in vitro* ved overflate-plasmonresonans (SPR)**

Binding av ANTISTOFF A til fibrillær A β ble målt direkte ved overflate plasmonresonans (SPR) og affinitetene av de molekylære interaksjonene ble bestemt som følger:

20 Biacore2000 og Biacore3000-instrumenter ble benyttet for disse målingene. A β 1-40 og A β 1-42-fibre ble generert *in vitro* ved inkubering av syntetiske peptider ved en konsentrasjon på 200 μ g/ml i 10 mM Na-acetatbuffer (pH 4,0) i tre dager ved 37 °C. Elektronmikroskopisk analyse bekreftet en fibrillær struktur for begge peptider, A β 1-40

25 viser hovedsakelig kortere (< 1 mikron) og A β 1-42 hovedsakelig lengre (> 1 mikron) fibrer. Disse fibre ble antatt å representere aggregerte A β -peptider i human AD-hjerne mer nøyaktig enn dårlig definerte blandinger av amorfe aggregater og ustrukturerte presipitater.

30 Fibrene ble fortynnet 1:10 og direkte koblet til en CM5 som beskrevet i instruksjonsmanualen til produsenten (BIAapplication Handbook, versjon AB, Biacore AB, Uppsala, 1998).

Denne koblingsprosedyren inkluderte et aktiveringstrinn, hvorunder karboksylsyre-

35 gruppene på overflaten ble overført til kjemisk reaktive suksinimidestergrupper ved å kontakte overflaten med en vannholdig blanding av N-hydroksysuccinimid og 1-etyl-1-(3-diaminopropyl)-karbodiimidhydroklorid, og et immobiliseringstrinn, hvorunder den

aktiverte overflaten ble kontaktet med fibrene oppløst i 10 mM acetatbuffer (pH 4,5) ved 200-350 resonansenheter (1 resonansenheter (RU) korresponderer omtrentlig til en overflatelasting av et 1 pikogram/mm²). Den fiberlastede overflaten ble så kontaktet med antistoffløsningene i konsentrasjonsområdet $200 \text{ nM} \geq C \geq 0,15 \text{ nM}$. Typiske tidsavhengige responskurver (= sensogrammer) monitorert under assosiasjonsfasen (under kontakt med buffer) og dissosiasjonsfasen (etter kontakt med buffer) er vist i figur 7.

K_D -verdiene for binding til A β 1-40 og A β 1-42-fibre av ANTISTOFF A-isoformene er gitt i tabellen nedenfor. I korthet blir K_D -verdier kalkulert ved Scatchard-typeanalyse ved å benytte konsentrasjonsavhengige likevektsbindingsresponses. Disse likevektsbindingskonstantene kan bli oppnådd på 2 måter.

På grunn av den veldig sakte assosiasjonsprosessen ved lav antistoffkonsentrasjon ble kontaktintervaller for å nå likevekt veldig lange (figur 7). Ikke desto mindre kan slike kontaktintervaller bli realisert på Biacore-instrumenter og de eksperimentelle likevektsresponsene kan bli utsatt for en Scatchard-analyse.

Likevektsbindingsdata ble også oppnådd ved å ekstrapolere kortere tidsavhengige assosiasjonskurver til uendelighet. Disse teoretisk oppnådde likevektsbindingsnivåene ble så igjen benyttet for bestemmelsen av K_D -verdiene.

Uavhengig fra måten av å bestemme likevektssensorresponses ble krumlinjede Scatchard-plott oppnådd. Fra det krumlinjede Scatchard-plottet ble en høyere (bivalent) og lavere (monovalent) affinitetsinteraksjon derivert for ANTISTOFF A-isoformer derivert fra den andre affinitetsmodningssyklusen. Disse to affinitetene representerer de nedre og øvre K_D -verdiene av området indikert i den følgende tabellen:

		1-40 K _D -verdier av høy affinitet (nM)	1-40 K _D -verdier av lav affinitet (nM)
ANTISTOFF A-SAMMEN- SETNING (blanding av mono- og dobbelglykosylert ANTISTOFF A)	ekstrapolering standard avvik	0,49 0,10	27,25 8,40
	likevekt	0,41	21,00
dobbelglykosylert ANTISTOFF A	ekstrapolering standard avvik	1,43 0,02	18,51 22,33
	likevekt	1,54	29,00
monoglykosylert ANTISTOFF A	ekstrapolering standard avvik	0,25 0,02	7,55 2,06
	likevekt	0,12	11,10
ikke-glykosylert ANTISTOFF A	ekstrapolering standard avvik	0,19 0,03	1,99 0,15
	likevekt	0,42	2,82

Tabellen ovenfor viser K_D-verdier av lavaffinitetskomplekset (monovalent) og høy-
affinitetskomplekset (bivalent) dannet fra interaksjonen av ANTISTOFF A-isoformer
5 og Aβ1-40-fibriller som bestemt ved overflateplasmonresonans. K_D bestemt ved å
benytte ekstrapolerte likevektsresponsen (markert "ekstrapolering") og K_D-verdier
bestemt ved å benytte eksperimentelt bestemte likevektsresponsen (markert
"eksperimentelt") er gitt. De ekstrapolerte verdiene ble bestemt ved minst seks ganger
og et standard avvik er gitt. K_D'ene basert på eksperimentelle og ekstrapolerte
10 likevektssensorresponsen, er like innenfor grensene gitt ved disse standardavvikene.

Eksempel 9

**Epitopkartlegging av ANTISTOFF A-SAMMENSETNING og isoformer (for
eksempel ikke-, mono- eller dobbelglykosylert antistoff ifølge oppfinnelsen) ved
15 pepspot-analyse med dekaeptider**

En epitop (antigenisk determinant) kan være lineær eller konformasjonsmessig. Den her
beskrevne doble epitopsesifisiteten ble definert ved reaktivitet av antistoffet med to
ikke-sekvensielle, lineære peptider.

Epitopkartleggingsmetoder som ble benyttet for å definere spesifikk epitop-
 gjenkjenning, er basert på ELISA-teknologi med heksapeptidkonjugater belagt på
 mikroplater eller på pepspot-teknologi. Den sist nevnte teknologien tillater deteksjonen
 5 og kvantifiseringen av antistoffet ved protokoller som er alminnelige kjent for Western-
 blotting av proteiner til PVDF-membraner.

Benyttede epitopkartleggingsteknologier er designet for å spesifikt detektere lineære
 epitoper, imens de ikke kan bli benyttet for å kartlegge mer rommessig komplekse
 10 epitoper slik som diskontinuerlige eller konformasjonsmessige epitoper. Teknikker
 tilgjengelige for konformasjonsmessig eller diskontinuerlig epitopkartlegging, slik som
 domeneskanning og kombinasjonsmessige peptidmatriser, krever lange peptider opp til
 36 aminosyrer (domener) eller kombinerte peptider som består av 12 aminosyrer.

15 De benyttede teknikkene er derfor betraktet til å være spesifikke for lineære peptider,
 som ekskluderer at konformasjonsmessige epitoper enten diskontinuerlig eller
 diskontinuerlig spredte epitoper er involvert.

I konklusjon viser de foreliggende data at de to regionene innenfor A β -peptidet definert
 20 her, ligner uavhengige lineære epitoper samtidig gjenkjent basert på den unike doble
 epitopspesifisiteten av de undersøkte antistoffene på enkle heksamere eller dekamere
 A β -peptider.

Den følgende aminosyresekvensen omsluttende A β (1-42) ble delt opp i 43 over-
 25 lappende dekaeptider med et rammeskifte på 1 aminosyre. Antallene refererer til de
 essensielle aminosyrene fra A β 1-40-sekvensen som må være til stede i dekaeptidet for
 optimal binding av antistoff.

ISEVKM¹DAEF RHDSGYEVHH QKLVFFAEDV GSNKGAIIGL MVGGVVI⁴²ATV
 30 IV (SEKV.ID. NR: 4). Følgelig representerer DAEF RHDSGYEVHH QKLVFFAEDV
 GSNKGAIIGL MVGGVVIA (SEKV.ID. NR: 3) aminosyrer 1 til 42 av A β 4/ β -A4
 peptid.

De 43 dekaeptidene ble syntetisert med N-terminal acetylering og C-terminal kovalent
 35 festing til et celluloseark ("pepspot") ved en kommersiell leverandør (Jerini BioTools,
 Berlin). Cellulosearket ble inkubert i 2 timer på en vuggende plattform med mono-
 klonalt antistoff (1 μ g/ml) i blokkeringsbuffer (50 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 5 mM

NaEDTA, 0,05 % NP40 (Fluka), 0,25 % gelatin (Sigma), 1 % bovint serumalbumin fraksjon V (Sigma), pH 7,4). Arket ble vasket 3 ganger i 3 min på en vuggende plattform med TBS (10 mM Tris.HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5). Det ble så presset på filterpapir, fuktet med katodebuffer (25 mM Tris base, 40 mM 6-aminoheksansyre, 0,01 % SDS, 20 % metanol) og overført til et halvtørr blottestabel med peptidsiden vendt mot en PVDF-membran (Biorad) av lik størrelse.

Den halvtørre blottestabelen besto av nylig fuktete filterpapir (Whatman nr. 3) noe større enn peptidarket:

- 3 papirer fuktet med katodebuffer
- peptidarket
- et ark av PVDF-membran fuktet med metanol
- 3 papirer fuktet med anodebuffer 1 (30 mM Tris-base, 20 % metanol)
- 3 papirer fuktet med anodebuffer 2 (0,3 mM Tris-base, 20 % metanol)

Overføringen ble utført med en strømtetthet mellom katode og anode på 0,8 mA/cm² i én time som var tilstrekkelig til å eluere antistoffet fullstendig fra cellulosearket og overføre det på PVDF-membranen. PVDF-membranen ble nedsenket i blokkeringsbuffer i 10 min. Geit-antihumant IgG (H+L) merket med fluorokrom IRdye800 (Rockland kode# 609-132-123) ble tilsatt ved 1:10 000 fortynning i Odyssey blokkeringsbuffer (Li-Cor) og videre fortynnet 1:1 med PBS, 0,05 % Tween20. Membranen ble inkubert på en vuggende plattform i 1 time. Den ble vasket 3 x 10 min med TBST (TBS med 0,005 % Tween20). Membranen ble tørket og skannet for 800 nm fluorescens ved å benytte en fluorescensskanner med lang bølgelengde (Odyssey) som vist i figur 8.

Den eksakte bestemmelsen av antistoffreaktive spotter ble oppnådd ved å markere PVDF-membranen med en nål. Epitopene av antistoffet som det dreier seg om, ble definert som den minimale aminosyresekvensen i reaktive peptider. Fluorescensintensiteten ble integrert over hver spot og justert som relativ fluorescensenheter (RFU). For sammenligning ble to musemonoklonale antistoffer (BAP-1 som er ekvivalent til antistoff 6E10 (Kim (1998)) med spesifisitet for det N-terminale domenet, og BAP-44 som er ekvivalent til antistoff 4G8 (Kim (1998)) med spesifisitet for det midtre domenet) analysert på den samme måten, med unntak av å benytte anti-muse Ig istedenfor anti-humant Ig for deteksjon.

Det må bemerkes at affinitetsmodning og omdannelse av de monovalente Fab-fragmentene til fullengde IgG1-antistoffer vanligvis resulterer i noe utvidelse av epitop-gjenkjenningssekvensen som indikert ved pepspot og ELISA-analyser. Dette kan være relatert til rekrutteringen av flere kontaktpunkter i antistoff-antigen-interaksjonsområdet

5 som en konsekvens av affinitetsmodningen eller til en sterkere binding til den minimale epitopen slik at også svake interaksjoner med tilstøtende aminosyrer kan bli detektert. Det sist nevnte kan være tilfellet når A β -deriverte peptider er prøbet med fullengde IgG-antistoffer. Som illustrert i tabellen nedenfor ble gjenkjenningssekvensene av de N-terminale og midtre epitopene utvidet ved opptil 3 aminosyrer når moder-Fab-er og

10 korresponderende fullstendig modne IgG-antistoffer ble sammenlignet. Imidlertid må det huskes at dekaeptidene ble modifisert for kovalent festing ved den C-terminale aminosyren og denne aminosyren kan derfor ikke enkelt være tilgjengelige for full-lengdeantistoffet på grunn av sterisk hindring. Om dette er tilfellet bidrar den siste C-terminale aminosyren ikke signifikant til epitopgjenkjenningssekvensen og en potensiell

15 reduksjon av den minimale gjenkjenningssekvensen ved én aminosyre ved den C-terminale enden må bli betraktet i pepspot-analysen som benyttet i den foreliggende oppfinnelse.

antistoff	Aminosyre- posisjon	Aminosyre- posisjon
dobbeltglykosylert ANTISTOFF A	3-4 (1-10)	18-24 (17-26)
monoglykosylert ANTISTOFF A	4-5 (3-11)	20-26
ikke-glykosylert ANTISTOFF A	3-4	20-24
ANTISTOFF A-SAMMEN- SETNING (blanding av mono- og dobbeltglykosylert ANTISTOFF A- isoformer (1:1))	3-5 (3-11)	19-26
BAP-44 (musemonoklonal)		19-21
BAP-1 (musemonoklonal)	4-6	

20

Tabellen ovenfor er relatert til en pepspot-analyse av binding av fullengde IgG-antistoffer til dekaeptider på et celluloseark. Antallene refererer til aminosyreposisjonen i A β 1-40-sekvensen som må være til stede i dekaeptidet for binding av antistoff. En ytterligere utfyllelse av epitopen er indikert i parenteser for å indikere de flankerende

25 aminosyrene som nødvendig for å oppnå maksimal binding.

Eksempel 10

Depolymeriseringstest som benytter ANTISTOFF A-isoformer (for eksempel ikke-, mono- eller dobbeltglykosylert antistoff ifølge oppfinnelsen) som inducerer frigjøring av biotinyleret A β fra aggregert A β

- 5 Det eksperimentelle oppsettet for å teste potensialet av ANTISTOFF A-isoformer til å inducere dissosiasjon av aggregert A β , var som følger:

Biotinyleret A β 1-40 ble først inkorporert i predannede A β 1-40/A β 1-42-fibre for behandling med ANTISTOFF A-isoformer. Frigjøring av biotinyleret A β ble målt ved å
10 benytte en test som benytter et streptavidin-POD-konjugat som beskrevet nedenfor.

Syntetisk A β når inkubert i vannholdig buffer over flere dager, aggregerer spontant og danner fibrillære strukturer som er lignende dem sett i amyloide avsetninger i hjernen av Alzheimers sykdomspasienter. Den følgende *in vitro*-testen er egnet for å måle inkorporering og frigjøring av biotinyleret A β i predannede A β -aggregater for å analysere det
15 A β -nøytraliserende potensialet av anti-A β -antistoffer og andre A β -bindende proteiner slik som albumin (Bohrmann (1999) J. Biol. Chem. 274, 15990-15995). ANTISTOFF A-isoformer induerte depolymerisering av aggregert A β som målt ved frigjøringen av inkorporert biotinyleret A β 1-40.

20

Eksperimentell prosedyre:

- NUNC Maxisorb mikrotiterplater (MTP) ble belagt med en 1:1-blanding av A β 1-40 og A β 1-42 (2 μ M hver, 100 μ l per brønn) ved 37 °C i tre dager. Under disse forholdene ble sterkt aggregert, fibrillært A β adsorbert og immobilisert på overflaten av brønnen.
25 Beleggløsningsløsningen ble så fjernet og platene ble tørket ved romtemperatur i 2-4 timer. De tørkede platene kan bli lagret ved -20 °C. For inkorporering av biotinyleret A β ble de belagte platene inkubert med 200 μ l/brønn 20 nM biotinyleret A β 1-40 i TBS inneholdende 0,05 % NaN₃ ved 37 °C over natt. Etter vasking av platene med 3 x 300 μ l/brønn T-PBS, ble antistoffer seriefortynnet i TBS inneholdende 0,05 % NaN₃
30 tilsatt og inkubert ved 37 °C i 3 timer. Platen ble vasket og analysert for nærværet av biotinyleret A β 1-40. Etter vasking 3 x med 300 μ l T-PBS ble et streptavidin-POD-konjugat (Roche Molecular Biochemicals), fortynnet 1:1000 i T-PBS inneholdende 1 % BSA, tilsatt (100 μ l/brønn) og inkubert ved romtemperatur i 2 timer. Brønnene ble vasket 3 x med T-PBS, og 100 μ l/brønn av en nylig preparert tetrametylbenzidin(TMB)-
35 løsning ble tilsatt. [Preparering av TMB-løsningen: 10 ml 30 mM sitronsyre pH 4,1 (justert med KOH) + 0,5 ml TMB (12 mg TMB i 1 ml aceton + 9 ml metanol) + 0,01 ml

35 % H₂O₂]. Reaksjonen ble stoppet ved tilsetning av 100 µl/brønn 1 N H₂SO₄ og absorbans ble lest ved 450 nm i en mikrotiterplateleser.

Som dokument i vedlagt figur 9, induserte ANTISTOFF A-isoformer dissosiasjon av aggregert Aβ som målt ved frigjøringen av inkorporert biotinyllert Aβ1-40. ANTI-STOFF A-isoformer og det musemonoklonale antistoffet BAP-1 var lignende aktive (figur 9), imens BAP-2-, BAP-17- og 4G8-antistoffer var mindre effektive i frigjøring av biotinyllert Aβ fra størsteparten av immobilisert Aβ (data ikke vist). BAP-1 kan tydelig bli differensiert fra de glykosylerte ANTISTOFF A-isoformene ved dets reaktivitet med celleoverflate-fullengde APP. Antistoffer slik som BAP-1 med slike egenskaper, er ikke nyttige for terapeutiske anvendelser ettersom potensielle autoimmunologiske reaksjoner kan bli indusert. Det er interessant å bemerke at BAP-2, til tross for dets spesifisitet for aminosyreresidu 4-6 som ble eksponert i aggregert Aβ, har en tydelig lavere aktivitet i denne testen som indikerer at ikke alle N-terminale, spesifikke antistoffer *a priori* er like effektive i frigjøring av Aβ fra predannede aggregater. Den relativt lave effektiviteten av BAP-17 (C-terminal ende spesifikk) og 4G8 (aminosyreresiduer 16-24 spesifikk) i denne testen, var på grunn av den kryptiske naturen av disse to epitopene i aggregert Aβ. BSA ved konsentrasjonene benyttet her, hadde ingen effekt på aggregert Aβ.

20

Den monoglykosylerte isoformen utøvde høyere kapasitet sammenlignet med den dobbeltglykosylerte isoformen til å depolymerisere Aβ-peptid *in vitro* som kan være relevant også *in vivo*.

25 Eksempel 11

ANTISTOFF A-SAMMENSETNING og omfattende isoformer (mono- og dobbeltglykosylert antistoff ifølge oppfinnelsen) fanger løselig Aβ fra human ryggmargsvæske (CSF)

30 Kapasiteten til å fange løselig Aβ fra humane CSF-prøver ble bestemt ved immunpresipitering (IP) og semi-kvantitativ Western blott(WB)-analyse.

Eksperimentell prosedyre:

Immunpresipitering av humane CSF-prøver ble gjort i henhold til det følgende skjema:

35	70 ul	human CSF
	20 ul	Inkubasjonsbuffer (50 mM Tris, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,05 % NP-40, 1 % BSA, 0,25 % gelatin, 0,25 % tørrmelk, pH 7,2

10 ul ANTISTOFF A-isoformer fra stamløsninger (1000-10 ug/ml)
100 ul

Løsningen ble oppbevart i én time ved 4 °C. 40 µl protein G Sepharose-kuler
5 (Amersham Biosciences #17-0618-01; vasket med PBS, 50 % helling) ble tilsatt og
inkubert i 2 timer ved 4 °C på rotator. Etter sentrifugering ved 500 g i 3 min ved 4 °C
ble supernatanten fjernet og 200 µl PBS ble tilsatt til kulene, overført til Millipore-filter
rør 0,45 µm (Millipore #UFC30HVN) og sentrifugert ved 500 g i 3 min ved 4 °C.
Ytterligere 200 µl PBS ble tilsatt til kuler, vortexet og sentrifugert ved 2000 g i 3 min
10 ved 4 °C. 45 µl prøvebuffer 1 x NuPage med DTT ble tilsatt og holdt i 10 min ved
70 °C, etterfulgt ved sentrifugering ved 2000 g i 3 min ved 4°C.

For SDS-PAGE ble 18 µl protein G-eluat tilført til NuPage gel 10 % Bis-Tris-gel
sammen med Aβ₁₋₄₂ (Bachem) som intern standard direkte i prøvebuffer og kjørt i MES
15 buffersystem.

Gelen ble overført til Hybond C ekstra membran (halvtørt system Novex) tørr membran
3' ved romtemperatur. Membranen ble overført til på forhånd varmet PBS og varmet i
mikrobølgeovn i 3 min ved 600 W. Blokkering ble gjort i 1 time med SuperBlock-
20 løsning (Pierce) og ytterligere blokkering i 1 time med 5 % melkepulver (Bio Rad) i T-
PBS (0,1 % Tween20 i PBS).

Inkubering ble gjort over natt med anti Aβ-antistoff W02-antistoff (1:1500-1:2000 fra
The Genetics, Inc. Zürich, Sveits) ved 4 °C på en rotator, etterfulgt ved vasking 3 x med
25 T-PBS i 5 min og inkubering i 2 timer ved RT med anti-muse IgG-HRP (Dako) 1:5000 i
T-PBS. Ytterligere vasking 3 x med T-PBS i 5 min ble etterfulgt ved inkubering med
LumiLight Plus i 5 min ved romtemperatur. Western blott ble digitalisert og analysert
ved densometri med et Alpha Innotech Digital Camera System.

30 Som dokumentert i figur 10 bandt ANTISTOFF A-SAMMENSETNING (omfattende
mono- og dobbeltglykosylerte ANTISTOFF A-isoformer) effektivt til løselig Aβ i
human CSF som demonstrert ved immunpresipitering og Western-blotting
eksperimenter. I denne testen var særlig monoglykosylert ANTISTOFF A mer effektivt
i å fange løselig Aβ enn dobbeltglykosylert ANTISTOFF A (figur 10).

Eksempel 12***In vitro*-immunfarging av humane, amyloide plakk ved ANTISTOFF A-SAMMENSETNING og isoformer (for eksempel ikke-, mono- eller dobbeltglykosylert antistoff ifølge oppfinnelsen)**

- 5 Glykosylert ANTISTOFF A-isoformer ble testet for evnen til å farge genuine, humane β -amyloide plakk oppnådd fra hjernesnitt av pasienter med kraftig Alzheimers sykdom ved immunohistokjemianalyse ved å benytte indirekte immunfluorescens. Spesifikk og sensitiv farging av genuine, humane β -amyloide plakk ble demonstrert.
- 10 Cryostat-snitt av ikke-fiksert vev fra temporal cortex oppnådd ved obduksjon fra en pasient som var positivt diagnostisert for Alzheimers sykdom, ble merket ved indirekte immunfluorescens. En suksessiv totrinns inkubering ble benyttet for å detektere bundne ANTISTOFF A-isoformer, som ble vist ved affinitetsrenset geite-anti-human (GAH) IgG (H+L) konjugert til Cy3 (# 109-165-003, lot 49353, Jackson Immuno Research).
- 15 Kontroller inkluderte ikke-relaterte, humane IgG1-antistoffer (Sigma) og det sekundære antistoffet alene som alle ga negative resultater.

Alle typer av β -amyloide plakk ble sensitivt og spesifikt detektert og konsekvent vist ved en ANTISTOFF A-konsentrasjon på 10 ng/ml (figur 11).

20

Spesifikk og sensitiv farging av genuine, humane amyloid- β -plakk er demonstrert for de glykosylerte ANTISTOFF A-isoformene ved en konsentrasjon opp til 1 μ g/ml.

- Ved en konsentrasjon på 10 μ g/ml ble en bakgrunnsfarging observert, mest tydelig med den ikke-glykosylerte ANTISTOFF A-isoformen. Den ikke-glykosylerte isoformen utøves betraktelig uspesifikk klebrighet observert ved overflaten av glass-slides og nesten alle vevskomponentene som ble eksponert etter snitteprosessen *in vitro*. Dette viste seg å være på grunn av uspesifikk binding som involverer ioniske og/eller hydrofobe interaksjoner.

30

Eksempel 13***In vivo* β -amyloid plakkdekorasjon ved ANTISTOFF A i en musmodell for Alzheimers sykdom**

- Glykosylerte ANTISTOFF A-isoformer ble testet i en enkel dosestudie i PS2APP dobbelttransgene mus (Richards (2003), J. Neuroscience, 23, 8989-9003) for deres evne til å immundekorere β -amyloide plakk *in vivo*. De glykosylerte ANTISTOFF A-
- 35

isoformene ble administrert ved en dose på 1 mg/mus og etter 3 dager ble dyr perfusert med fosfatbufret salt og deres hjerner frosset på tørris og preparert for cryosnitning.

5 Begge glykosylerte isoformer viste forbedret og sterkt effektiv hjernepenetring *in vivo* (som sammenlignet med den ikke-glykosylerte formen). Effektiv hjernepenetring og spesifikk binding til amyloid- β -plakk ble demonstrert i PS2APP-mus, en musemodell for AD-relatert amyloidose.

10 Nærværet av antistoffene bundet til β -amyloide plakk ble bestemt ved å benytte ikke-fikserte cryostatsnitt enten ved enkelmerket, indirekte immunofluorescens med geit-anti-human IgG (H+L) konjugert til Cy3 (#109-165-003, Jackson Immuno Research) vist i figur 12 eller fulgt ved motfarging med BAP-2-Alexa488 immunkonjugat for å visualisere posisjonen og distribusjonen av alle β -amyloide plakktyper til stede i vevet.

15 En immunfluorescensfargingsmetode ble benyttet for å detektere bundet ANTISTOFF A. Etter adhesjon til på forhånd avkjølte glass-slides ble snitt hydratisert i PBS og behandlet med 100 % aceton på forhånd avkjølt ved -20 °C i 2 min. Vasking med PBS ble gjort to ganger i 2 min. Blokkering av spesifikke bindingssteder ble gjort enten med PBS inneholdende 1 % BSA eller ved sekvensiell inkubering i Ultra V blokk
20 (LabVision) i 5 min, etterfulgt ved en PBS-vasking og inkubering i pulverblokkløsning (BioGenex) med 10 % normalt saueserum i 20 min. Etter vasking med PBS med 10 % normalt saueserum ble slides inkubert med affinitetsrenset geit-anti-humant (GAH) IgG (H+L) konjugert til Cy3 (# 109-165-003, parti 49353, Jackson Immuno Research) ved en konsentrasjon på 15 μ g/ml i 1 time ved romtemperatur. En motfarging for amyloide
25 plakk var ved inkubering med BAP-2, et musemonoklonalt antistoff mot Ab konjugert til Alexa 488 ved en konsentrasjon på 0,5 μ g/ml i 1 time ved romtemperatur. Auto-fluorescens av lipofuscin ble undertrykt ved inkubering i 4 mM CuSO₄ i 50 mM ammoniumacetat. Etter rensing av slides i bidestillert vann og vasking med 2 x 500 μ l/slide PBS, ble slides innpakket i fluorescensmonteringsmedium (S3023 Dako).

30

Avbildning ble gjort ved konfokal lasermikroskopi og avbildningsprosessering for kvantitativ analyse av ko-lokaliseringer ved IMARIS og COLOCALIZATION programvare (Bitplane, Sveits).

35 Etter en enkel dose på 1 mg per mus ble glykosylerte ANTISTOFF A-isoformer funnet til å penetrere over blod-hjernebarrieren og til å effektivt immundekorere/binde alle β -amyloide plakk etter tre dager *in vivo*. Representative bilder er vist i figur 12. Dette er i

tydelig motsetning til den ikke-glykosylerte formen som ikke er detekterbar ved amyloide plakk.

Eksempel 14

5 **Undersøkelse av binding av ANTISTOFF A-isoformer til amyloid forløperprotein (APP) uttrykt på overflaten av HEK293-celler:**

Metoden av flow cytometri er godt kjent i fagfeltet. Relative enheter av fluorescens (for eksempel FL1-H) målt ved flow cytometri indikerte celleoverflatebinding av det respektive antistoffet. Et fluorescensskifte på APP-transfektet HEK293 sammenlignet med utransfektet HEK293-celler indikerte den uønskede reaksjonen med celleoverflate APP. Som et eksempel viste antistoffer BAP-1 og BAP-2 mot det N-terminale domenet et signifikant skifte av FL-1-signal i HEK293/APP (figur 13, tykk linje, panel på høyre side) sammenlignet med utransfektet HEK293-celler (figur 13, stiplet linje, panel på høyre side). På lignende måte viste BAP-44-antistoff (spesifikt for den midtre A-beta-epitopen) et lignende størrelsesskifte. I motsetning viste alle antistoff-A-isoformer (figur 13 panel på venstre side) (spesifikk for N-terminale og midtre A-beta-epitoper) ingen signifikant skifte i fluorescens. De utransfektet HEK293-cellene hadde en høyere basal fluorescens enn de APP-transfektet cellene på grunn av forskjellig cellestørrelse og overflateegenskaper. Et FACScan-instrument ble benyttet i kombinasjon med Cellquest Pro programvarepakken (begge Becton Dickinson). ANTISTOFF A-isoformer var fri for reaktivitet mot celleoverflate APP (figur 13).

Eksempel 15

25 **Morfometrisk analyse av A β -plakkavsetting i en musmodell for Alzheimers sykdom**

Muligheten av ANTISTOFF A-SAMMENSETNING eller ANTISTOFF A-isoformene til å redusere amyloidose *in vivo* ble studert i ulike hjemregioner (thalamus, neocortex, hippocampus og subiculum) ved å benytte kvantitativ computerassistert bildeanalyse av hjerner av PS2APP-mus som mottok en fem måneders behandling med ANTISTOFF A-SAMMENSETNING eller ANTISTOFF A-isoformer.

Derfor ble PS2APP-transgene hannmus injisert intravenøst med ANTISTOFF A-SAMMENSETNING eller ANTISTOFF A-isoformer og leveringsmiddel. Syttifem 5-6-måneders gamle PS2APP-mus ble delt inn i fem grupper (A-E), bestående av 15 mus hver. Begynnende på dag 0 mottok hver mus enten 0,1 ml av leveringsmiddel (0 mg/kg) eller ANTISTOFF A-preparater (20 mg/kg) ved bolus intravenøs injeksjon via

halevene. Grupper A, B, C, D og E av PS2APP-mus mottok henholdsvis leveringsmiddel (histidinbufret salt), ANTISTOFF A-SAMMENSETNING som omfatter monoglykosylert ANTISTOFF A og dobbeltglykosylert ANTISTOFF A og er fri for ikke-glykosylert ANTISTOFF A som definert ovenfor, dobbeltglykosylert
 5 ANTISTOFF A, monoglykosylert ANTISTOFF A og ikke-glykosylert ANTISTOFF A.

Immuntoleranse mot de administrerte, humane anti-A β -antistoffene ble induisert ved å injisere anti-CD-4-antistoff (hybridomklon GK 1.5 som kommersielt tilgjengelige fra ATCC). Monitorering av antimedikamentantistoffer indikerte at antistoffbehandlede
 10 mus bare utviklet en moderat immunrespons etter mer enn 16 ukers behandling og at de detekterbare antistoffene er enten av lav affinitet eller er produsert bare i lave mengder (data ikke vist).

Etter 5 måneders behandling ble mus avlivet. Ikke-fikserte hjerner ble snittet sagittalt, inkluderende Thalamus, hippocampal formasjon og kortikale områder. Fra hver hjerne-
 15 hemisfære ble 50 snitt preparert som følger: Startende ved lateralt nivå ~ 1.92 , ble 5 etterfølgende serier av $5 \times 10 \mu\text{m}$ og $5 \times 20 \mu\text{m}$ snitt oppnådd. Det var ingen åpning mellom etterfølgende snitt, resulterende i en bruk av totalvev på $750 \mu\text{m}$. Snittseriene ender derfor omtrentlig på lateralt nivå 1.20 (Paxinos og Franklin, 2003). For kvantitativ
 20 morfometrisk analyse ble hvert 10. snitt benyttet.

Snitt ble farget for amyloide avsetninger med den dobbeltglykosylerte ANTISTOFF A-isoformen ved en konsentrasjon på $5 \mu\text{g/ml}$. Farging mot A β ved å benytte et muse-monoklonalt antistoff (BAP-2) konjugert til Alexa-488 fluorofor ved $5 \mu\text{g/ml}$ viste
 25 sammenlignbare resultater selv om med signifikant intracellulær og bakgrunnsfarging av neuroner som interfererte med avbildningsprosesseringsrutinen beskrevet nedenfor. For deteksjon ble et affinitetsrenset geit-antihumant (GAH) IgG (H+L) konjugert til Cy3 (# 109-165-003, lot 49353, Jackson Immuno Research) ved en konsentrasjon på $15 \mu\text{g/ml}$ i 1 time ved romtemperatur, benyttet. Etter vasking med $2 \times 500 \mu\text{l}$ PBS/slide
 30 ble slides innpakket i fluorescensmonteringsmedium (S3023, Dako).

Bilder ble ervervet til å benytte en GenePix Personal 4100A-mikromatriseskanner (Axon Instruments, nå Molecular Devices, CA, USA). Amyloid- β -plakklast og antall ble målt ved å benytte to parametere, det vil si prosentandel av arealet dekket ved
 35 amyloid- β -plakk og antall amyloid- β -plakk ved å benytte en forventningsrettet morfometrisk metode ved hjelp av computerassistert avbildningsanalyse. Kvantifisering av plakklast og antall ble gjort med MCID M7 Elite-programvare (Imaging Research Inc.,

St. Catherines/Ontario, Canada). De skannede bildene ble forsterket ved et detalj-ekstraktorfilter, etterfulgt ved et målbrytningsfilter. Det resulterende bildet ble så binarisert ved å justere terskelen i henhold til fargingsintensiteten. Artefakter, blodårer og randeffekter ble identifisert på det opprinnelige referansebildet og så fjernet fra det binariserte bildet. Regioner av interesse ble uthevet på referansebildet. For endelig kvantifisering ble arealet av disse regionene og arealet okkupert ved plakk, så vel som plakkantallet så målt i det binariserte bildet. Enkle piksler ble ignorert. Kalkuleringer ble gjort med alminnelig regnearkprogramvare (Microsoft Excel, Redmond/WA, USA). Størrelsen av plakk ble separert i 11 grupper varierende fra <100 til $>1000 \mu\text{m}^2$. Statistisk evaluering ble gjort ved å benytte en tohalet, heteroskedastisk t-test.

For sammenligning og statistisk evaluering ble grunnlinjen av amyloidose (amyloid- β -plakk patologi) bestemt ved studiestart med en kohort (15 dyr) av ikke-behandlede 6 måneders gamle PS2APP-mus. Resultater er avbildet i figurer 15 til 18 med nivåer av signifikans (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$).

Amyloid plakkreduksjon var mest uttalt i thalamus-regionen (figur 15). Den gjennomsnittlige reduksjonen av total amyloid- β -plakkoverflate ble bestemt for de antistoff-behandlede gruppene: 64 % for ANTISTOFF A-SAMMENSETNING, 70 % for dobbeltglykosylert ANTISTOFF A, 81 % for monoglykosylert ANTISTOFF A og 44 % for ikke-glykosylert ANTISTOFF A. Den gjennomsnittlige reduksjonen i totalt amyloid- β plakkantall ble funnet til å være 70 % for ANTISTOFF A-SAMMENSETNING, 78 % for dobbeltglykosylert ANTISTOFF A, 82 % for monoglykosylert ANTISTOFF A og 36 % for ikke-glykosylert ANTISTOFF A. Bemerk at signifikans for ikke-glykosylert ANTISTOFF A var lav og observerte variasjoner var betraktelige.

Amyloid plakkreduksjon i den neokortikale regionen sammen med corpus callosum er avbildet i figur 16. Den gjennomsnittlige reduksjonen av total amyloid- β plakkoverflate ble bestemt for de antistoffbehandlede gruppene: 19 % for ANTISTOFF A-SAMMENSETNING, 27 % for dobbeltglykosylert ANTISTOFF A, 30 % for mono-glykosylert ANTISTOFF A og 10 % for ikke-glykosylert ANTISTOFF A. Den gjennomsnittlige reduksjonen i totalt amyloid- β plakkantall ble funnet til å være 40 % for ANTISTOFF A-SAMMENSETNING, 46 % for dobbeltglykosylert ANTISTOFF A, 42 % for monoglykosylert ANTISTOFF A og 11 % for ikke-glykosylert ANTISTOFF A.

Amyloid plakkreduksjon i den fullstendige hippocampus-regionen er avbildet i figur 17. Den gjennomsnittlige reduksjonen for total amyloid- β plakkoverflate ble bestemt for de

antistoffbehandlede gruppene: 12 % for ANTISTOFF A-SAMMENSETNING, 24 % for dobbeltglykosylert ANTISTOFF A, 24 % for monoglykosylert ANTISTOFF A og 6 % for ikke-glykosylert ANTISTOFF A. Den gjennomsnittlige reduksjonen i totalt amyloid- β plakkantall ble funnet til å være 36 % for ANTISTOFF A-SAMMEN-

5 SETNING, 46 % for dobbeltglykosylert ANTISTOFF A, 37 % for mono-glykosylert ANTISTOFF A og 3 % for ikke-glykosylert ANTISTOFF A.

Amyloid plakkreduksjon i subiculum, en sterkt mottakelig region for amyloidose, er vist i figur 18. Den gjennomsnittlige reduksjonen av total amyloid- β plakkoverflate ble

10 bestemt for de antistoffbehandlede gruppene: 2 % for ANTISTOFF A-SAMMENSETNING, 12 % for dobbeltglykosylert ANTISTOFF A, 5 % for monoglykosylert ANTISTOFF A og 1 % for ikke-glykosylert ANTISTOFF A. Den gjennomsnittlige reduksjonen i totalt amyloid- β plakkantall ble funnet til å være 22 % for ANTISTOFF A-SAMMENSETNING, 36 % for dobbeltglykosylert ANTISTOFF A, 13 % for mono-

15 glykosylert ANTISTOFF A og 1 % for ikke-glykosylert ANTISTOFF A. ANTISTOFF A-SAMMENSETNING og de viktigste N-glykosyleringsisoformene (dobbeltglykosylert ANTISTOFF A og monoglykosylert ANTISTOFF A) viste en sammenlignbar effektivitet til å redusere amyloid- β plakkbelastning og plakkantall. Reduksjon av plakkbelastning var mest uttalt og statistisk signifikant i regioner med lav eller

20 moderat amyloidose.

Totalt ble reduksjon av amyloid- β plakkantall funnet statistisk signifikant etter behandling med ANTISTOFF A-SAMMENSETNING og begge omfattende Asn52-glykosylerte isoformer av ANTISTOFF A i alle målte hjerneregioner. I motsetning til

25 dette ble bare en mindre effekt på amyloid- β plakkantall funnet i thalamus og ingen signifikante effekter på amyloid- β plakkantall i de andre undersøkte hjerneregionene ble funnet etter behandling med den ikke-glykosylerte isoformen av ANTISTOFF A, som er ekskludert fra ANTISTOFF A-SAMMENSETNING etter rensingen som detaljert beskrevet i oppfinnelsen.

30 Vi undersøkte også potens av plakkfjerning i relasjon til plakkstørrelsen. Generelt ble effektivitet av testede, humane anti-A β -antistoffer funnet mest uttalt for fjerningen av mindre amyloid- β -plakk. Dette ble observert i alle hjerneregioner (figurer 15 C, 16 C, 17 C og 18 C). I motsetning var det bare en minimal eller ikke-signifikant trend

35 observert for den ikke-glykosylerte isoformen av ANTISTOFF A.

Komparativ analyse av ANTISTOFF A og de viktigste Asn52-glykosylerings-isoformene demonstrerte en sammenlignbar kapasitet til å redusere plakkbelastning, mens den ikke-glykosylerte isoformen har ingen signifikant effekt på plakkreduksjon.

5 Eksempel 16

Farmakokinetikk av *in vivo*-binding av ANTISTOFF A-SAMMENSETNING til amyloid- β -plakk

To doseringshyppigheter ble sammenlignet for å undersøke bindingskinetikken av ANTISTOFF A-SAMMENSETNING som omfatter monoglykosylert ANTISTOFF A
10 og dobbeltglykosylert ANTISTOFF A og er fri for ikke-glykosylert ANTISTOFF A som definert ovenfor.

Derfor ble PS2APP-transgene hannmus initiert intravenøst med ANTISTOFF A-SAMMENSETNING via halevene enten 4 ganger eller to ganger ukentlige intervaller
15 ved 0,05, 0,1 og 0,3 mg/kg eller 3 ganger ved månedlige intervall med 0,075, 0,15 og 0,45 mg/kg. For sammenligning ble 0,1 mg/kg administrert én og to ganger ved to ganger ukentlige intervaller og 0,15 mg/kg to ganger ved månedlig intervall. Etter administrasjon ble alle mus avlivet to uker etter siste dosering. Ikke-fiksert PS2APP-hjernevev ble preparert for sagittal snitting mellom lateral ~ 1,92 og 1,2 mm i henhold til
20 Paxinos og Franklin, inkluderende Thalamus, hippocampusformasjon og kortikale områder. Hjerner ble snittet ved 40 μ m ved å benytte en cryostat.

En immunfluorescens *eks vivo*-immunfargingsmetode ble benyttet for å detektere bundne ANTISTOFF A-SAMMENSETNING-antistoffer. Derfor ble hjerner snittet og
25 inkubert med deteksjonsantistoffet, et affinitetsrenset geit-anti-human (GAH) IgG (H+L) konjugert til Cy3 (# 109-165-003, lot 49353, Jackson Immuno Research) ved en konsentrasjon på 15 μ g/ml i 1 time ved romtemperatur. En motfarging av amyloid- β -plakk ble gjort ved inkubering med BAP-2, et musemonoklonalt antistoff mot A β konjugert til Alexa488 fluorofor ved en konsentrasjon på 0,5 μ g/ml i 1 time ved rom-
30 temperatur.

Bilder ble tatt i occipital cortex nær cerebellum ved å benytte et Leica TCS SP2 AOBS-konfokal laserskanningsmikroskop som beskrevet ovenfor. Computerassistert avbildningsprosessering ble utført ved å benytte IMARIS programvaren (Bitplane, Sveits).
35 Bilder av plakk ble først selektert ved å benytte beskjeringsfunksjonen av programvaren for de lavere dosene med unntak av de to høyeste dosene ved 0,3 og 0,45 mg/kg som krevde en forskjellig forsterkningsinnstilling for lineær signalregistrering.

SURPASS-funksjonen ble benyttet for å selektare positive "voxels" etter terskeloperasjon (T) som avlesning for bundet GAH-Cy3 ved stedet av amyloid- β -plakk. Terskelinnsettinger var 19 og 12 for henholdsvis lavere og høyere dosegrupper. Som en kontroll for amyloid- β -plakkspesifisitet ble bilder av GAH-Cy3-fargingene sammen-

5 lignet etter dobbeltmerking med bilder av plakk farget ved musemonoklonalt BAP2 konjugert til Alexa488 og registrert i en annen kanal.

Deskriptive statistikker for kvantitativ beskrivelse av alle bilder ble gjort med IMARIS MeasurementPro programvaremodul. Gjennomsnittlig voxel fluorescensintensitets-

10 (MVI)-verdier ble bestemt fra selekterte amyloid- β -plakk i lavdosegruppene eller totalt signal fra bilder i høydosegruppene. Grunnlinje MVI (B) er på grunn av instrumentell støy, vevsspredningssignal og autofluorescens av lipofuscin. For bakgrunnskorreksjon ble B bestemt ved å måle den gjennomsnittlige signalintensiteten ved områder atskilt fra amyloid- β -plakk og deretter trukket fra MVI av alle målte bilder ($MVI - B = S$). Signal-

15 intensitets(S)-verdier som ligner gjennomsnittlige intensiteter på plakk ble oppnådd fra 3 til 4 bilder fra hvert hjernesnitt per mus og dosegruppe. For sammenligning ble signalintensiteter normalisert til en referanseprobe oppnådd fra en tidligere studie. Som referanse benyttet vi PS2APP musehjernesnitt etter en enkel doseadministrasjon på 0,25 mg/kg. Målingsendepunkt var én uke etter dosering.

20

Alle målte intensitetsverdier ble normalisert til den gjennomsnittlige intensiteten av amyloid- β -plakk oppnådd etter en enkel doseadministrasjon av ANTISTOFF A-SAMMENSETNING ved 0,25 mg/kg som ble målt én uke etter dosering (se følgende tabell). De normaliserte verdiene for middelverdi av relativ fluorescensintensitet av

25 immunpositive amyloid- β -plakk ble oppnådd ved CLSM etter immunfarging og måling av signalintensiteter gjennomsnittsberegnet fra 3 dyr per dosegruppe. Plakk uten detekterbar ANTISTOFF A-SAMMENSETNING derivert ANTISTOFF A ble observert bare i de lavere dosegruppene, mest trolig på grunn av begrenset eller delvis okkupasjon av ANTISTOFF A-SAMMENSETNING derivert ANTISTOFF A ved

30 plakkoverflaten, som kanskje kan ha blitt tatt under snitteprosessen. Derfor ble bare immunpositive plakk inkludert for den komparative analysen.

Middelverdi av relativ fluorescensintensitet per dosegruppe etter multipel intravenøs (BOLUS) administrasjon av ANTISTOFF A-SAMMENSETNING i PS2APP-transgene

35 mus er vist i den følgende tabellen:

100

Dose - intervall/injeksjoner	Normalisert gjennomsnittlig middelverdi av fluorescens- intensitet av immunpositiv ANTISTOFF A- SAMMENSETNING amyloid- β -plakk		Prosentandel av ANTISTOFF A- SAMMENSETNING immunnegative amyloid- β -plakk
	%	SD	%
0,25 mg - enkel ¹	100	6	0
0,05 mg - to ganger ukentlig/4x	53	2	58
0,075 mg -månedlig/3x	57	6	39
0,15 mg -månedlig/2x	106	6	19
0,1 mg - to ganger ukentlig/1x	59	8	45
0,1 mg - to ganger ukentlig/2x	83	26	21
0,1 mg - to ganger ukentlig/4x	88	12	2
0,15 mg - månedlig/3x	93	19	1
0,3 mg - to ganger ukentlig/4x	148	24	0
0,45 mg - månedlig/3x	184	20	0

¹Eksperimentelle verdier representerer intensitetsverdier normalisert til verdien oppnådd fra en enkel dose på 0,25 mg/kg etter 1 uke.

- 5 Figur 19 viser binding av ANTISTOFF A-SAMMENSETNING i relasjon til antallet av suksessive to ganger ukentlige doser ved 0,1 mg/kg. Etter to tilføringer viste middelverdi av intensitet seg å ha økt, selv om omfanget av immunfarging varierer betraktelig og når derfor ikke signifikans. Etter 4 injeksjoner er amyloid- β -plakk immunfarget mer
- 10 ganger ukentlig tilføring tydelig en tendens av økt plakkbinding som er korrelert med antallet av tilføringer.

- Figur 20 viser binding av ANTISTOFF A-SAMMENSETNING i relasjon til antallet av suksessive månedlige doser ved 0,15 mg/kg. Interessant er sammenlignbare nivåer
- 15 oppnådd etter 2 og 3 tilføringer. Dette var ikke nødvendigvis forventet og kan indikere

initiering av tidlige effekter som bidrar til tidsavhengige forskjeller i fjerningsmekanisme, slik som forsinket mikroglia celleaktivering.

5 Bindingskraften av ANTISTOFF A-SAMMENSETNING i relasjon til administrert dose er vist i figur 21 og 22. To ganger ukentlige doser ved 0,05, 0,1 og 0,3 mg/kg (figur 21) og månedlige doser på 0,075, 0,15 og 0,45 mg/kg (figur 22) viste tydelig et doseforhold. Det er også tydelig at responsen ikke er lineær og ytterligere faktorer slik som en tidsmessig forsinket aktivering av mikroglia-celler, kan bidra til den observerte ikke-lineariteten.

10

Det kan på denne måten bli konkludert at ANTISTOFF A-SAMMENSETNINGS-binding til muse-A β -plakk er doserelatert med indikasjoner for at multiple doser er akkumulerende.

15 **Eksempel 17**

Analyse av antigenavhengig, cellulær fagocytose

For å bestemme den ANTISTOFF A-SAMMENSETNINGS-medierte, fagocytiske effekten ble genuine A β -plakk fra AD-hjernesiver preinkubert med forskjellige konsentrasjoner av ANTISTOFF A-SAMMENSETNING som omfatter monoglykosylert
20 ANTISTOFF A og dobbeltglykosylert ANTISTOFF A og er fri for ikke-glykosylert ANTISTOFF A som definert ovenfor og eksponert for levende, humane, primære monocytyter.

Ikke-fikserte, humane AD-hjernevevssnitt fra den occipitale cortexregionen ble
25 preparert fra et kraftig AD-tilfelle (Braak-trinn IV). Før tilsetting ble levende celledsnitt rehydrert med PBS i 5 min. ANTISTOFF A-SAMMENSETNINGS-antistoffer ble tilført ved inkubering ved definerte konsentrasjoner i PBS i 1 time. Etter vasking med PBS ble levende celler tilsatt. Prestimulerte, humane, primære monocytyter ble benyttet ved 0,8 og 1,5 $\times 10^6$ /ml i RPMI 1640 (Gibco # 61870-044) medium med 1 % anti-
30 biotikaløsning fra en stamløsning inneholdende 10 000 U/ml penicillin og 10 000 mg/ml streptomycin (Gibco # 15140-122) og inkubert ved 37 °C med 5 % karbondioksid i 2 til 4 dager. Metoder for prepareringen av prestimulerte, humane, primære monocytyter er godt kjent i fagfeltet, for eksempel ved anvendelse av stimulerende faktorer, slik som makrofagkolonistimulerende faktor (M-CSF).

35

Etter inkubering ble dyrkningsmedium forsiktig fjernet og snitt konserveret ved kjemisk fiksering med 2 % formaldehyd i PBS i 10 min. Farging av gjenværende A β -plakk-

belastning ble gjort ved inkubering med BAP-2, et musemonoklonalt antistoff mot A β konjugert til Alexa488 fluorofor (Molecular Probes: A-20181, monoklonalt antistoff merkesett) ved en konsentrasjon på 10 mg/ml i 1 time ved romtemperatur.

- 5 Kvantifisering av fjerning av plakk ble bestemt ved måling av immunfluorescensen av gjenværende fargede A β -plakk. Bilder ble tatt på et Leica TCS SP2 AOBS konfokal laserskanningsmikroskop. Et optisk lag ble registrert ved eksitasjonsbølgelengde på 488 nm ved en hullsetting på 4 Airy ved å benytte et HCX PL FL 20x/0,40 korreksjonsobjektiv med unntak i ett eksperiment hvor et HCPL Fluotar 10x/0,30 objektiv med en
- 10 hullsetting på 3 ble benyttet i stedet. Instrumentinnstillinger ble holdt konstante for alle avbildninger for å tillate en kvantitativ relasjonssammenligning. Spesifikt ble laserstyrke, forsterkning og forskyvning justert for å tillate for signalintensitetsmonitorering innenfor det dynamiske området. For hver ANTISTOFF A-SAMMENSETNINGS-konsentrasjon ble grå materieregioner registrert ved
- 15 sammenlignbare posisjoner fra etterfølgende snitt for å minimalisere fluktuasjoner som mulig kommer fra anatomiske forskjeller i plakkbelastning. Potensiell kompetitiv binding av ANTISTOFF A-SAMMENSETNING og deteksjonsantistoffet BAP-2, ble målt i fraværet av celler ved alle ANTISTOFF A-SAMMENSETNINGS-konsentrasjoner. Et ikke-relatert, humant IgG1(Serotec, PHP010)-antistoff ble benyttet
- 20 som en ytterligere kontroll. Bildeanalyse ble utført ved å benytte IMARIS programvaren (Bitplane, Sveits). Isooverflaten av BAP-2-positive piksler som representerer objekter av BAP-2 bundet til plakkene, ble skapt ved intensitetsterskelberegning. Overflatearealet og totale fluorescensintensitetsverdier ble kalkulert ved å benytte "isooverflatefunksjonen" av SurpassPro programvaremodulen.
- 25 Data ble uttrykt som gjennomsnitt beregnet av fargingsarealet og totale fargingsintensitetsverdier oppnådd fra 5 grå materieregioner av ett hjernesnitt. Signalgrunnlinjen består av den instrumentelle støyen og vevsspredningssignal ble funnet neglisjerbart og ble derfor ikke trukket fra det totale intensitetssignalet.
- 30 Den kvalitative effekten av ANTISTOFF A-SAMMENSETNING ble visualisert ved en reduksjon i A β -plakkfarging som indikerer økt fagocytose av A β -plakk fra humane AD-hjernesnitt som vist i figur 23. Immun histokjemi viste en reduksjon i fargbare A β -plakk tydelig synlig etter en preinkubering med 100 ng/ml ANTISTOFF A-SAMMENSETNING allerede etter 40 timer. Effekten er veldig uttalt og ved ANTISTOFF A-
- 35 SAMMENSETNINGS-konsentrasjoner på 1 og 5 mg/ml. A β -plakk er hovedsakelig og økende fjernet ved cellulær fagocytose hvor bare få større A β -plakk er igjen ved

5 mg/ml. En kvantitativ måling basert på de immunreaktive signalene uttrykt som arealet og tetthet av det samme eksperimentet, er vist i figur 24.

Alternativt ble den ANTISTOFF A-SAMMENSETNINGS-medierte fagocytiske effekten bestemt ved å benytte A β -konjugerte, fluorescerende polystyrenkuler. Derfor ble fluorescerende kuler (3 μ m, Fluoresbrite karboksyl YG, Polysciences Inc.) koblet med A β . I korthet ble kuler vasket 2 x ved suspensjon og sentrifugering i koblingsbuffer (50 mM MES-buffer, pH 5,2, 1 % DMSO). Pelletten (omtrentlig 10 μ l) ble suspendert i 200 μ l koblingsbuffer og aktivert ved tilsetning av 20 μ l av en 20 % løsning av EDC (etyldiaminopropylkarbodiimid, Pierce) i koblingsbuffer. Øyeblikkelig tilsetning av 20 μ g A β (1-40) eller A β (1-42) (i 0,1 % ammoniumhydroksid, Bachem) startet koblingsreaksjonen. Etter én natts inkubering ble kulene vasket med 3 x 0,5 ml 10 mM Tris.HCl pH 8,0 og 3 x 0,5 ml lagringsbuffer (10 mM Tris.HCl pH 8,0, 0,05 % BSA, 0,05 % NaN₃). 1 % suspensjon ble lagret ved 4 °C inntil anvendelse. Som en negativ kontroll ble Fluoresbrite karboksyl NYO (rød fluorescens) kuler koblet med alle-D aminosyre A β (1-40) (i 0,1 % ammoniumhydroksid, Bachem).

Murine monocytter/makrofager (cellelinje P388D1) ble dyrket i C24 transparente vevs-dyrkningsklynger eller C96 sorte mikroplater til omtrentlig 50 % konfluens. Dyrknings-mediet var IMEM med 5 % FBS, glutamin og antibiotika. For å blokkere uspesifikke oppsamlingsreseptorer ble 10 ml fucoidan (Fluka, 10 mg/ml i vann) tilsatt til 200 ml dyrkningsvolum og inkubert i 2 timer. ANTISTOFF A-SAMMENSETNING ble tilsatt i seriefortynninger og preinkubert i 30 min. Fluorescerende A β -kulesuspensjon (20 μ l) ble tilsatt og inkubert i 3 timer for å tillate fagocytose. De adherente cellene ble vasket kraftig 1 x med iskald EDTA og 2 x med PBS for å fjerne fasthengte agglutiner fra celleoverflaten. Resten av kulene ble enten monitorert ved visuell inspeksjon ved en Zeiss Axiovert 405 eller for kvantifisering ved å benytte et mikropate fluorimeter (Fluoroscans, LabSystems) med 444 nm (eksitasjon) og 485 nm (emisjon) filterinnstillinger.

Den kvalitative effekten av ANTISTOFF A-SAMMENSETNING på fagocytosen av syntetiske A β -aggregater koblet til fluorescerende kuler ved P388D1-celler er vist i figur 25. Den kvantitative bestemmelsen av doseresponsen av ANTISTOFF A-SAMMENSETNING er vist i figur 26. To uavhengige eksperimenter viste et område fra 30 til 200 ng/ml for EC₅₀ og 10 til 60 ng/ml for MEC. Den observerte variabiliteten er sannsynligvis forårsaket ved forskjeller av inkubasjonsstokiometrien, det vil si forhold av kuler til celler. Den observerte nedgangen av kulefagocytose over en

konsentrasjon > 200 ng/ml er på grunn av monovalent antistoffinteraksjon med begrenset antigen.

Det kan derfor bli konkludert at ANTISTOFF A-SAMMENSETNING effektivt
5 induserer fagocytose av A β -plakk fra AD-hjernevevssnitt på en doserelatert måte.

P a t e n t k r a v

1.

Sammensetning omfattende et antistoffmolekyl som er i stand til å spesifikt gjenkjenne
 5 β -A4-peptidet/A β 4, nevnte antistoffmolekyl er et monoglykosylert antistoffmolekyl
 eller et dobbeltglykosylert antistoffmolekyl eller der nevnte sammensetning omfatter en
 blanding av nevnte monoglykosylerte antistoffmolekyl og nevnte dobbeltglykosylerte
 antistoffmolekyl,

- 10 - der nevnte monoglykosylerte antistoffmolekyl omfatter en glykosylert asparagin
 (Asn) i posisjon 52 av SEKV.ID. NR.: 2 eller SEKV.ID. NR.: 6 i den variable
 regionen av den tunge kjeden (V_H) og der nevnte dobbeltglykosylerte
 antistoffmolekyl omfatter en glykosylert asparagin (Asn) i posisjon 52 av
 SEKV.ID. NR.: 2 eller SEKV.ID. NR.: 6 i den variable regionen av den tunge
 15 kjeden (V_H) til begge antigenbindende seter,
- der nevnte antistoffmolekyl omfatter en CDR1 i den variable tunge kjeden som
 vist i SEKV.ID. NR.: 10, en CDR2 i den variable tunge kjeden som vist i
 SEKV.ID. NR.: 12, en CDR3 i den variable tunge kjeden som vist i SEKV.ID.
 NR.: 14, en CDR1 i den variable lette kjeden som vist i SEKV.ID. NR.: 16, en
 20 CDR2 i den variable lette kjeden som vist i SEKV.ID. NR.: 18 og en CDR3 i
 den variable lette kjeden som vist i SEKV.ID. NR.: 20,

og hvorved nevnte sammensetning omfatter mindre enn 5 % av et antistoffmolekyl
 k a r a k t e r i s e r t v e d at ingen antigenbindende seter av
 25 nevnte antistoffmolekyl omfatter en glykosylert asparagin (Asn) i den variable regionen
 av den tunge kjeden (V_H).

2.

Sammensetning ifølge krav 1, hvorved nevnte asparagin (Asn) i den variable regionen
 30 av den tunge kjeden (V_H) er i CDR2-regionen.

3.

Sammensetning ifølge krav 1 eller 2, hvorved det nevnte β -A4-peptidet/A β 4 har
 følgende sekvens:

35 DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
 (SEKV.ID. NR.: 3) eller en del på minst 15 aminosyrer av nevnte sekvens.

4.

Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, der nevnte antistoffmolekyl omfatter en tung kjede (V_H) kodet ved:

- 5 (a) et nukleinsyremolekyl omfattende nukleotidsekvensen vist i SEKV.ID. NR.: 1

10 CAGGTGGAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCG
GCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCT
ATGCGATGAGCTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGG
GTGAGCGCTATTAATGCTTCTGGTACTCGTACTTATTATGCTGATTCT
GTTAAGGGTCGTTTTACCATTTCACGTGATAATTCGAAAAACACCCTG
TATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTA
TTGCGCGCGTGGTAAGGGTAATACTCATAAGCCTTATGGTTATGTTTCG
TTATTTTGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA
15 (SEKV.ID. NR.: 1);

- (b) et nukleinsyremolekyl som koder for et polypeptid som har aminosyresekvensen som vist i SEKV.ID. NR.: 2

20 QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV
SAINASGTRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RGKGNTHKPYGYVRYFDVWGQGLVTVSS (SEKV.ID. NR.: 2);

- 25 (c) et nukleinsyremolekyl som hybridiserer til nukleinsyremolekylet av (a) eller (b)
og som koder for et polypeptid som er i stand til å binde til β -A4-peptidet/A β 4
som vist i den følgende aminosyresekvensen

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
(SEKV.ID. NR.: 3)

30

eller er i stand til å binde til et fragment derav som omfatter minst 15
aminosyrer;

- 35 (d) et nukleinsyremolekyl som hybridiserer til nukleinsyremolekylet av (a) eller (b)
og som koder for et polypeptid som er i stand til å binde til minst to regioner av
 β -A4-peptidet/A β 4 som vist i den følgende aminosyresekvensen

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
(SEKV.ID. NR.: 3)

5 eller til minst to regioner av et fragment av SEKV.ID. NR.: 3 som omfatter minst 15 aminosyrer hvorved nevnte to regioner på β -A4-peptidet/A β 4 eller nevnte fragment derav omfatter aminosyrene på posisjon 3 til 6 og på posisjon 18 til 26;

10 eller

- (e) en nukleinsyresekvens som er degenerert til en nukleinsyresekvens som definert i hvilken som helst av (a) til (d).

5.

15 Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4, der nevnte antistoffmolekyl omfatter en tung kjede valgt fra gruppen bestående av:

- (a) et tungkjede-polypeptid kodet ved et nukleinsyremolekyl som vist i SEKV.ID. NR.: 5, 23 eller 25;

20

- (b) et tungkjede-polypeptid som har aminosyresekvensen som vist i SEKV.ID. NR.: 6 eller 26;

- 25 (c) et tungkjede-polypeptid kodet ved et nukleinsyremolekyl som hybridiserer til nukleinsyremolekylet definert i (a) og som koder for et polypeptid som er i stand til å binde til β -A4-peptidet/A β 4 som vist i den følgende aminosyresekvensen

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
(SEKV.ID. NR.: 3)

30

eller et fragment derav som omfatter minst 15 aminosyrer; eller

- 35 (d) et tungkjede-polypeptid kodet ved et nukleinsyremolekyl som hybridiserer til nukleinsyremolekylet definert i (a) og som koder for et polypeptid som er i stand til å binde til minst to regioner på β -A4-peptidet/A β 4 som vist i den følgende aminosyresekvensen

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
(SEKV.ID. NR.: 3)

5 eller til minst to regioner av et fragment av SEKV.ID. NR.: 3 som omfatter
minst 15 aminosyrer,
hvorved nevnte to regioner på β -A4-peptidet/A β 4 eller nevnte fragment derav
omfatter aminosyrene på posisjon 3 til 6 og på posisjon 18 til 26.

- 6.
- 10 Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5, hvorved nevnte
glykosylering på Asn i V_H-regionen er valgt fra gruppen bestående av
- (a) en sukkerstruktur av den biantenære, komplekse typen;
 - (b) en sukkerstruktur av den biantenære, hybride typen;
 - 15 (c) en sukkerstruktur av den biantenære oligomannosetypen; og
 - (d) en sukker-biantenær struktur av en hvilken som helst av strukturene som
tilveiebrakt i figur 5 eller figur 27.

- 7.
- 20 Sammensetning ifølge krav 6, hvorved nevnte sukkerstruktur ikke omfatter en
kjernefucosylering.

- 8.
- 25 Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, hvorved nevnte
antistoffmolekyl er rekombinant produsert.

- 9.
- 30 Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 8, hvorved nevnte
antistoffmolekyl er produsert i en CHO-celle.

- 10.
- Sammensetning ifølge krav 9, hvorved nevnte CHO-celle er CHO K1 eller CHO K1
SV.

- 35 11.
- Fremgangsmåte for fremstillingen av et antistoffmolekyl som omfattet i
sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10, omfattende trinnene

- (a) rekombinant uttrykke et heterologt nukleinsyremolekyl kodende for et antistoffmolekyl som definert i et hvilket som helst av kravene 1 til 7 i en mammalsk dyrket celle;
- 5 (b) rense nevnte rekombinant uttrykte antistoffmolekyl ved en fremgangsmåte omfattende trinnene av
- (b1) protein A-kolonnerensing;
- 10 (b2) ionebytterkolonnerensing; og
- (b3) størrelsesekklusjonskolonnerensing.
- 12.
- Fremgangsmåte ifølge krav 11, der nevnte ionebytterkolonnerensing omfatter en
- 15 kationbytterkromatografi.
- 13.
- Fremgangsmåte ifølge krav 11 eller 12, som ytterligere omfatter et ytterligere trinn (c) en analytisk kromatografi og/eller et ytterligere konsentrasjonstrinn.
- 20 14.
- Sammensetning omfattende et antistoffmolekyl fremstilt ved fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 11 til 13.
- 25 15.
- Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10 eller 14, som er en diagnostisk eller en farmasøytisk sammensetning.
- 16.
- 30 Anvendelse av sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10, 14 eller 15 for fremstillingen av et medikament for forebyggingen og/eller behandlingen av en sykdom assosiert med amyloidogenese og/eller amyloid plakkdannelse, valgt fra gruppen bestående av demens, Alzheimers sykdom, motorisk neuropati, Downs syndrom, Creutzfeldt Jakob sykdom, arvelig cerebral blødning med amyloidose
- 35 hollandsk type, demens assosiert med Lewy legemedannelse, Parkinsons sykdom, HIV-relatert demens, ALS eller neuronale lidelser relatert til aldring.

17.

Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10, 14 eller 15 fremstilt for anvendelse som et medikament for forebyggingen og/eller behandlingen av en sykdom assosiert med amyloidogenese og/eller amyloid plakkdannelse, valgt fra gruppen
5 bestående av demens, Alzheimers sykdom, motorisk neuropati, Downs syndrom, Creutzfeldt Jakob sykdom, arvelig cerebral blødning med amyloidose hollandsk type, demens assosiert med Lewy legemedannelse, Parkinsons sykdom, HIV-relatert demens, ALS eller neuronale lidelser relatert til aldring.

10 18.

Anvendelse av sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10, 14 eller 15 for fremstillingen av et diagnostisk sett for deteksjonen av en sykdom assosiert med amyloidogenese og/eller amyloid plakkdannelse, valgt fra gruppen bestående av demens, Alzheimers sykdom, motorisk neuropati, Downs syndrom, Creutzfeldt Jakob
15 sykdom, arvelig cerebral blødning med amyloidose hollandsk type, demens assosiert med Lewy legemedannelse, Parkinsons sykdom, HIV-relatert demens, ALS eller neuronale lidelser relatert til aldring.

19.

20 Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10, 14 eller 15 fremstilt for anvendelse som et diagnostisk sett for deteksjonen av en sykdom assosiert med amyloidogenese og/eller amyloid plakkdannelse, valgt fra gruppen bestående av demens, Alzheimers sykdom, motorisk neuropati, Downs syndrom, Creutzfeldt Jakob sykdom, arvelig cerebral blødning med amyloidose hollandsk type, demens assosiert
25 med Lewy legemedannelse, Parkinsons sykdom, HIV-relatert demens, ALS eller neuronale lidelser relatert til aldring.

20.

Anvendelse av sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10, 14 eller
30 15 for fremstillingen av et medikament for nedbrytningen av β -amyloide plakk ved en sykdom assosiert med amyloidogenese og/eller amyloid plakkdannelse, valgt fra gruppen bestående av demens, Alzheimers sykdom, motorisk neuropati, Downs syndrom, Creutzfeldt Jakob sykdom, arvelig cerebral blødning med amyloidose hollandsk type, demens assosiert med Lewy legemedannelse, Parkinsons sykdom, HIV-
35 relatert demens, ALS eller neuronale lidelser relatert til aldring.

21.
Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10, 14 eller 15 fremstilt for anvendelse som et medikament for nedbrytningen av β -amyloide plakk ved en sykdom assosiert med amyloidogenese og/eller amyloid plakkdannelse, valgt fra gruppen
- 5 bestående av demens, Alzheimers sykdom, motorisk neuropati, Downs syndrom, Creutzfeldt Jakob sykdom, arvelig cerebral blodning med amyloidose hollandsk type, demens assosiert med Lewy legemedannelse, Parkinsons sykdom, HIV-relatert demens, ALS eller neuronale lidelser relatert til aldring.
- 10 22.
Anvendelse av sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10, 14 eller 15 for fremstillingen av en farmasøytisk sammensetning for passiv immunisering mot β -amyloid plakkdannelse.
- 15 23.
Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10, 14 eller 15 fremstilt for anvendelse som en farmasøytisk sammensetning for passiv immunisering mot β -amyloid plakkdannelse.
- 20 24.
Anvendelse av sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10, 14 eller 15 for fremstillingen av en farmasøytisk sammensetning for den preventive behandlingen mot en sykdom assosiert med amyloidogenese og/eller amyloid plakkdannelse, valgt fra gruppen bestående av demens, Alzheimers sykdom, motorisk
- 25 neuropati, Downs syndrom, Creutzfeldt Jakob sykdom, arvelig cerebral blodning med amyloidose hollandsk type, demens assosiert med Lewy legemedannelse, Parkinsons sykdom, HIV-relatert demens, ALS eller neuronale lidelser relatert til aldring.
25.
30 Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10, 14 eller 15 fremstilt for anvendelse som en farmasøytisk sammensetning for den preventive behandlingen mot en sykdom assosiert med amyloidogenese og/eller amyloid plakkdannelse, valgt fra gruppen bestående av demens, Alzheimers sykdom, motorisk neuropati, Downs syndrom, Creutzfeldt Jakob sykdom, arvelig cerebral blodning med amyloidose
- 35 hollandsk type, demens assosiert med Lewy legemedannelse, Parkinsons sykdom, HIV-relatert demens, ALS eller neuronale lidelser relatert til aldring.

26.

Anvendelse ifølge krav 24 eller sammensetning ifølge krav 25, hvor preeksisterende plakk eller aggregeringsintermediater av amyloid- β skal bli redusert.

5 27.

Anvendelse av sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10, 14 eller 15 for fremstilling av et diagnostisk sett for diagnostikk av en sykdom assosiert med amyloidogenese og/eller amyloid plakkdannelse hos en pasient eller for diagnostikk av en pasients mottakelighet for utviklingen av en sykdom assosiert med amyloidogenese
10 og/eller amyloid plakkdannelse, nevnte sykdom er valgt fra gruppen bestående av demens, Alzheimers sykdom, motorisk neuropati, Downs syndrom, Creutzfeldt Jakob sykdom, arvelig cerebral blødning med amyloidose hollandsk type, demens assosiert med Lewy legemedannelse, Parkinsons sykdom, HIV-relatert demens, ALS eller neuronale lidelser relatert til aldring.

15

28.

Sammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10, 14 eller 15 fremstilt for anvendelse som et diagnostisk sett for diagnostikk av en sykdom assosiert med amyloidogenese og/eller amyloid plakkdannelse hos en pasient eller for diagnostikk av
20 en pasients mottakelighet for utviklingen av en sykdom assosiert med amyloidogenese og/eller amyloid plakkdannelse, nevnte sykdom er valgt fra gruppen bestående av demens, Alzheimers sykdom, motorisk neuropati, Downs syndrom, Creutzfeldt Jakob sykdom, arvelig cerebral blødning med amyloidose hollandsk type, demens assosiert med Lewy legemedannelse, Parkinsons sykdom, HIV-relatert demens, ALS eller
25 neuronale lidelser relatert til aldring.

29.

Sett omfattende sammensetningen ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10, 14, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 26 eller 28, eller et antistoffmolekyl som fremstilt ved
30 fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 11 til 13.

1/22

SEQUENCE LISTING

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Antibody glycosylation in the variable region

<130> K1314 PCT S3

<150> EP 05 02 7090.9

<151> 2005-12-12

<160> 32

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 378

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> VH-region of ANTIBODY A

<400> 1

```

caggtggaat tgggtgaaag cggcgggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg      60
agctgcgcgg cctccggatt tacctttagc agctatgcga tgagctgggt gcgccaagcc      120
cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcgc attaatgctt ctggtactcg tacttattat      180
gctgattctg ttaagggctg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaa caccctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtaag      300
ggtaatactc ataagcctta tggttatgtt cgttattttg atgtttgggg ccaaggcacc      360
ctggtgacgg ttagctca                                     378

```

<210> 2

<211> 126

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> VH-region of ANTIBODY A

<400> 2

```

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

```

```

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

```

```

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

```

2/22

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

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

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

Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr
 100 105 110

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 3
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> A-beta

<400> 3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 35 40

<210> 4
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> A-beta comprising peptide sequence

<400> 4

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

Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser
 20 25 30

3/22

Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40 45

Thr Val Ile Val
50

<210>	5
<211>	1391
<212>	DNA
<213>	artificial sequence

```
<220>
<223> heavy chain with Fc-region of ANTIBODY A
```

<400>	5						
caggtggaat	tggtggaaag	cggcggcggc	ctggtgcaac	cgggcggcag	cctgcgtctg		60
agctgcgcgg	cctccggatt	tacctttagc	agctatgcga	tgagctgggt	gcgccaagcc		120
cctgggaagg	gtctcgagtg	ggtgagcgct	attaatgctt	ctggtactcg	tacttattat		180
gctgattctg	ttaagggtcg	ttttaccatt	tcacgtgata	attcgaaaaa	cacctgtat		240
ctgcaaata	acagcctgcg	tgcggaagat	acggccgtgt	attattgcgc	gcgtggtaag		300
ggtaatactc	ataagcctta	tggttatgtt	cgttattttg	atgtttgggg	ccaaggcacc		360
ctggtgacgg	ttagctcagc	ctccaccaag	ggtccatcgg	tcttccccct	ggcacccctc		420
tccaagagca	cctctggggg	cacagcggcc	ctgggctgcc	tggtcaggga	ctacttcccc		480
gaaccgggtg	cgggtgctgt	gaactcaggc	gccctgacca	gcggcggtgc	caccttcccg		540
gctgtcctac	agtcctcagg	actctactcc	ctcagcagcg	tggtgaccgt	gccctccagc		600
agcttgggca	cccagacctt	catctgcaac	gtgaatcaca	agcccagcaa	caccaaggtg		660
gacaagaaag	ttgagcccag	atatcgtgcg	atatcgtgca	atcttgtgac	aaaactcaca		720
catgcccacc	gtgcccagca	cctgaactcc	tggggggacc	gtcagtcctc	ctcttcccc		780
caaaacccaa	ggacaccctc	atgatctccc	ggaccctga	ggtcacatgc	gtggtggtgg		840
acgtgagcca	cgaagaccct	gagggtcaagt	tcaactggta	cgtggacggc	gtggaggtgc		900
ataatgccaa	gacaaagccg	cgggaggagc	agtacaacag	cacgtaccgg	gtggtcagcg		960
tcctcaccgt	cctgcaccag	gactggctga	atggcaagga	gtacaagtgc	aaggctctcca		1020
acaaagccct	cccagccccc	atcgagaaaa	ccatctccaa	agccaaaggg	cagccccgag		1080
aaccacaggt	gtacaccctg	cccccatccc	gggatgagct	gaccaagaac	caggtcagcc		1140
tgacctgcct	ggtcaaaggc	ttctatccca	gcgacatcgc	cgtggagtgg	gagagcaatg		1200
ggcagccgga	gaacaactac	aagaccacgc	ctcccgtgct	ggactccgac	ggctccttct		1260

4/22

tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat 1320
gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc 1380
cgggtaaatg a 1391

<210> 6
<211> 456
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> heavy chain with Fc-region of ANTIBODY A

<400> 6

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr
100 105 110

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130 135 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

5/22

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 195 200 205

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

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415

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

7/22

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ile Tyr Asn Met Pro
 85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> CDR1 heavy chain

8/22

<400> 9
 ggatttacct ttagcagcta tgcgatgagc 30

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> CDR1 heavy chain

<400> 10

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

<210> 11
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> CDR2 heavy chain

<400> 11
 gctattaatg cttctggtac tcgtacttat tatgctgatt ctgttaaggg t 51

<210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> CDR2 heavy chain

<400> 12

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

Gly

<210> 13
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> CDR3 heavy chain

<400> 13
 ggtaagggta atactcataa gccttatggt tatgttcggt attttgatgt t 51

9/22

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> CDR3 heavy chain

<400> 14

Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr Phe Asp
 1 5 10 15

Val

<210> 15
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> CDR1 light chain

<400> 15
 agagcgagcc agagcgtgag cagcagctat ctggcg

36

<210> 16
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> CDR1 light chain

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> CDR2 light chain

<400> 17
 ggcgcgagca gccgtgcaac t

21

<210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

10/22

<220>

<223> CDR2 light chain

<400> 18

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> CDR3 light chain

<400> 19

cttcagattt ataatatgcc tatt

24

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> CDR3 light chain

<400> 20

Leu Gln Ile Tyr Asn Met Pro Ile
 1 5

<210> 21

<211> 648

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> light chain of ANTIBODY A

<400> 21

gatatcgtgc tgaccagag ccggcgacc ctgagcctgt ctccgggcga acgtgcgacc 60

ctgagctgca gagcgagcca gagcgtgagc agcagctatc tggcgtggta ccagcagaaa 120

ccagggtcaag caccgcgtct attaatattat ggcgcgagca gccgtgcaac tgggggtccc 180

gcgcgtttta gcggctcttg atccggcacg gattttaccc tgaccattag cagcctggaa 240

cctgaagact ttgcgactta ttattgcctt cagatttata atatgcctat tacctttggc 300

cagggtacga aagttgaaat taaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttccc 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtactcc 480

11/22

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
 ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggttag 648

<210> 22
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> light chain of ANTIBODY A

<400> 22

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

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ile Tyr Asn Met Pro
 85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

12/22

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 23
 <211> 3984
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> alternative sequence encoding heavy chain with Fc-region of
 ANTIBODY A

<400> 23
 atggagtttg ggctgagctg gggttttcctc gttgctcttt taagaggtga ttcattggaga 60
 aatagagaga ctgagtgtga gtgaacatga gtgagaaaaa ctggatttgt gtggcatttt 120
 ctgataacgg tgtccttctg tttgcagggtg tccagtgtca ggtggagctg gtggagtctg 180
 ggggaggcct ggtccagcct ggggggtccc tgagactctc ctgtgcagcg tctggattca 240
 ccttcagtag ctatgccatg agctgggtcc gccaggctcc aggcaggggg ctcgagtggg 300
 tgtccgccat aaacgccagc ggtaccgcga cctactatgc agactccgtg aagggcgat 360
 tcaccatctc cagagacaat tccaagaaca cgctgtatct gcaaatgaac agcctgagag 420
 ccgaggacac ggctgtgtat tactgtgcga gaggcaaggg gaacacccac aagccctacg 480
 gctacgtacg ctactttgac gtgtggggcc aaggaaccct ggtcaccgtc tcctcagggtg 540
 agtcttcaca acctctctcc tgcggccgca gcttgaagtc tgaggcagaa tcttgtccag 600
 ggtctatcgg actcttgtga gaattagggg ctgacagttg atggtgacaa tttcagggtc 660
 agtgactgtc tgggtttctc gaggtgagac tggaatatag gtcaccttga agactaaaga 720
 ggggtccagg ggcttttctg cacaggcagg gaacagaatg tggaacaatg acttgaatgg 780
 ttgattcttg tgtgacacca agaattggca taatgtctga gttgcccag ggtgatctta 840
 gctagactct ggggtttttg tcgggtacag aggaaaaacc cactattgtg attactatgc 900
 tatggactac tggggtaag gaacctcagt caccgtctcc tcaggtaaga atggcctctc 960
 caggctctta tttttaacct ttgttatgga gttttctgag cattgcagac taatcttgga 1020
 tatttgcctt gagggagccg gctgagagaa gttgggaaat aaatctgtct agggatctca 1080

13/22

gagccttttag gacagattat ctccacatct ttgaaaaact aagaatctgt gtgatgggtgt	1140
tggtggagtc cctggatgat gggatagga ctttggaggc tcatttgagg gagatgctaa	1200
aacaatccta tggctggagg gatagttggg gctgtagttg gagattttca gtttttagaa	1260
tgaagtatta gctgcaatac ttcaaggacc acctctgtga caaccatttt atacagtatc	1320
caggcatagg gacaaaaagt ggagtggggc actttcttta gatttgtgag gaatgttcca	1380
cactagattg tttaaaactt catttgtttg aaggagctgt cttagtgatt gagtcaaggg	1440
agaaaggcat ctagcctcgg tctcaaaagg gtagttgctg tctagagagg tctggtggag	1500
cctgcaaaag tccagctttc aaaggaacac agaagtatgt gtatggaata ttagaagatg	1560
ttgcttttac tottaagttg gtccctagga aaaatagtta aatactgtga ctttaaaatg	1620
tgagaggggt ttcaagtact catTTTTTTT aatgtccaaa atttttgtca atcaatttga	1680
ggtcttgttt gtgtagaact gacattactt aaagtTTTaa cgaggaatgg gagtgaggct	1740
ctctcatacc ctattcagaa ctgactttta acaataataa attaagttta aaatatTTTT	1800
aaatgaattg agcaatgttg agttgagtca agatggccga tcagaaccgg aacacctgca	1860
gcagctggca ggaagcaggt catgtggcaa ggctatTTtg ggaagggaaa ataaaaccac	1920
taggtaaact tgtagctgtg gtttgaagaa gtggTTTTga aacactctgt ccagccccac	1980
caaaccgaaa gtccaggctg agcaaaacac cacctgggta atttgcattt ctaaaataag	2040
ttgaggattc agccgaaact ggagaggtcc tctTTTaaact tattgagttc aacctTTTaa	2100
TTTTagcttg agtagttcta gtttcccaa acttaagttt atcgacttct aaaatgtatt	2160
tagaattcga gctcgggtaca gctttctggg gcaggccagg cctgaccttg gctttggggc	2220
agggaggggg ctaaggtgag gcaggtggcg ccagcaggtg cacaccaat gcccatgagc	2280
ccagacactg gacgtgaac ctgcgggaca gttaagaacc caggggcctc tgcgcctggg	2340
cccagctctg tccacaccg cggtcacatg gcaccacctc tcttgagcc tccaccaagg	2400
gcccatcggc cttccccctg gcacctcct ccaagagcac ctctgggggc acagcggccc	2460
tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg aactcaggcg	2520
ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtccctcagga ctctactccc	2580
tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac atctgcaacg	2640
tgaatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tggtgagagg ccagcacagg	2700
gagggagggg gtctgctgga agccaggctc agcgtcctg cctggacgca tcccgctat	2760
gcagccccag tccagggcag caaggcaggc cccgtctgcc tcttcacccg gaggctctgc	2820
ccgccccact catgctcagg gagagggtct tctggctttt tccagggctc tgggcaggca	2880

14/22

```

caggctaggt gccctaacc caggccctgc acacaaaggg gcaggtgctg ggctcagacc 2940
tgccaagagc catatccggg aggaccctgc cctgacctg agcccccccc aaaggccaaa 3000
ctctccactc cctcagctcg gacaccttct ctctccag attccagtaa ctcccaatct 3060
tctctctgca gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccaggtaa 3120
gccagcccag gctcgcctt ccagctcaag gcgggacagg tgccctagag tagcctgcat 3180
ccagggacag gcccagccg ggtgctgaca cgtccacctc catctcttcc tcagcacctg 3240
aactcctggg gggaccgtca gtcttctctt tccccccaaa acccaaggac accctcatga 3300
tctcccgac cctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg 3360
tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg 3420
aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact 3480
ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg 3540
agaaaaccat ctccaaagcc aaagggtgga cccgtggggg gcgagggcca catggacaga 3600
ggccggctcg gccaccctc tgccctgaga gtgaccgtg taccaacctc tgtccctaca 3660
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 3720
aaccaggtca gctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctggag 3780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccg tctggactcc 3840
gacggctcct tcttctctc cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 3900
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 3960
ctctccctgt ccccgggcaa atga 3984

```

```

<210> 24
<211> 3202
<212> DNA
<213> artificial sequence

```

```

<220>
<223> alternative sequence encoding light chain of ANTIBODY A

```

```

<400> 24
atggacatga gggctctcgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctgttt cccaggtaag 60
gatggagaac actagcagtt tactcagccc aggggtgctca gtactgcttt actattcagg 120
gaaattctct tacaacatga ttaattgtgt ggacatttgt ttttatgttt ccaatctcag 180
gcgccagatg tgatatcgtg ttgacgcagt ctccagccac cctgtctttg tctccagggg 240
aaagagccac cctctcctgc cgggccagtc agagtgttag cagcagctac ttagcctggt 300
accagcagaa acctggccag gcgccaggc tcctcatcta tggcgcatcc agcagggcca 360

```

15/22

ctggcgtgcc agccagggttc agtggcagtg ggtctgggac agacttcact ctcaccatca	420
gcagcctgga gcctgaagat ttcgcgacct attactgtct gcagatttac aacatgccta	480
tcacgttcgg ccaagggacc aaggtggaaa tcaaacgtga gtagaattta aactttgcgg	540
ccgcctagac gtttaagtgg gagatttgga ggggatgagg aatgaaggaa cttcaggata	600
gaaaagggct gaagtcaagt tcagctccta aaatggatgt gggagcaaac tttgaagata	660
aactgaatga ccagaggat gaaacagcgc agatcaaaga ggggcctgga gctctgagaa	720
gagaaggaga ctcacccgtg ttgagtttcc acaagtactg tcttgagttt tgcaataaaa	780
gtgggatagc agagttgagt gagccgtagg ctgagttctc tcttttgtct cctaagtttt	840
tatgactaca aaaatcagta gtatgtcctg aaataatcat taagctgttt gaaagtatga	900
ctgcttgcca tgtagatacc atgtcttgct gaatgatcag aagagggtgtg actcttatcc	960
taaaatttgt caaaaatgt caaatgaga gactctgtag gaacgagtc cttgacagaca	1020
gctcaagggg tttttttcct ttgtctcatt tctacatgaa agtaaatgtg aaatgatctt	1080
ttttattata agagtagaaa tacagttggg tttgaactat atgttttaat ggccacgggt	1140
ttgtaagaca tttggtcctt tgttttccca gttattactc gattgtaatt ttatatcgcc	1200
agcaatggac tgaaacggtc cgcaacctct tctttacaac tgggtgacct cgcggtgtg	1260
ccagccattht ggcgttcacc ctgccgctaa gggccatgtg aacccccgcg gtagcatccc	1320
ttgctccgcg tggaccactt tcttgaggca cagtgatagg aacagagcca ctaatctgaa	1380
gagaacagag atgtgacaga ctacactaat gtgagaaaaa caaggaaagg gtgacttatt	1440
ggagatttca gaaataaaat gcattttatta ttatatcccc ttatttttaatt tttctattag	1500
ggaattagaa agggcataaa ctgctttatc cagtgttata ttaaaagctt aatgtatata	1560
atctttttaga ggtaaaatct acagccagca aaagtcattg taaatattct ttgactgaac	1620
tctcactaaa ctctctctaaa ttatatgtca tattaactgg ttaaattaat ataaatttgt	1680
gacatgacct taactggta ggtaggatat tttcttctat gcaaaaatat gactaataat	1740
aatttagcac aaaaatattht cccaatactt taattctgtg atagaaaaat gtttaactca	1800
gctactataa tcccataatt ttgaaaacta tttattagct tttgtgtttg acccttccct	1860
agccaaaggc aactatthta ggacccttta aaactcttga aactacttta gactcattaa	1920
gttatthaac cactthtaatt tactthtaaaa tgatgtcaat tccctthta ctatthtaatt	1980
atthtaaggg gggaaaggct gtcataaatt ctattgtttt tcttggtaaa gaactctcag	2040
ttttcgthtt tactacctct gtcaccaag agttggcatc tcaacagagg ggactthtcg	2100

16/22

```

agaggccatc tggcagttgc ttaagatcag aagtgaagtc tgccagttcc tcccaggcag 2160
gtggcccaga ttacagttga cctggttctgg tgtggctaaa aattgtccca tgtgggttaca 2220
aaccattaga ccagggtctg atgaattgct cagaatattt ctggacaccc aaatacagac 2280
cctggcttaa ggccctgtcc atacagtagg tttagcttgg ctacacccaa ggaagccata 2340
cagaggctaa tatcagagta ttcttggaag agacaggaga aaatgaaagc cagtttctgc 2400
tcttacctta tgtgcttgtg ttcagactcc caaacatcag gagtgtcaga taaactggtc 2460
tgaatctctg tctgaagcat ggaactgaaa agaattgtagt ttcagggaag aaaggcaata 2520
gaaggaagcc tgagaatacg gatcaattct aaactctgag ggggtcggat gacgtggcca 2580
ttctttgcct aaagcattga gtttactgca aggtcagaaa agcatgcaa gccctcagaa 2640
tggctgcaaa gagctccaac aaaacaattt agaactttat taaggaatag ggggaagcta 2700
ggaagaaaact caaaacatca agatttttaa tacgcttctt ggtctccttg ctataattat 2760
ctgggataag catgctgttt tctgtctgtc cctaacatgc cctgtgatta tccgcaaaca 2820
acacacccaa gggcagaact ttgttactta aacaccatcc tgtttgcttc ttctctcagg 2880
aactgtggct gcaccatctg tcttcattct cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg 2940
aactgcctct gttgtgtgcc tgcgaataa cttctatccc agagaggcca agtacagtg 3000
gaagggtgat aacgcctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag 3060
caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag actacgagaa 3120
acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag 3180
cttcaacagg ggagagtgtt ag 3202

```

```

<210> 25
<211> 1428
<212> DNA
<213> artificial sequence

```

```

<220>
<223> heavy chain with Fc region of ANTIBODY A and with leader sequence

```

```

<400> 25
atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
gtggaattgg tggaaagcgg cggcggcctg gtgcaaccgg gcggcagcct gcgtctgagc 120
tgcgcggcct ccggatttac ctttagcagc tatgcgatga gctgggtgcg ccaagccoct 180
gggaagggtc tcgagtgggt gagcgctatt aatgcttctg gtactcgtac ttattatgct 240
gattctgtta agggtcgttt taccatttca cgtgataatt cgaaaaacac cctgtatctg 300
caaatgaaca gcctgcgtgc ggaagatacg gccgtgtatt attgcgcgcg tggttaagggt 360

```

17/22

```

aataactcata agccttatgg ttatgttcgt tattttgatg ttgggggcca aggcaccctg 420
gtgacgggta gctcagcctc caccaagggc ccatcggtct tccccctggc accctcctcc 480
aagagcacct ctggggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 540
ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccggt 600
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcage 660
ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 720
aagaaagttg agcccaaadc ttgtgacaaa actcacacat gcccacctg cccagcacct 780
gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc tccccccaa aaccaagga caccctcatg 840
atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 900
gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 960
gaggagcagt acaacagcac gtaccgggtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 1020
tggtctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc 1080
gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 1140
ccatccccgg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 1200
tatccagcgc acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1260
accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg 1320
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1380
cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatga 1428

```

<210> 26

<211> 475

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> heavy chain with Fc region of ANTIBODY A and with leader sequence

<400> 26

```

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1           5           10           15

```

```

Val Leu Ser Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20           25           30

```

```

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35           40           45

```

18/22

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr
115 120 125

Val Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
130 135 140

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
145 150 155 160

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
165 170 175

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
180 185 190

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
195 200 205

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
210 215 220

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
225 230 235 240

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
245 250 255

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
260 265 270

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
275 280 285

19/22

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 290 295 300

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 305 310 315 320

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 325 330 335

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 340 345 350

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 355 360 365

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 370 375 380

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 385 390 395 400

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 405 410 415

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 420 425 430

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 435 440 445

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 450 455 460

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470 475

<210> 27

<211> 708

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> light chain of ANTIBODY A with leader sequence

<400> 27

atgggtgttg agaccaggt cttcatttct ctgttgctct ggatctctgg tgcctacggg 60

gatatcgtgc tgaccagag cccggcgacc ctgagcctgt ctccggggcga acgtgcgacc 120

20/22

```

ctgagctgca gagcgagcca gagcgtgagc agcagctatc tggcgtggta ccagcagaaa   180
ccaggtcaag caccgcgtct attaatattat ggcgcgagca gccgtgcaac tgggggtcccg   240
gcgcgtttta gcggctctgg atccggcacg gattttaccc tgaccattag cagcctggaa   300
cctgaagact ttgcgactta ttattgcctt cagatttata atatgcctat tacctttggc   360
caggggtacga aagttgaaat taaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg   420
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc   480
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc   540
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacccctg   600
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag   660
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggttag   708

```

<210> 28

<211> 235

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> light chain of ANTIBODY A with leader sequence

<400> 28

```

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1           5           10           15

```

```

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20           25           30

```

```

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35           40           45

```

```

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50           55           60

```

```

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro
65           70           75           80

```

```

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85           90           95

```

```

Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ile
100          105          110

```

21/22

Tyr Asn Met Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 29
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> MS-Roche #7.9.H7_Ig_kappa sense primer

<400> 29
 acgtaagctt gccgccacca tgggtgttgca g 31

<210> 30
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> MS-Roche #7.9.H7_Ig_kappa antisense primer

<400> 30
 acgtgaattc ctaacactct cccctgtt 28

<210> 31
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

22/22

<220>

<223> MS-Roche #7.9.H7_IgG1 sense primer

<400> 31

acgtaagctt gccgccacca tgaaacacct g

31

<210> 32

<211> 28

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

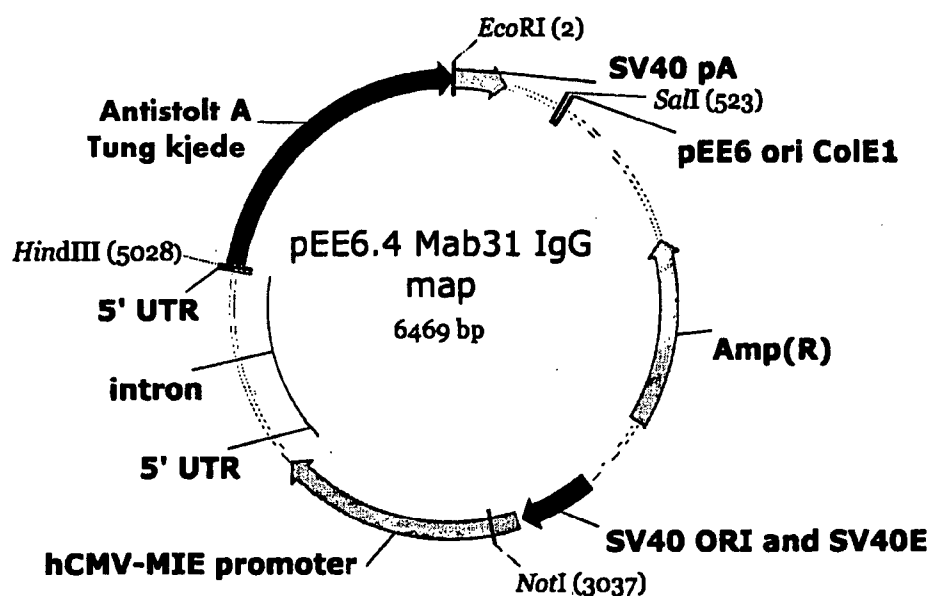
<223> MS-Roche #7.9.H7_IgG1 antisense primer

<400> 32

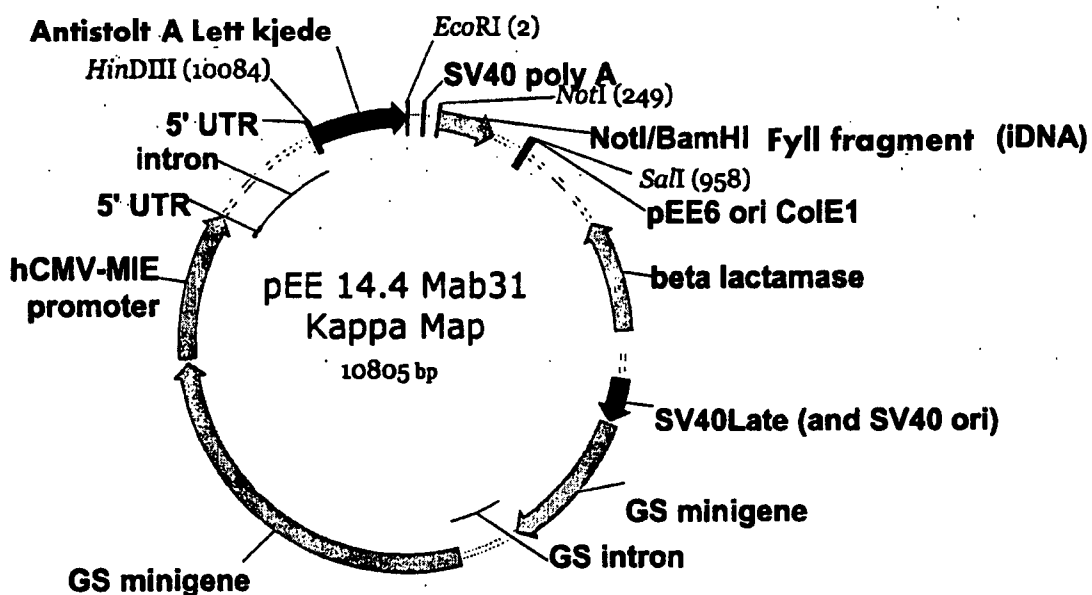
acgtgaattc tcatttaccg ggagacag

28

1/40

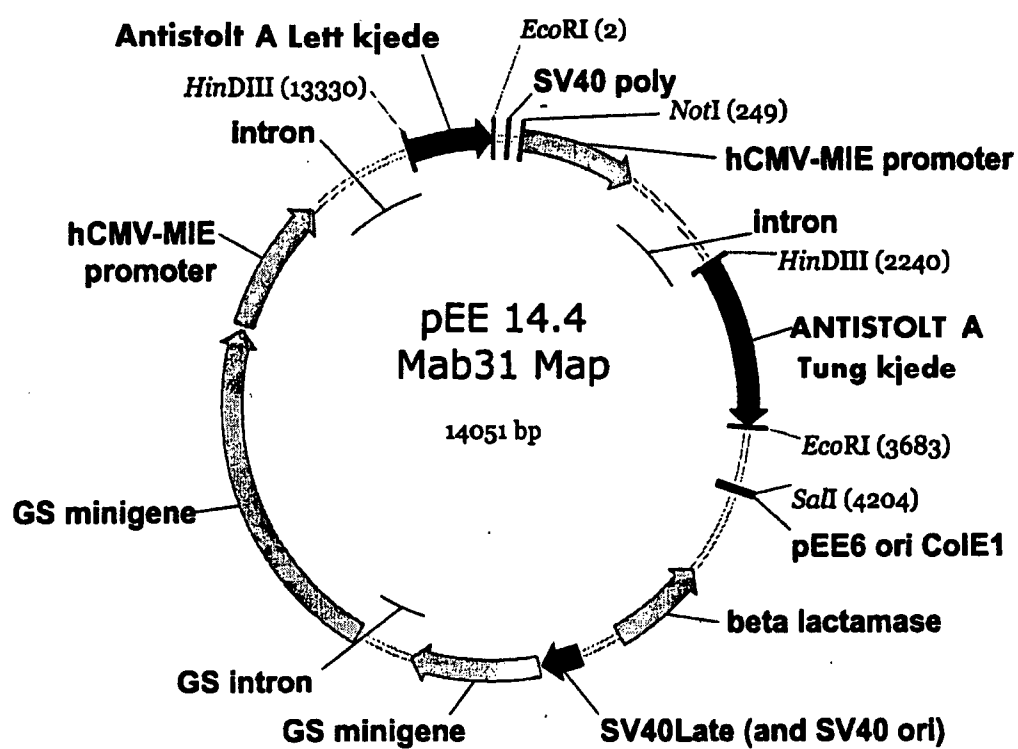


Figur 1A



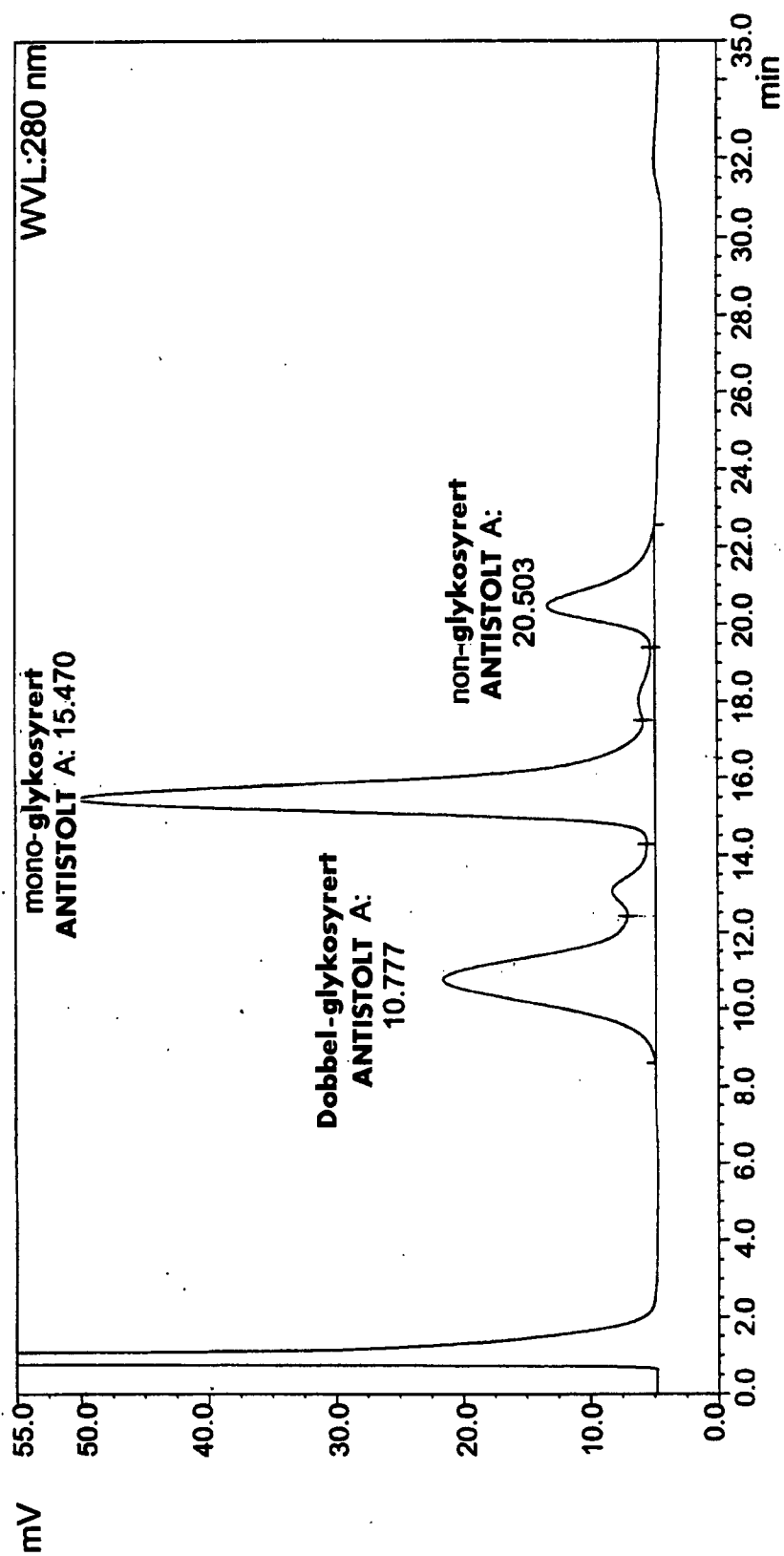
Figur 1B

2/40



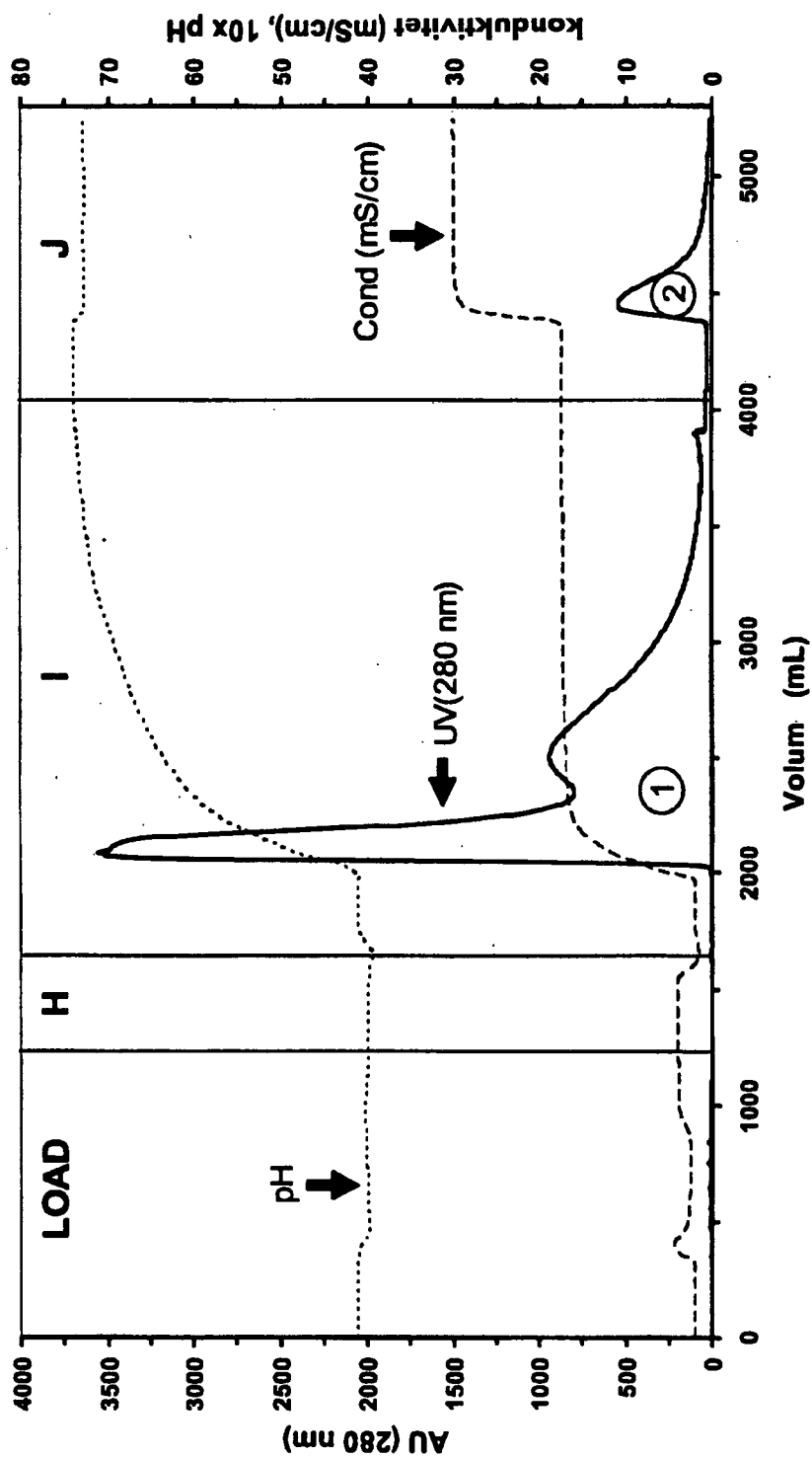
Figur 1C

3/40



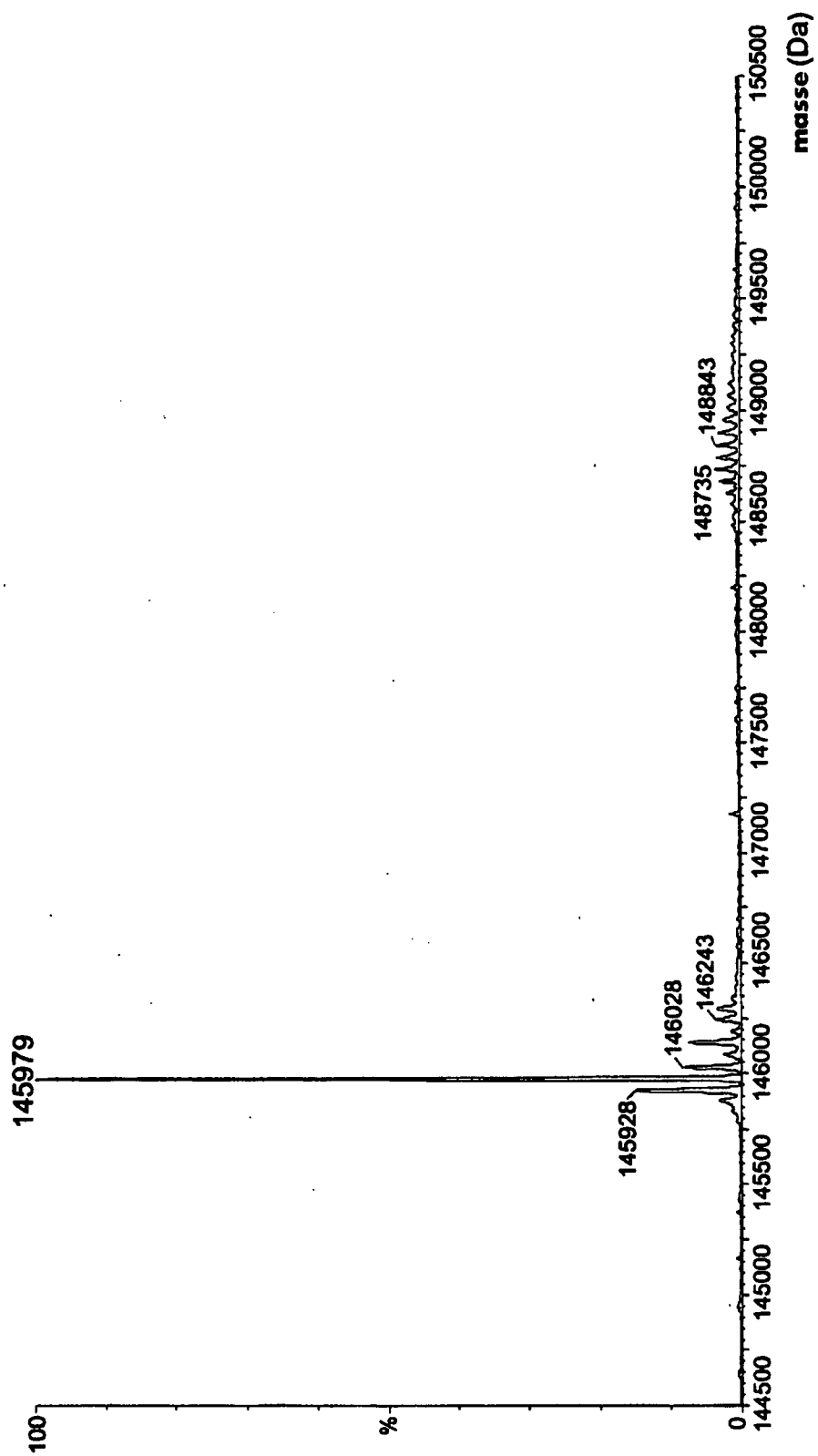
Figur 2

4/40

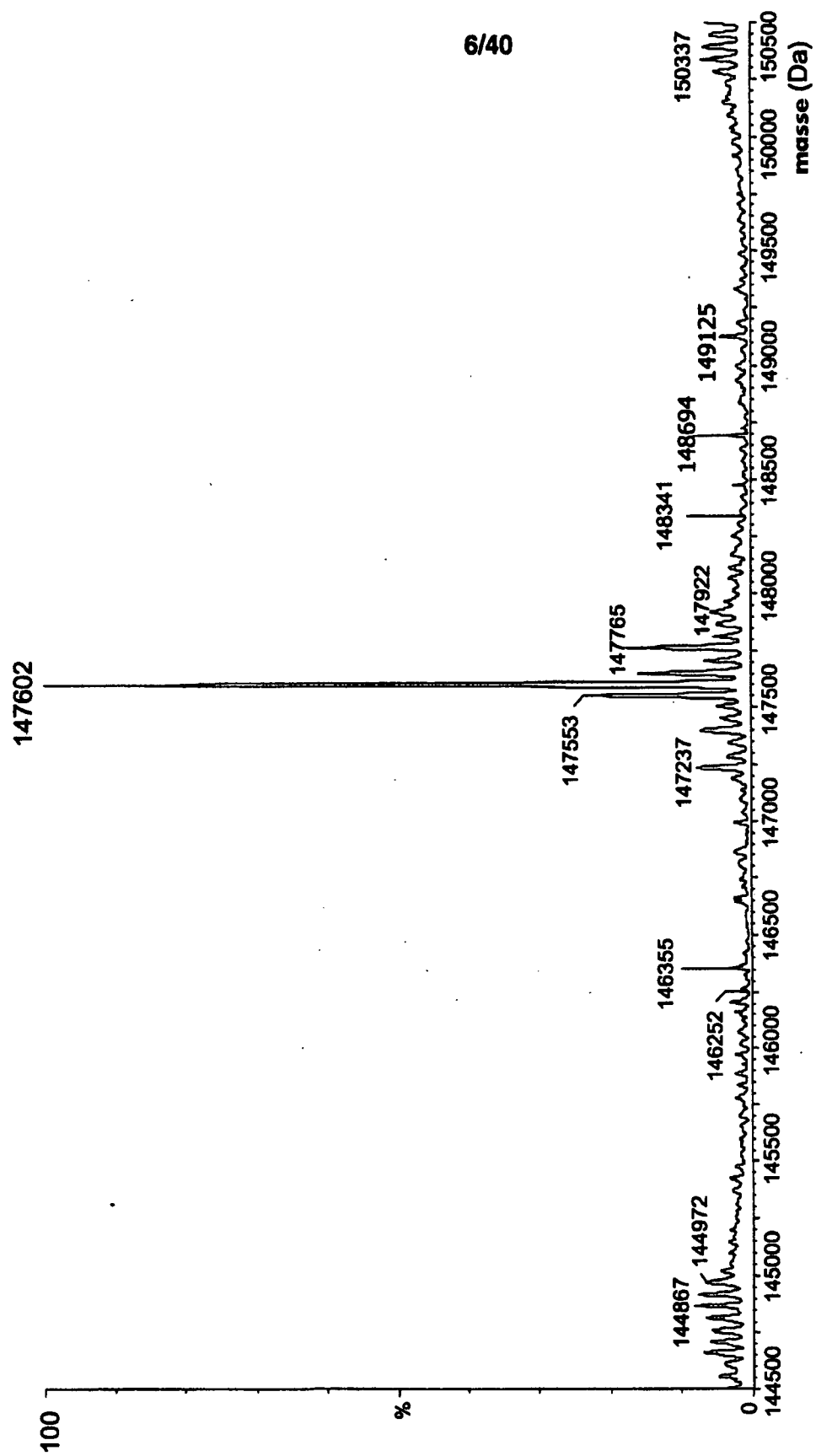


Figur 3

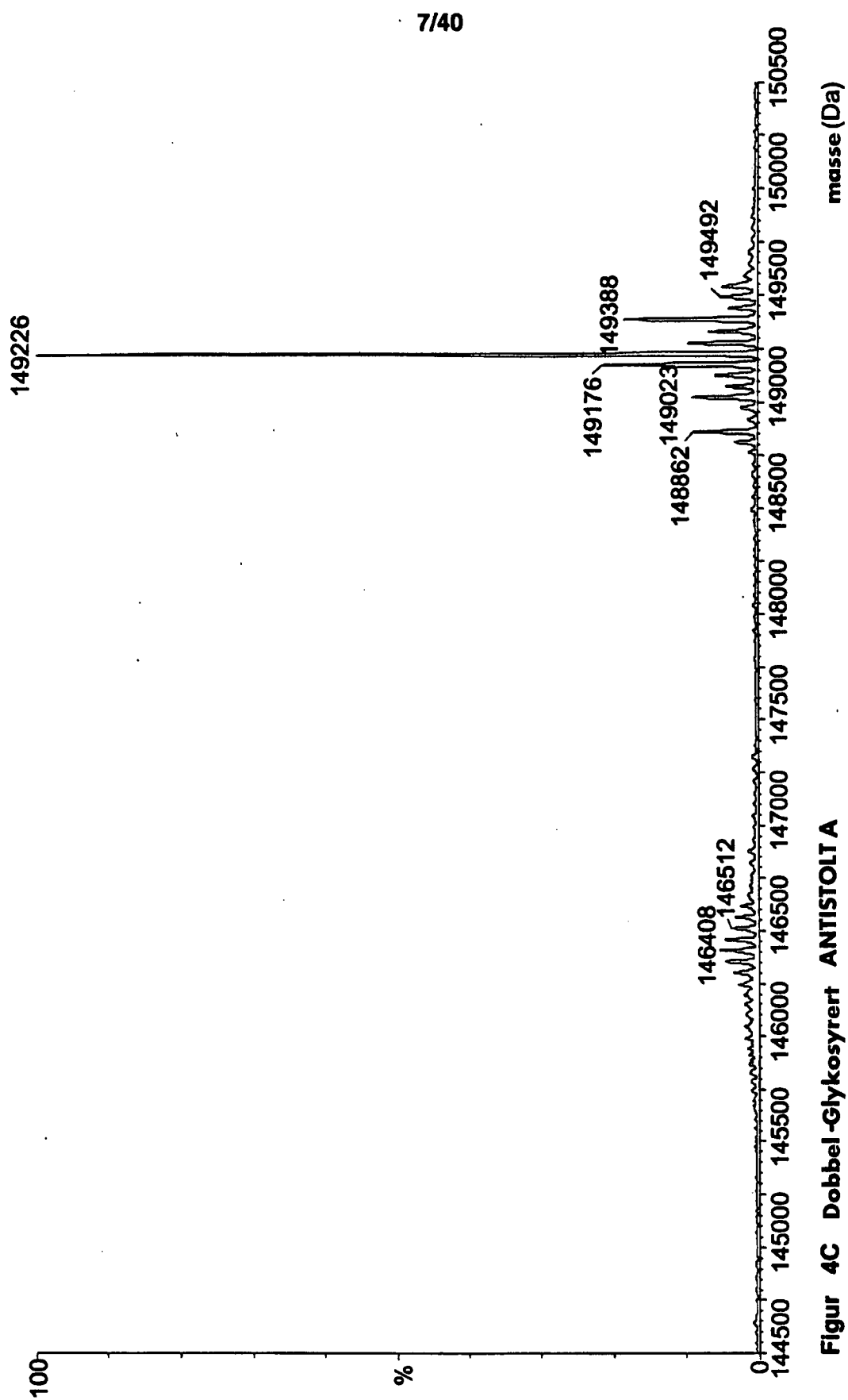
5/40



Figur 4A Ikke-Glykosyret ANTISTOLT A

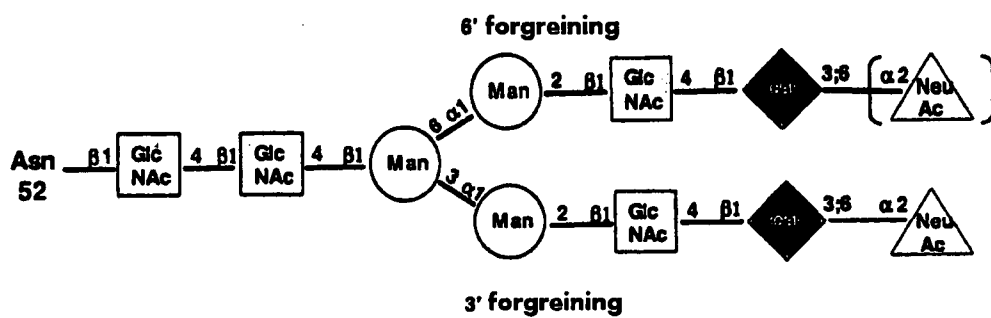


Figur 4B mono-Glykosyre ANTISTOLT A

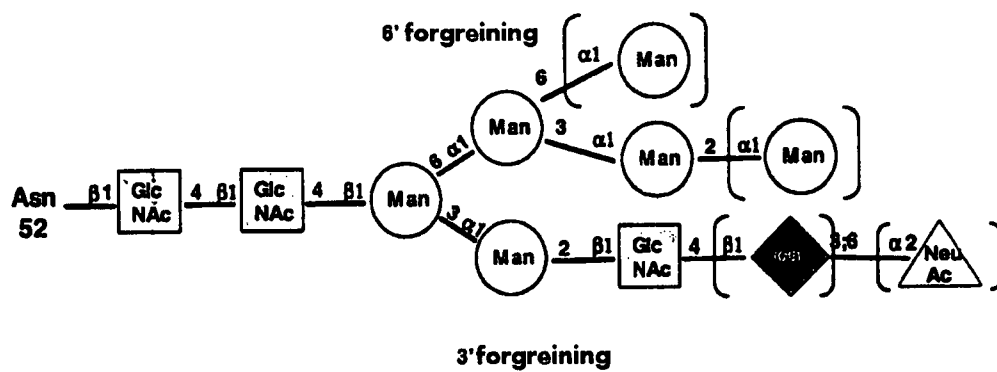


8/40

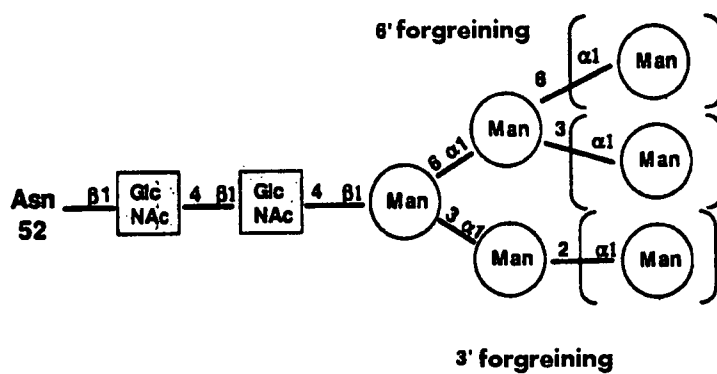
A



B

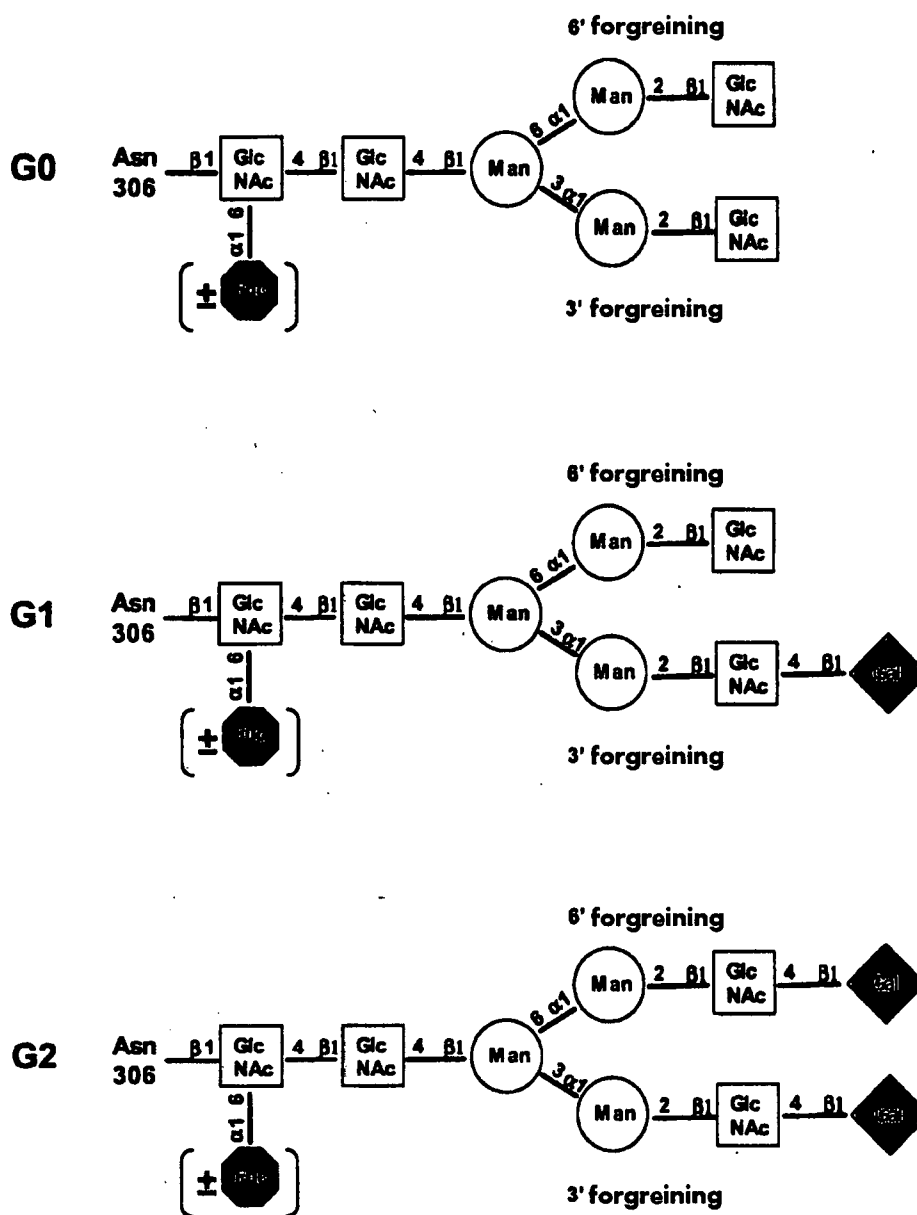


C



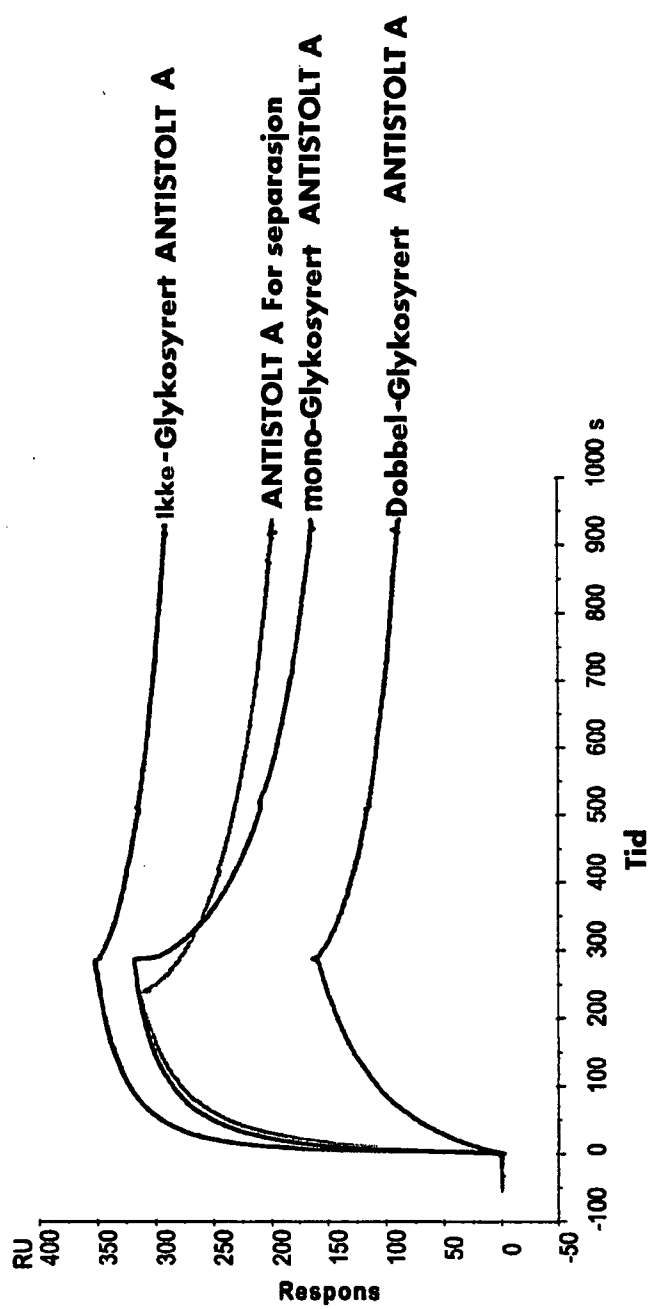
Figur 5

9/40



Figur 6

10/40



Figur 7

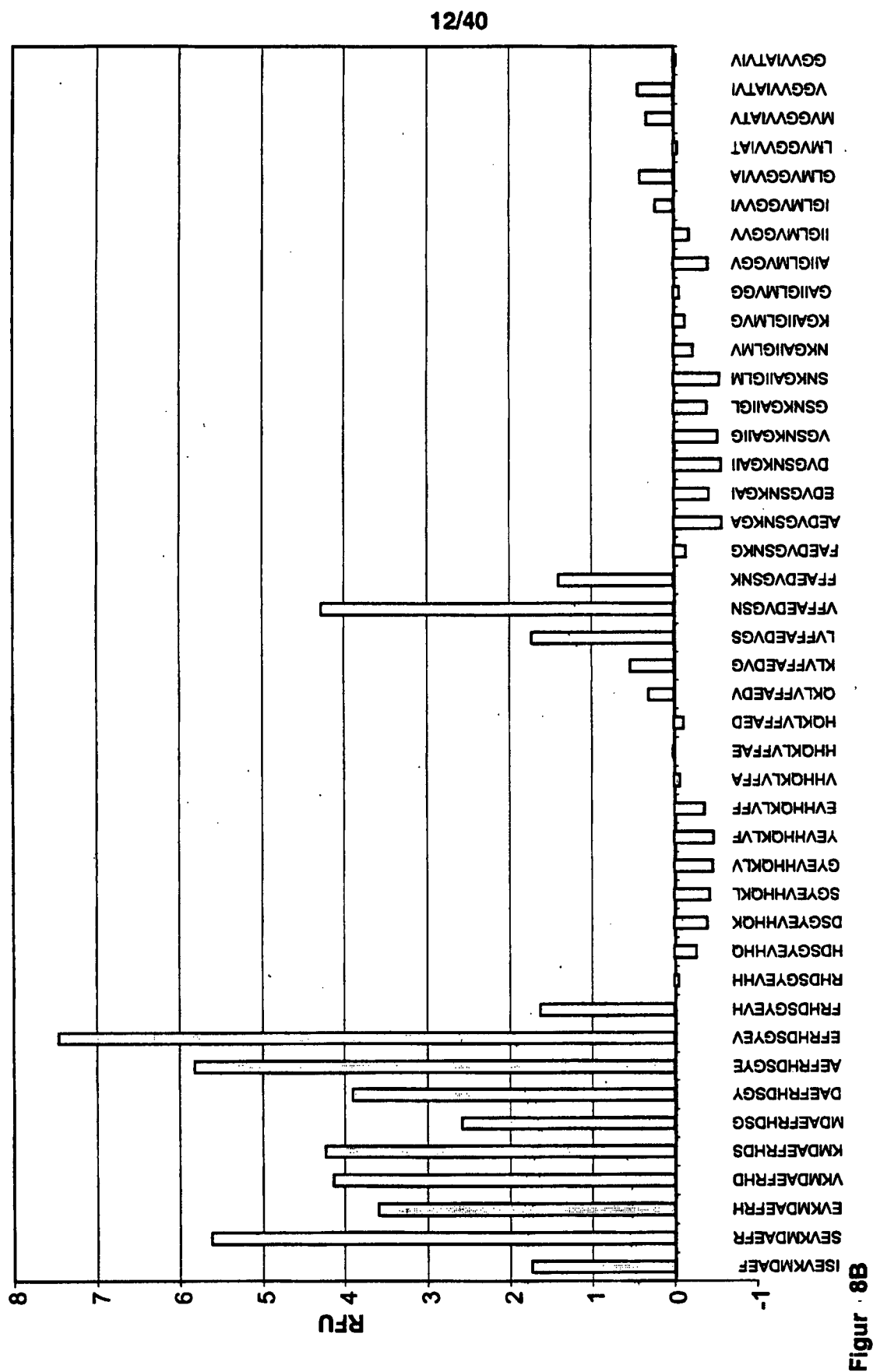
11/40

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

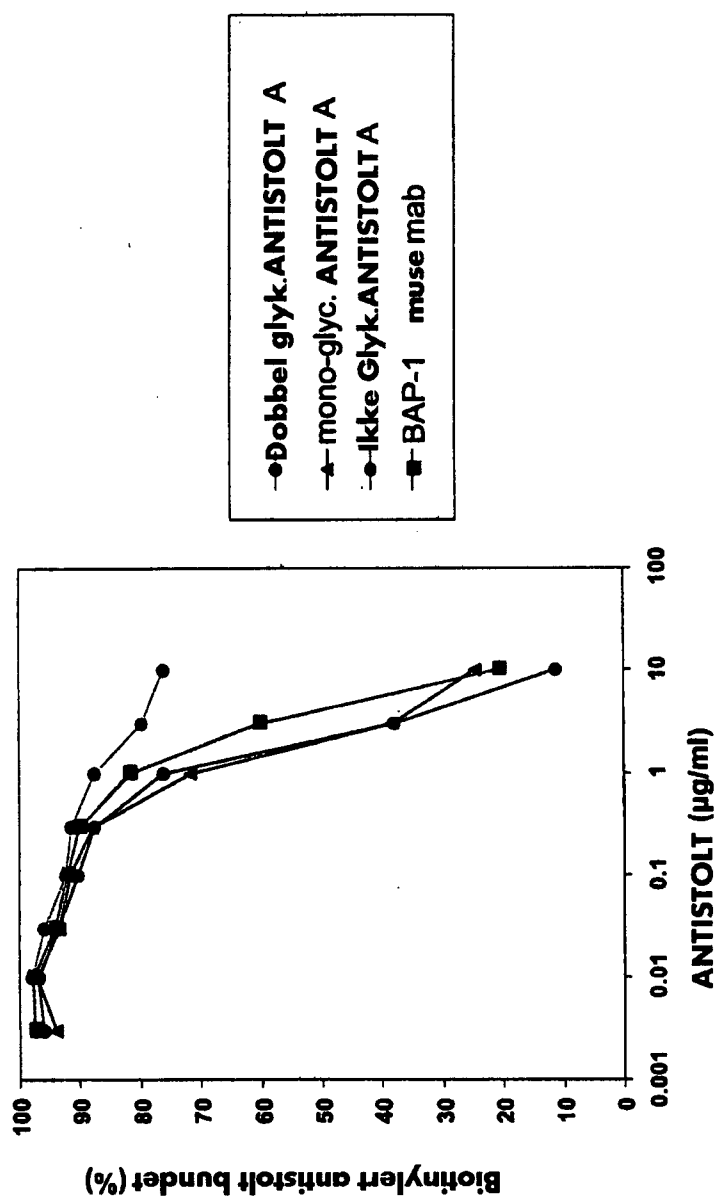
21 22 23 24 25 26

1	ISEVKMDAEF	21	OKLVFFAEDV
2	SEVKMDAEFR	22	KLTVFFAEDVG
3	EVKMDAEFRH	23	LVFFAEDVGS
4	VKMDAEFRHD	24	VFFAEDVGSN
5	KMDAEFRHDS	25	FFAEDVGSNK
6	MDAEFRHDS	26	FAEDVGSNK
7	DAEFRHDSGY		
8	AEFRHDSGYE		
9	EFRHDSGYEV		
10	FRHDSGYEVH		

Figur 8A

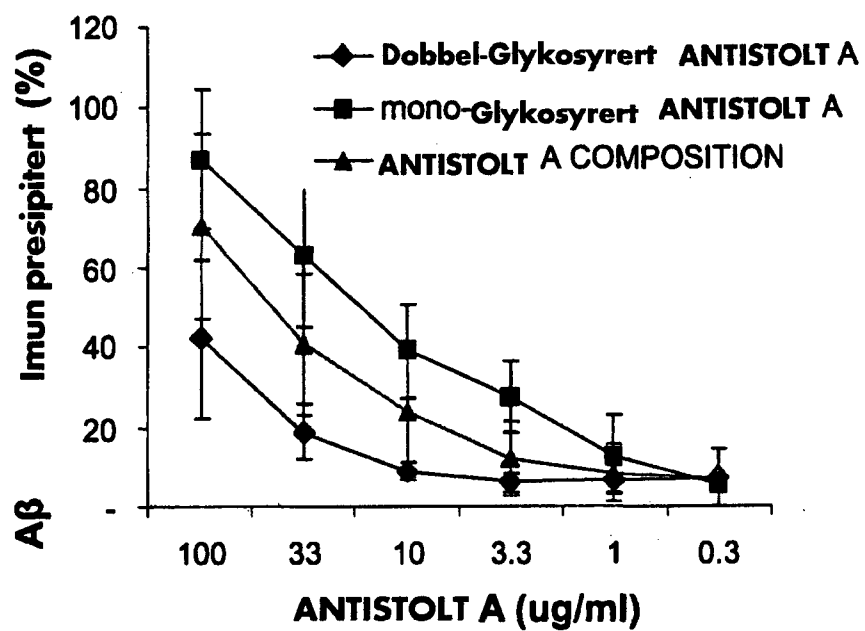


13/40



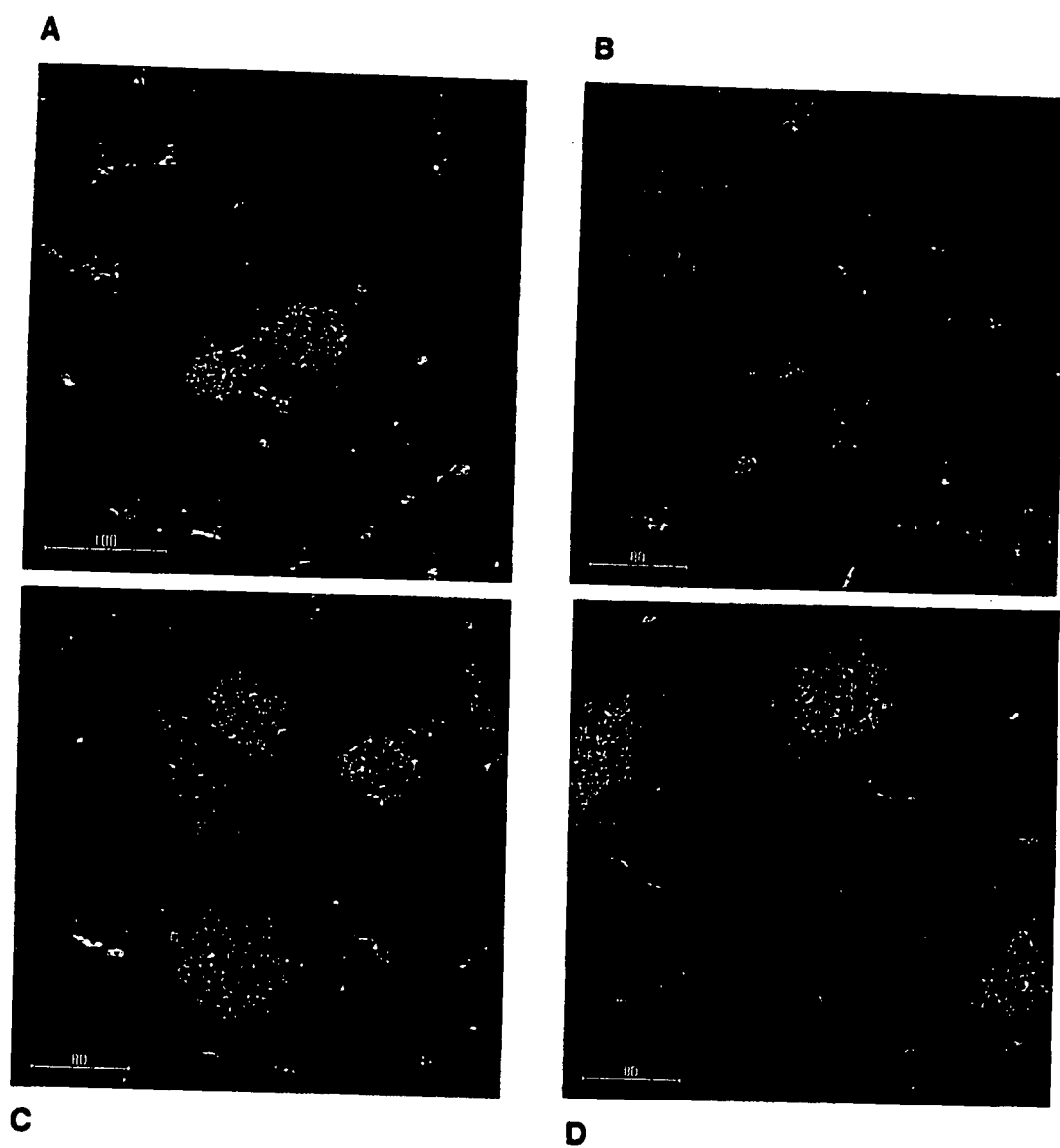
Figur 9

14/40

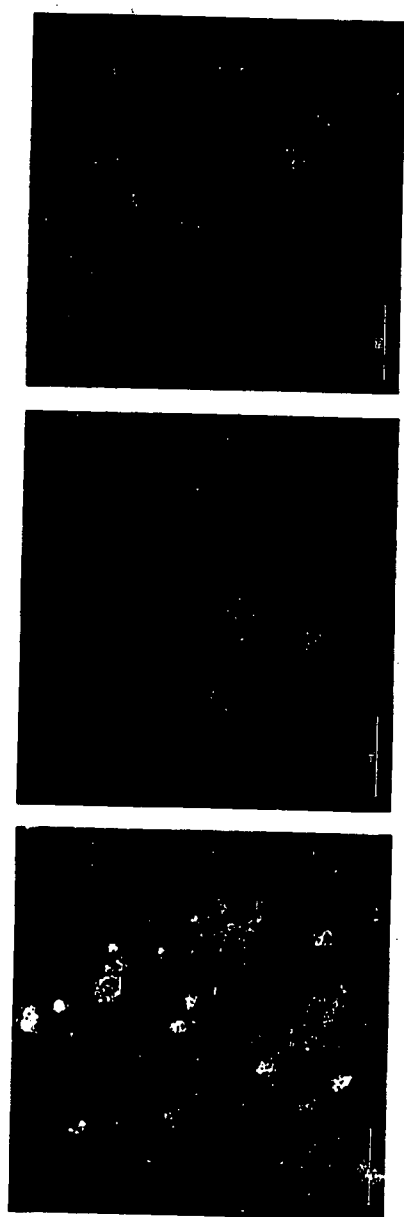


Figun 10

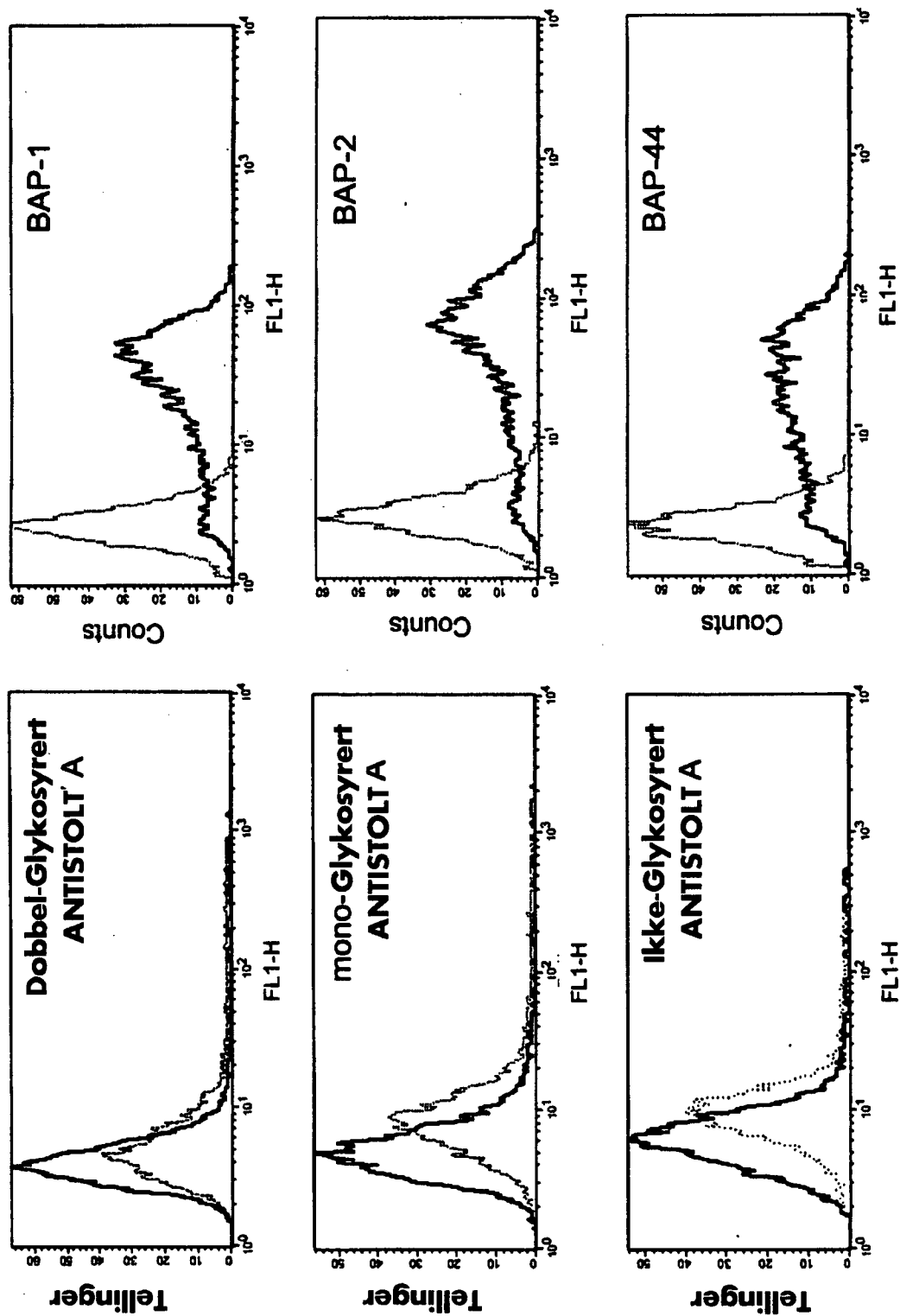
15/40

**Figur 11**

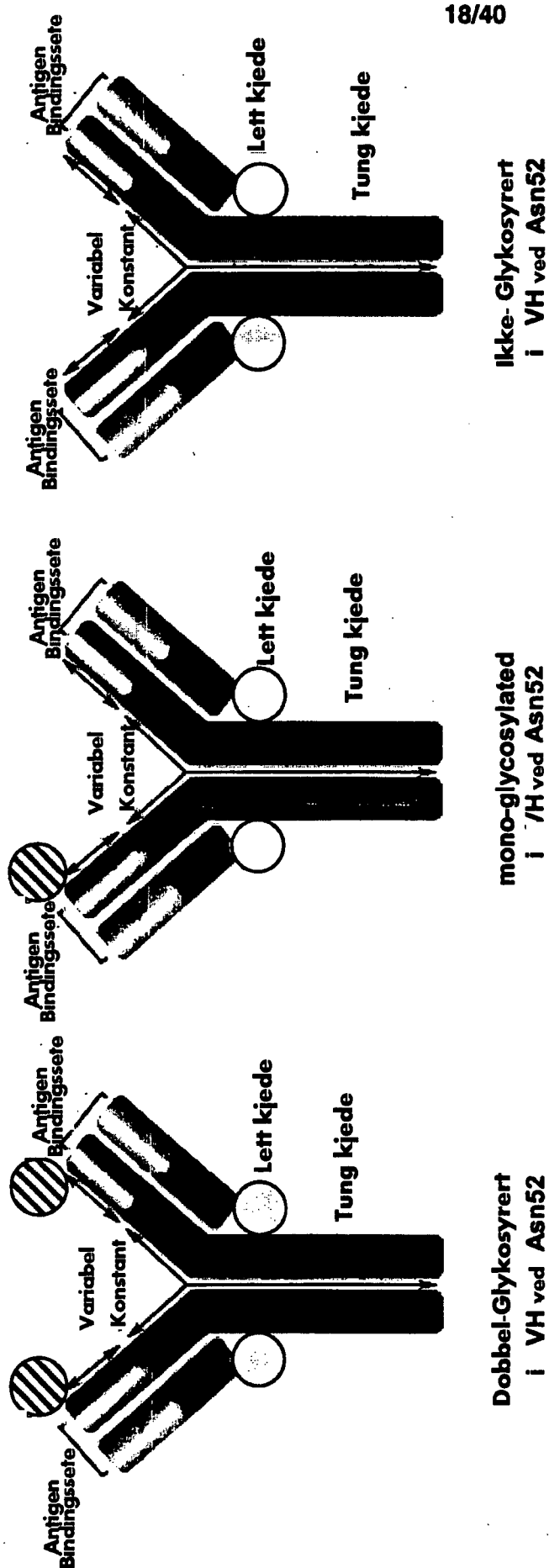
16/40

**Figur 12**

17/40



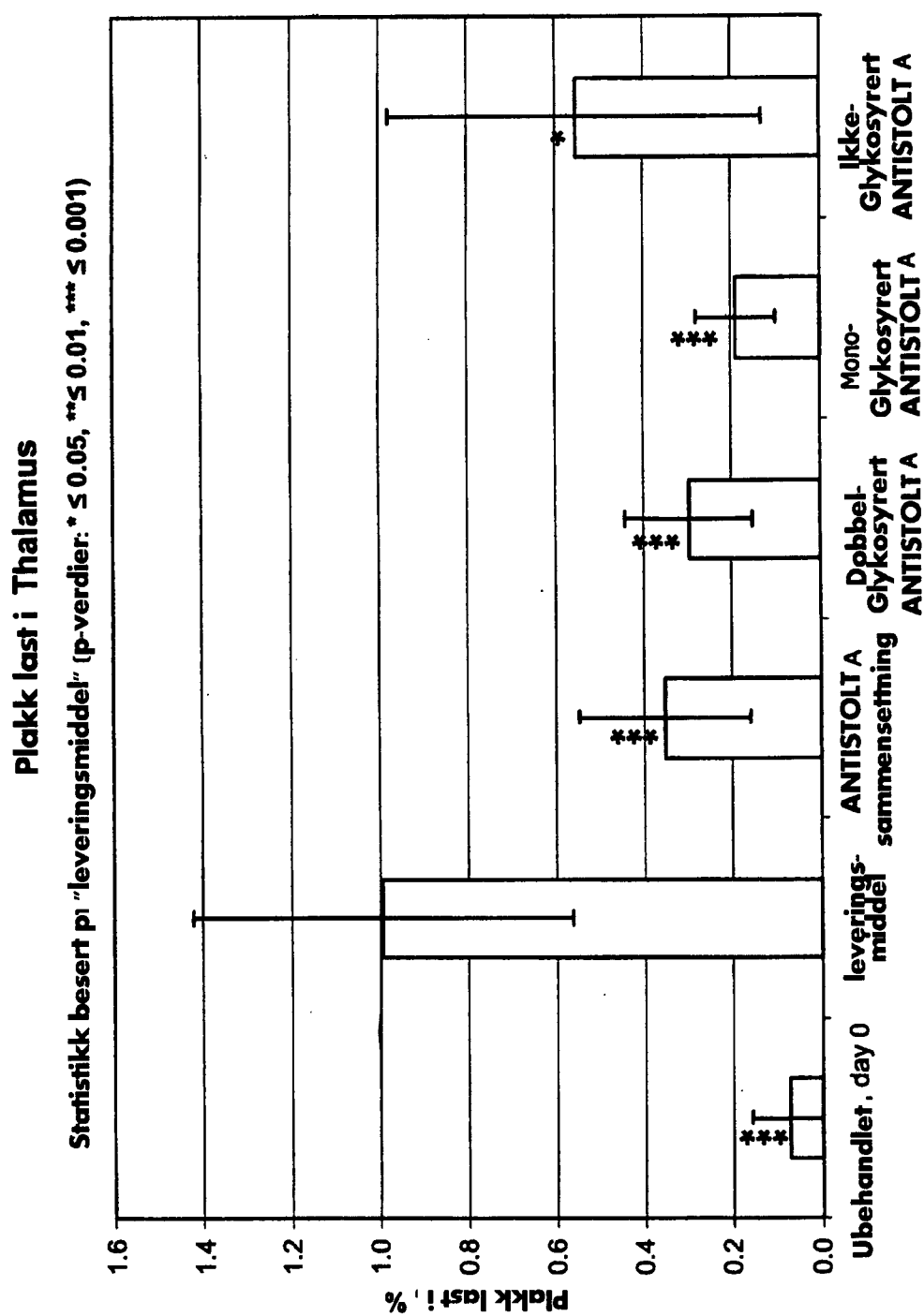
Figur 13



- N- Glykosyreringsse ved variabel tung kjede Asn52
- N- Glykosyrering ved hengsle region ved Asn306

Figur 14

19/40

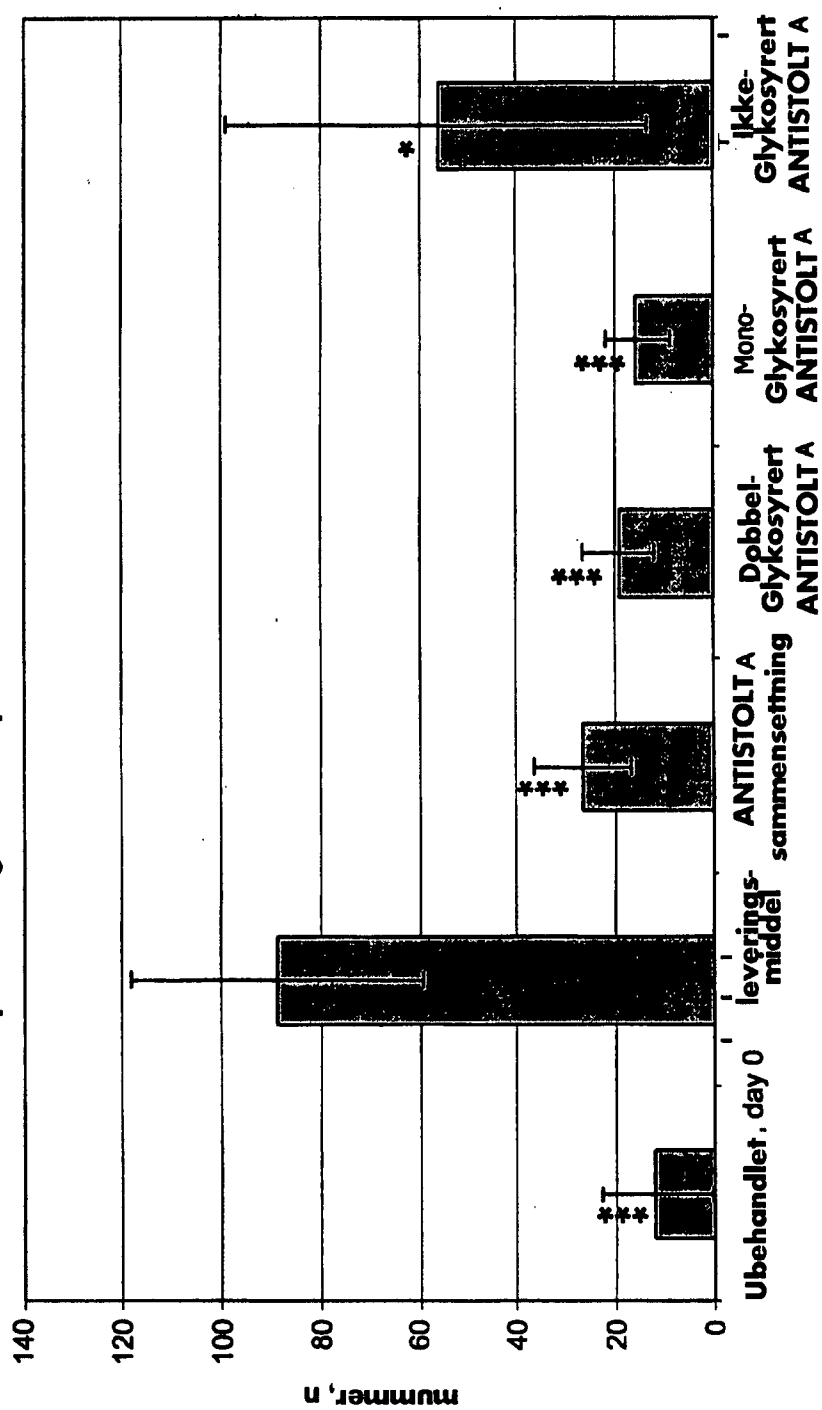


Figur 15A

20/40

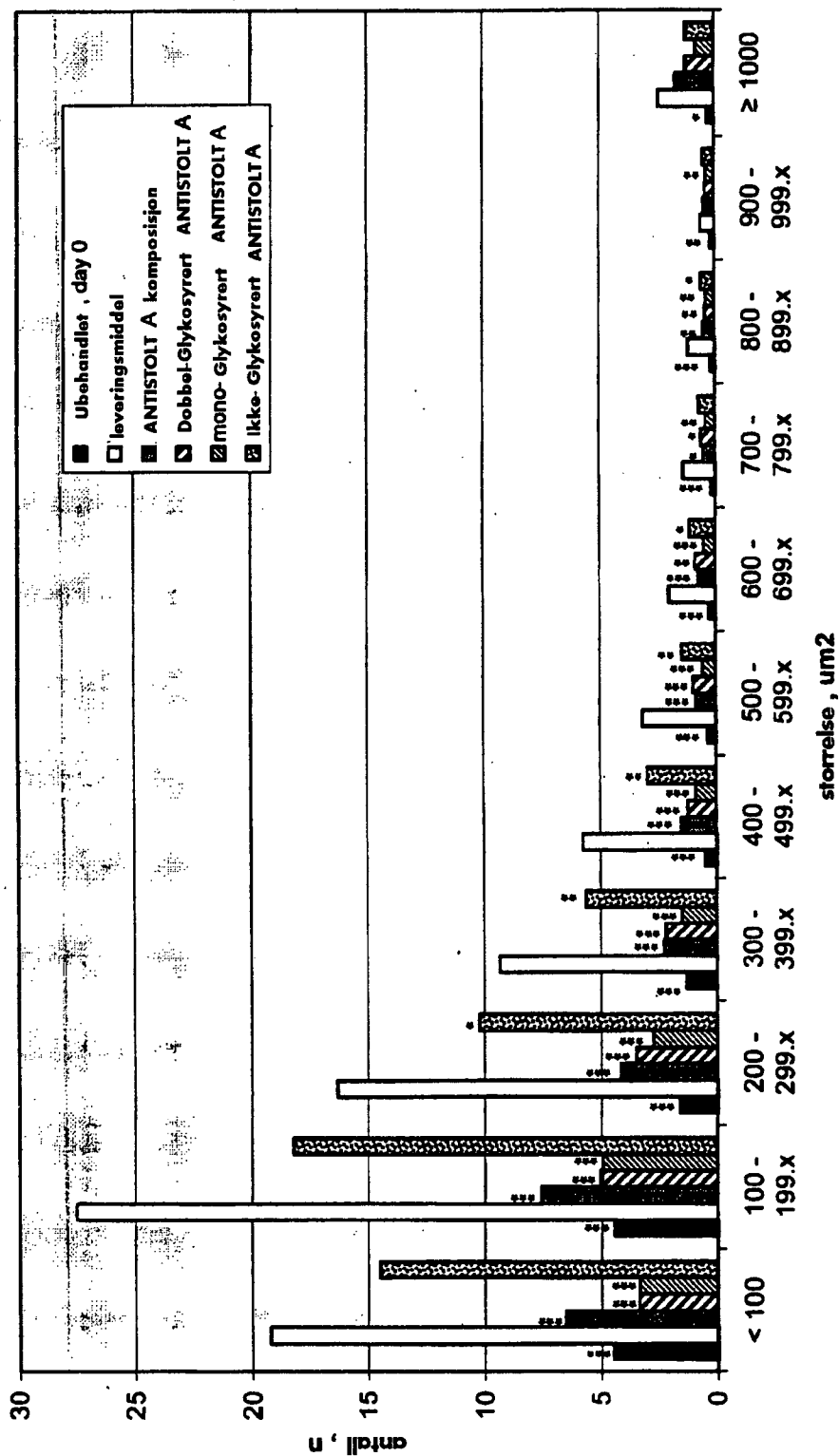
Plakk nummer i Thalamus

Statistikk besert p1 "leveringsmiddel" (p-verdier: * ≤ 0.05 , ** ≤ 0.01 , *** ≤ 0.001)



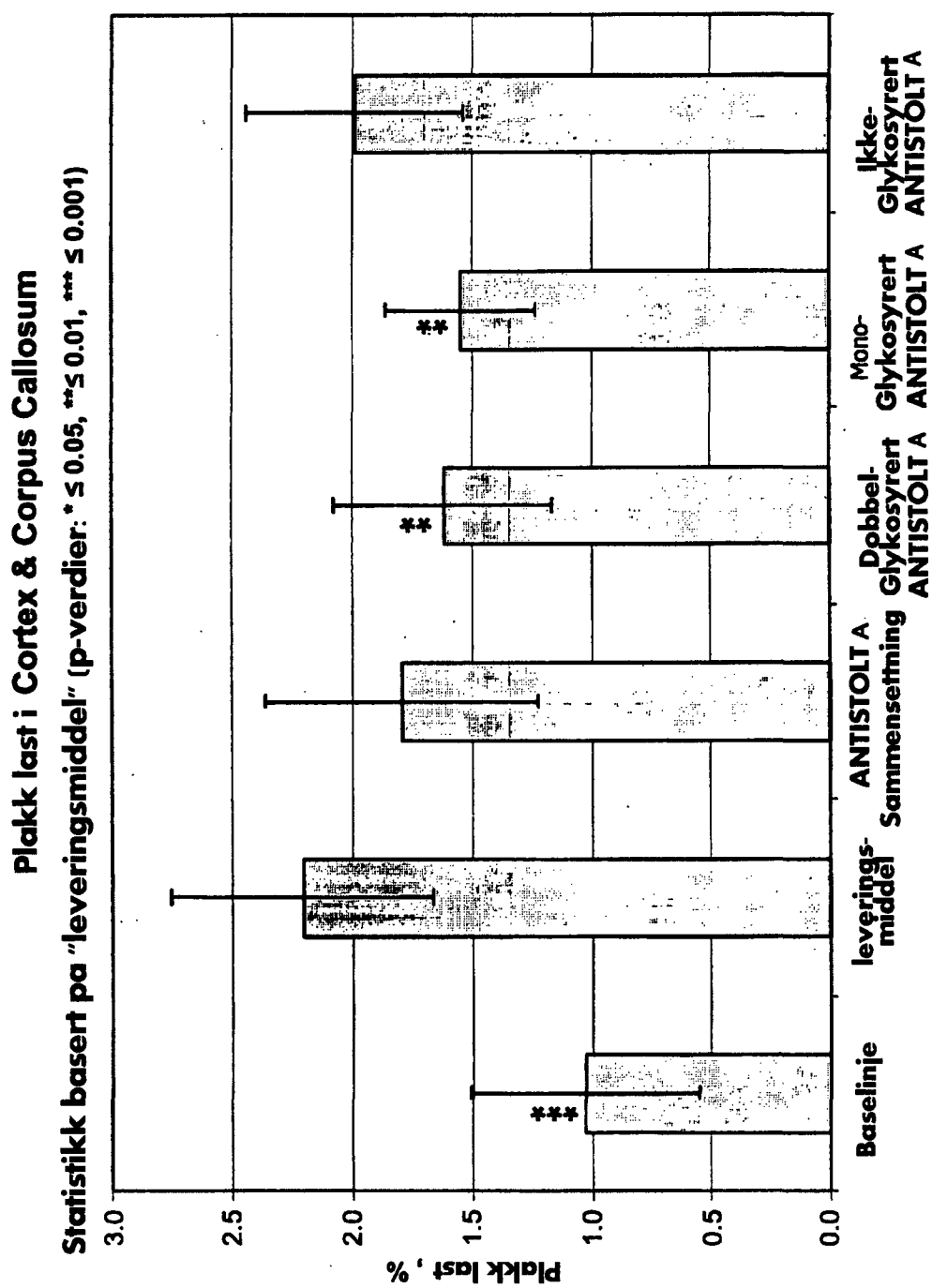
Figur 15B

Plakkantall og størrelse distribusjon i Thalamus
Statistikk basert på "leveringsmiddel" (p-verdier: * ≤ 0.05 , ** ≤ 0.01 , * ≤ 0.001)**



Figur 15C

22/40

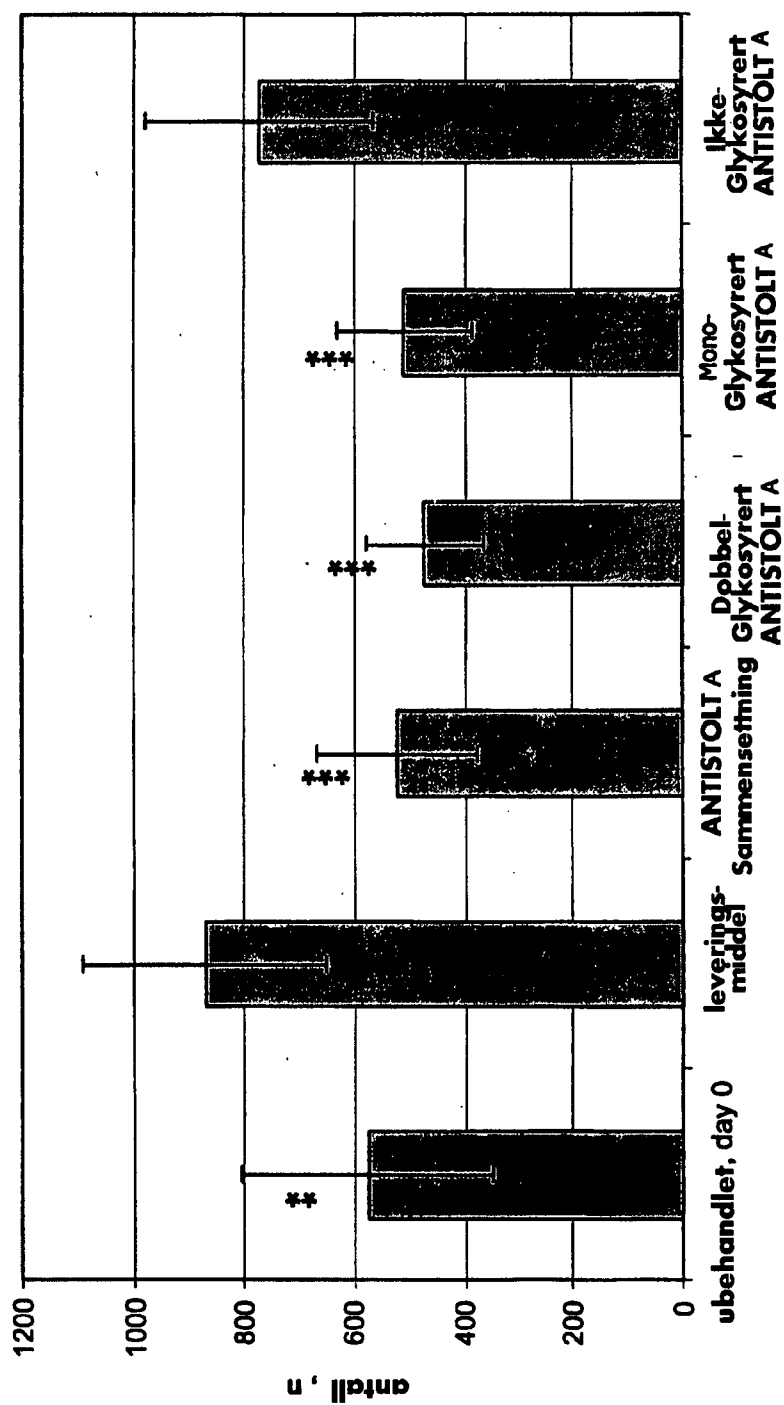


Figur 16A

23/40

Plakk last i Cortex & Corpus Callosum

Statistikk basert på "leveringsmiddel" (p-verdier: * ≤ 0.05 , ** ≤ 0.01 , *** ≤ 0.001)

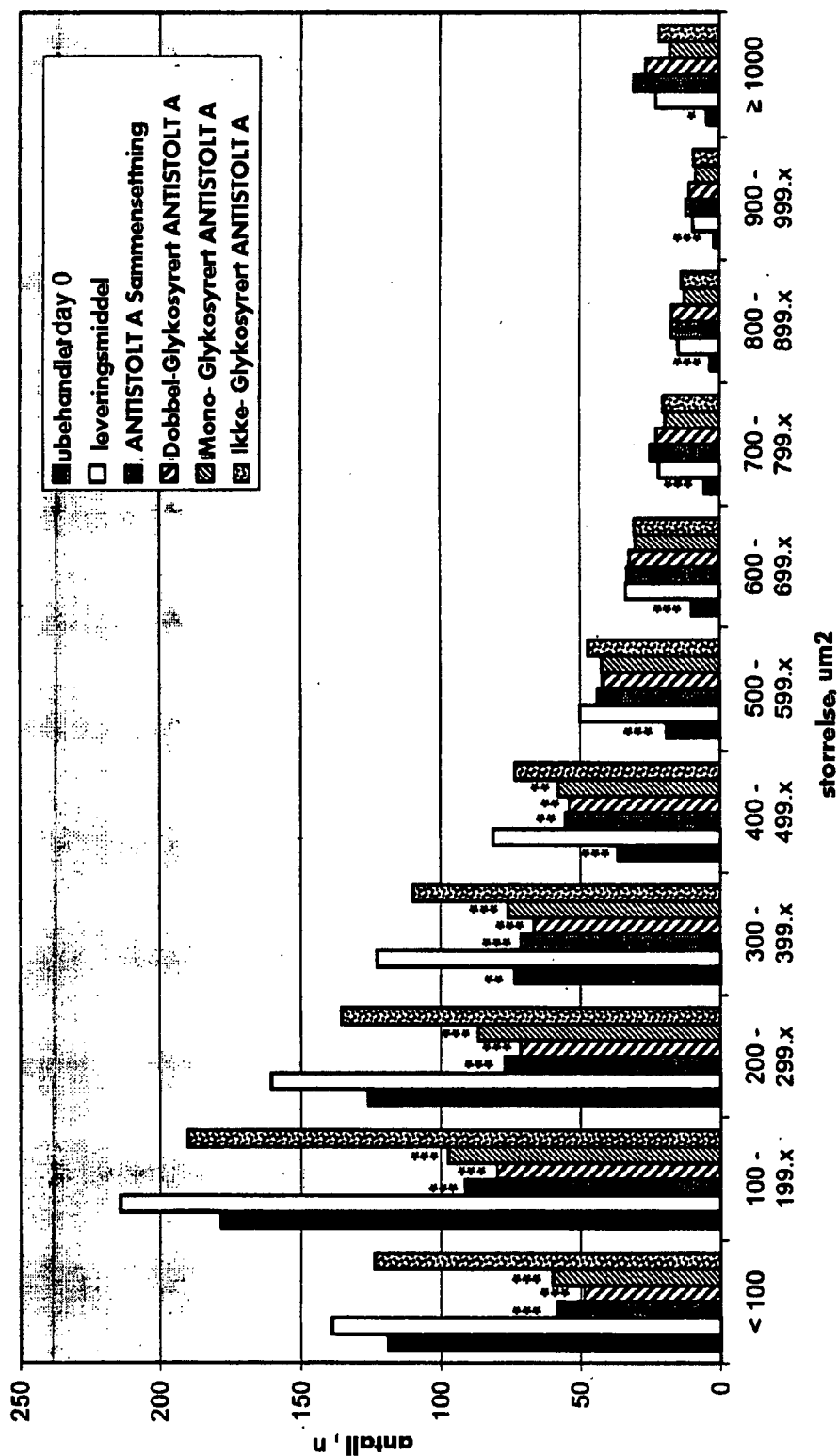


Figur 16B

24/40

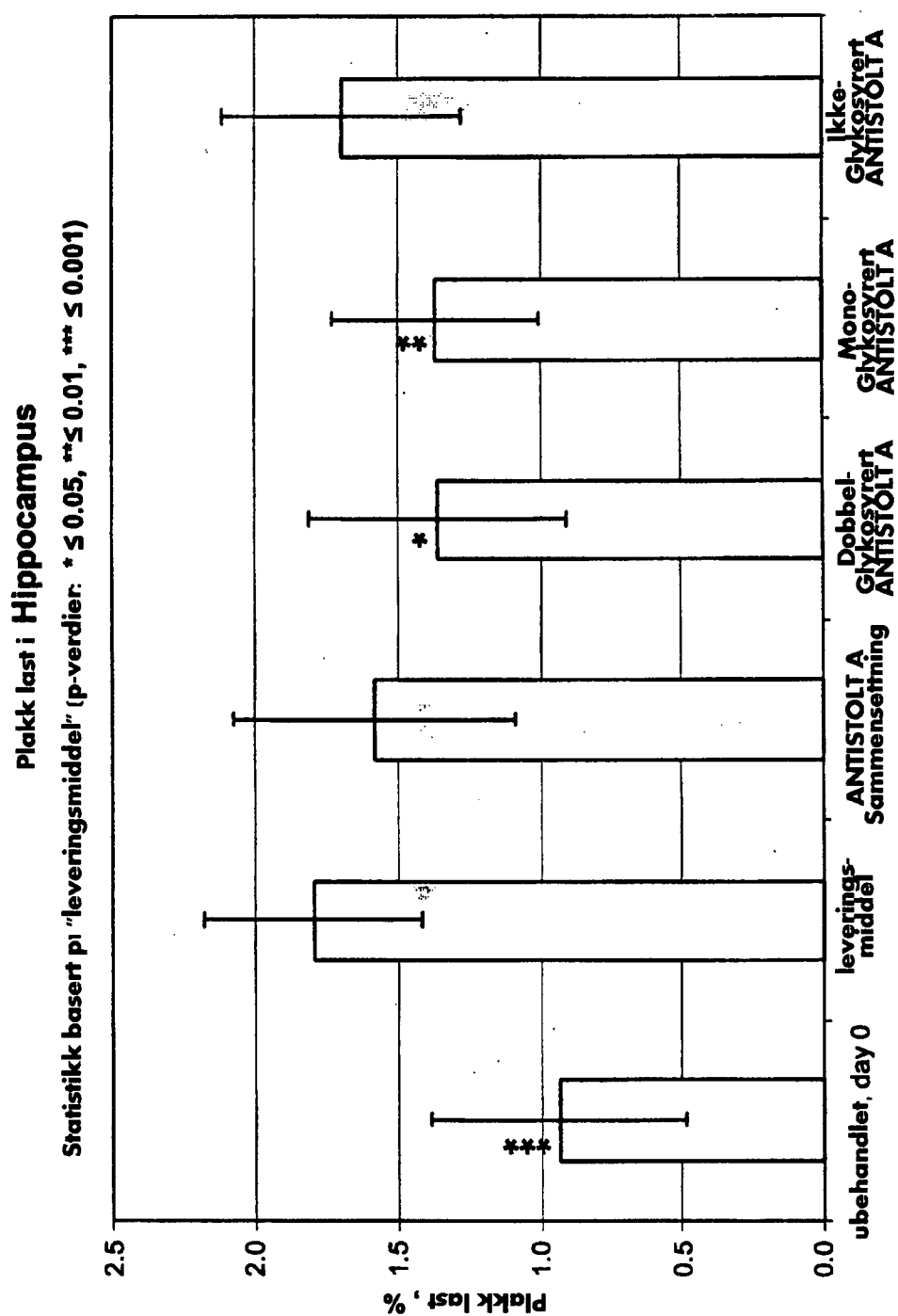
Plakkantall og størrelse distribusjon i Cortex & Corpus Callosum

Statistikk basert på "leveringsmiddel" (p-verdier: * ≤ 0.05 , ** ≤ 0.01 , *** ≤ 0.001)



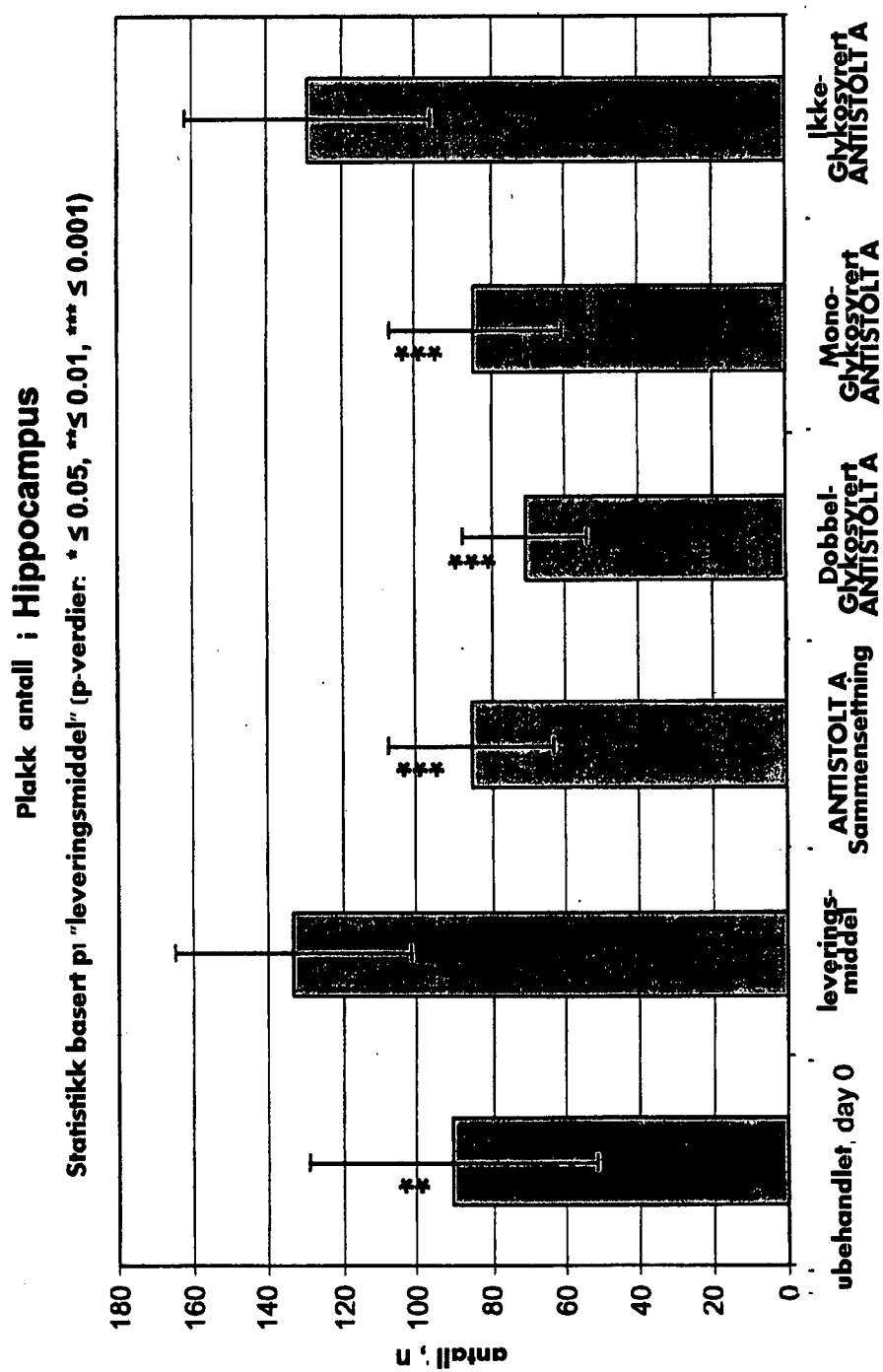
Figur 16C

25/40



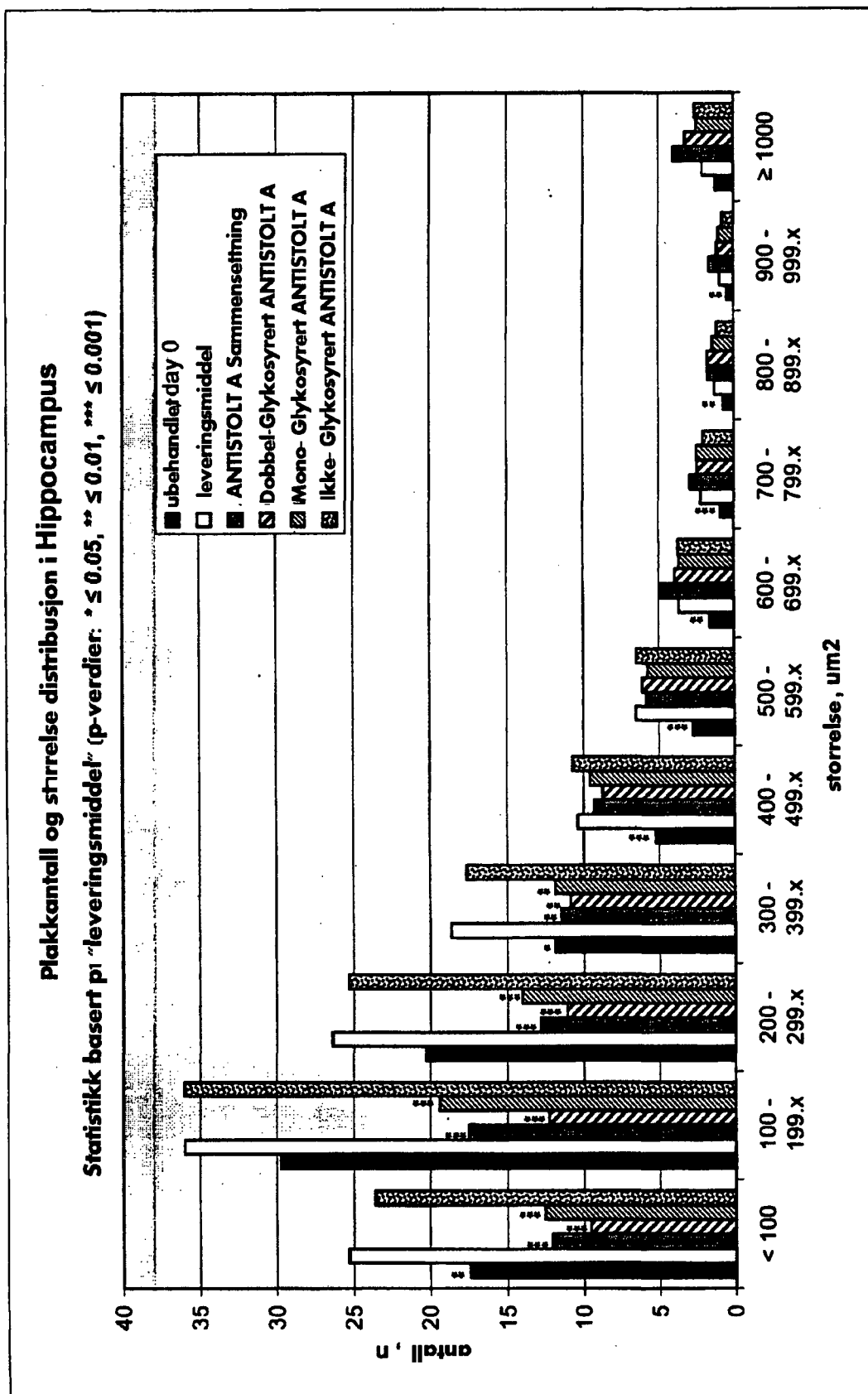
Figur 17A

26/40



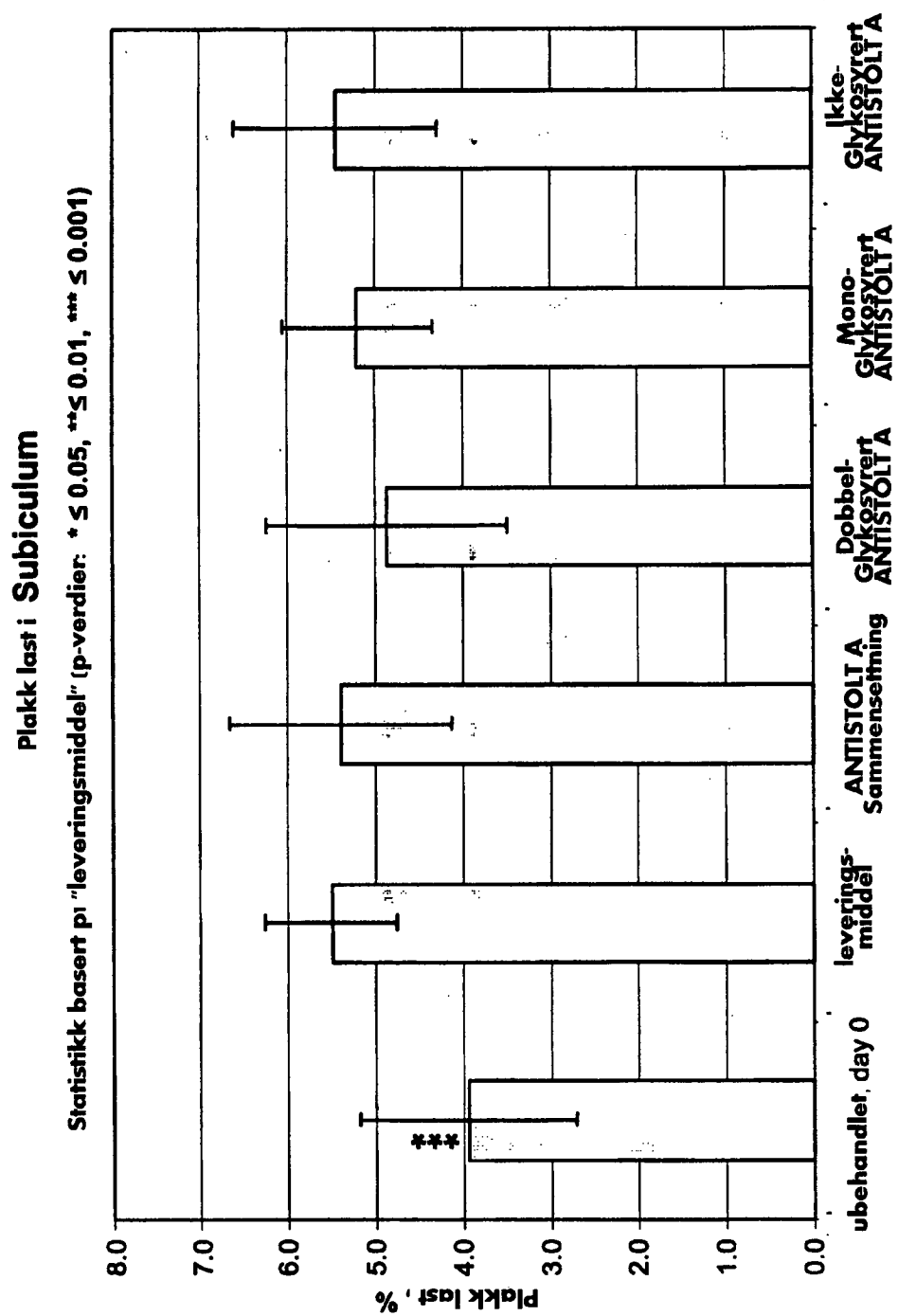
Figur 17B

27/40



Figur 17C

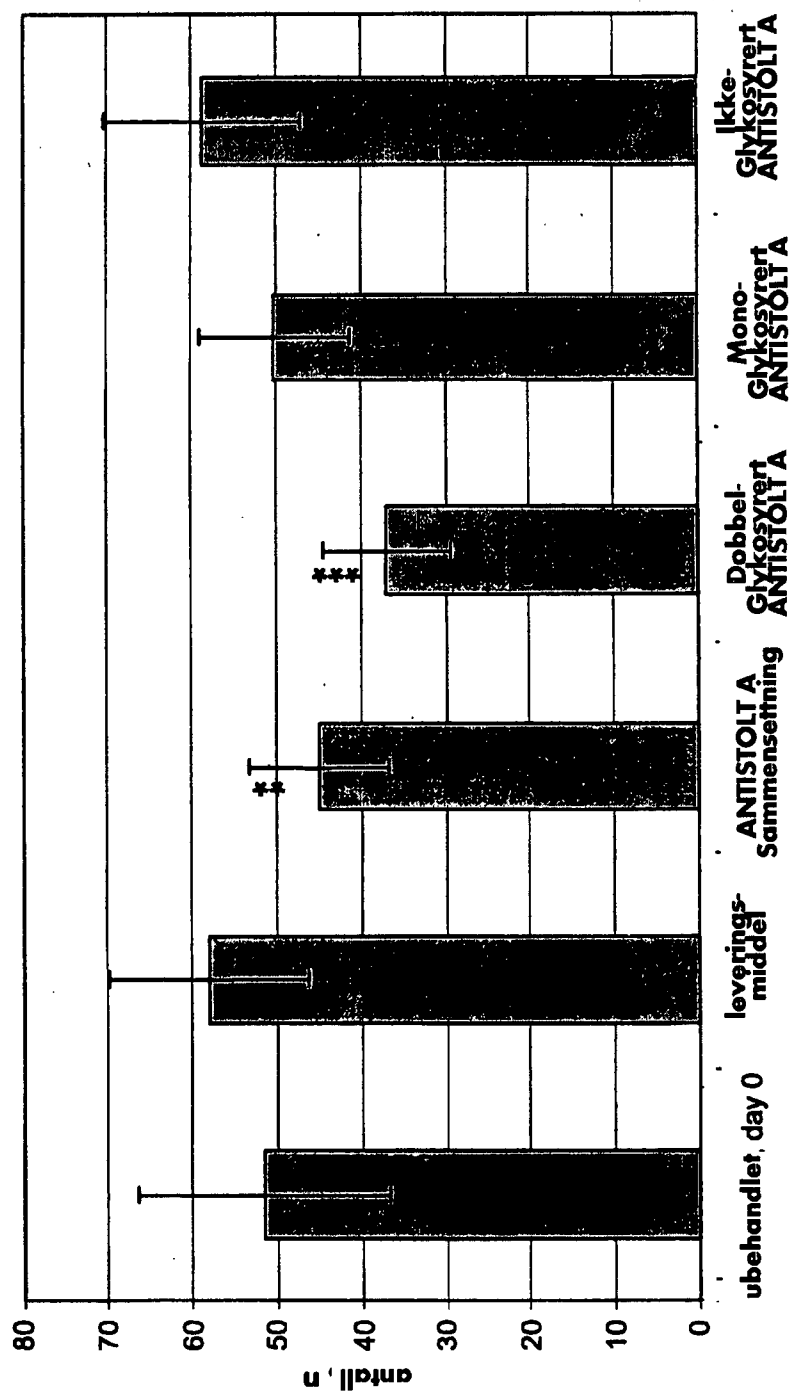
28/40



Figur 18A

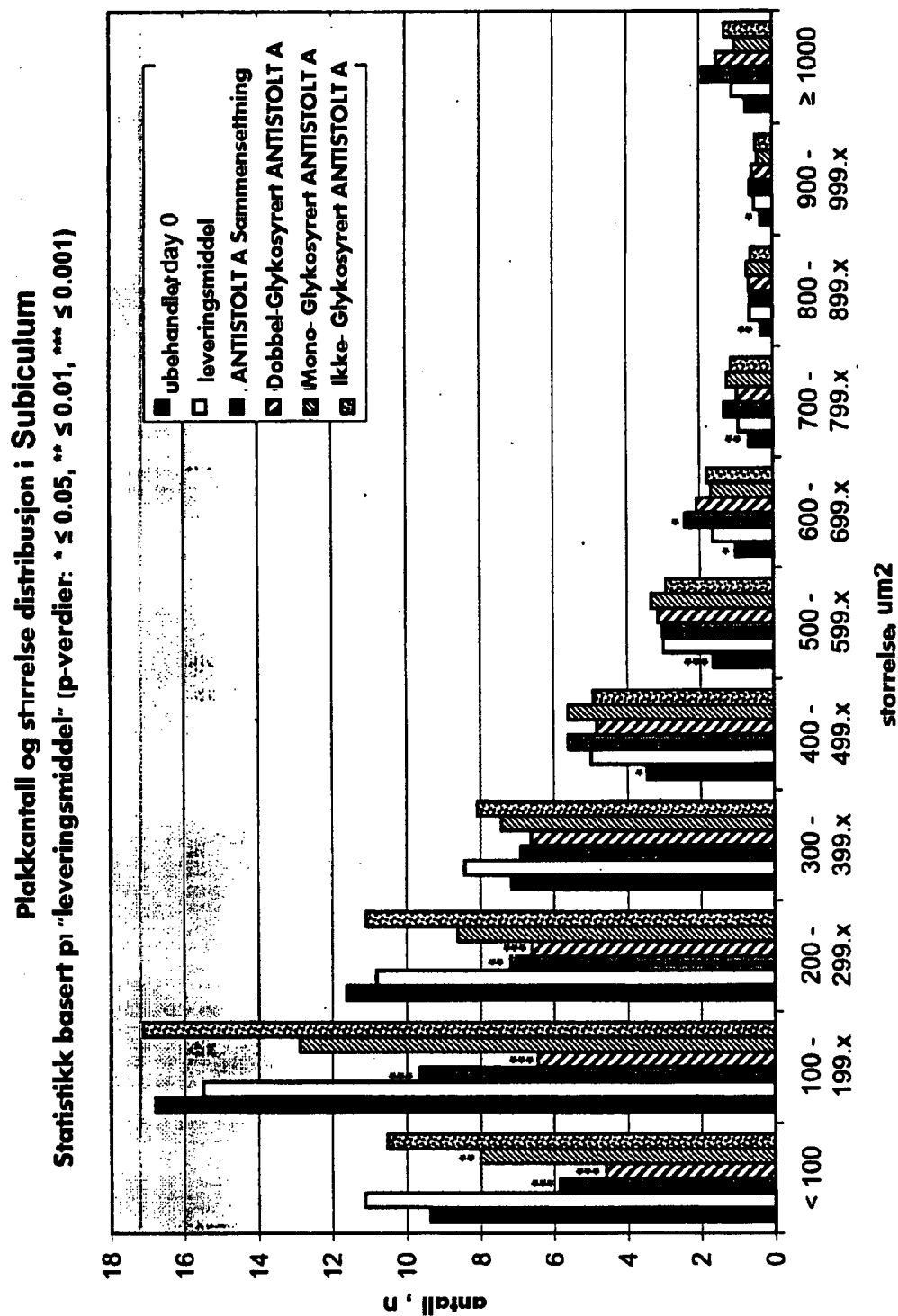
29/40

Plakk antall i Subiculum

Statistikk basert på "leveringsmiddel" (p-verdier: * ≤ 0.05 , ** ≤ 0.01 , *** ≤ 0.001)

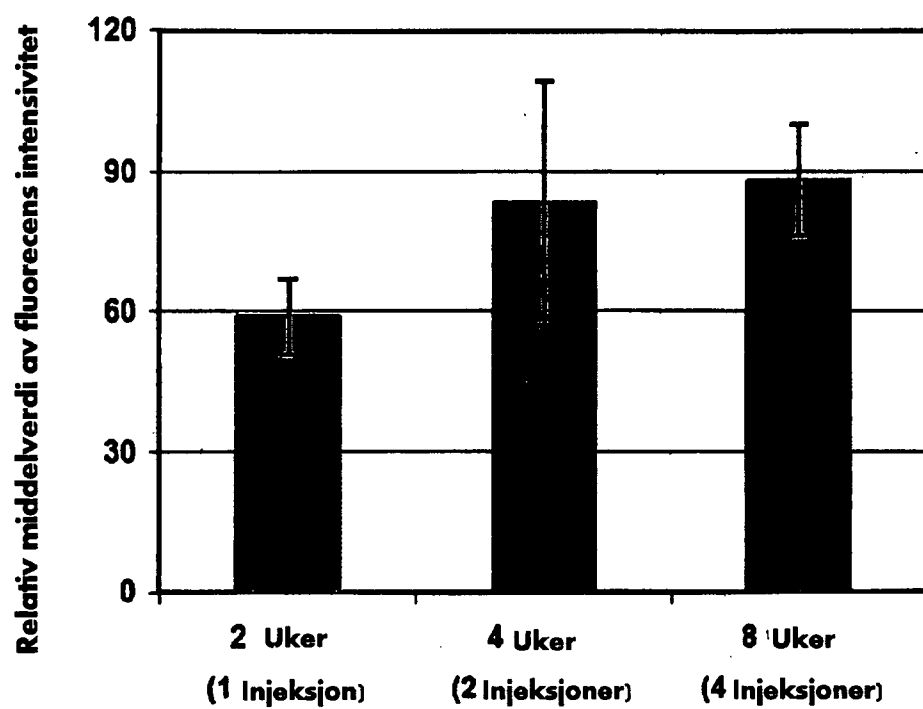
Figur 18B

30/40



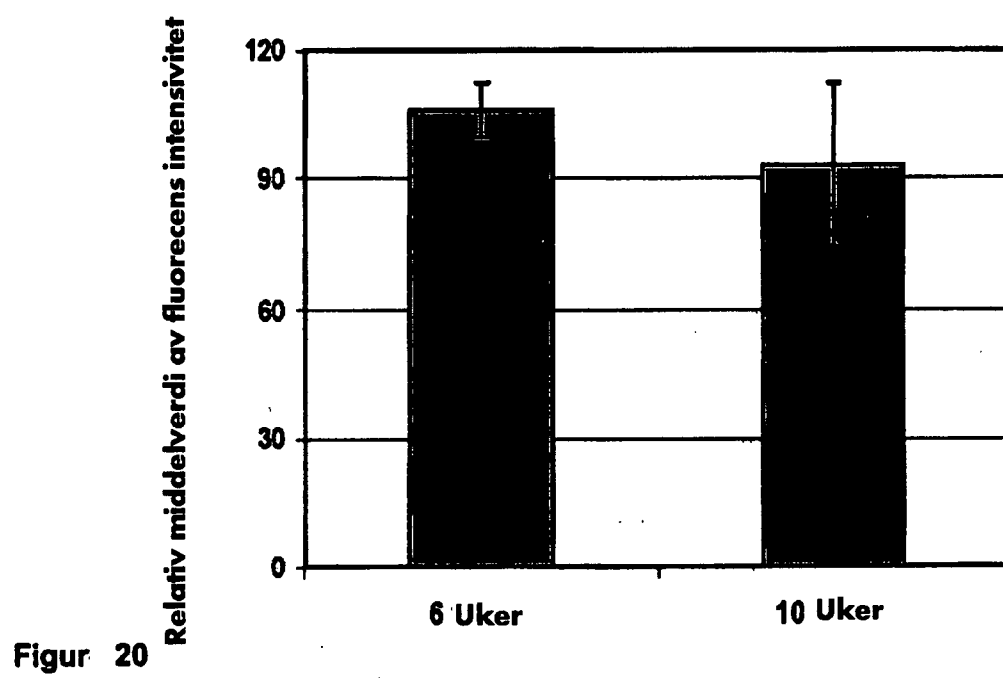
Figur 18C

31/40

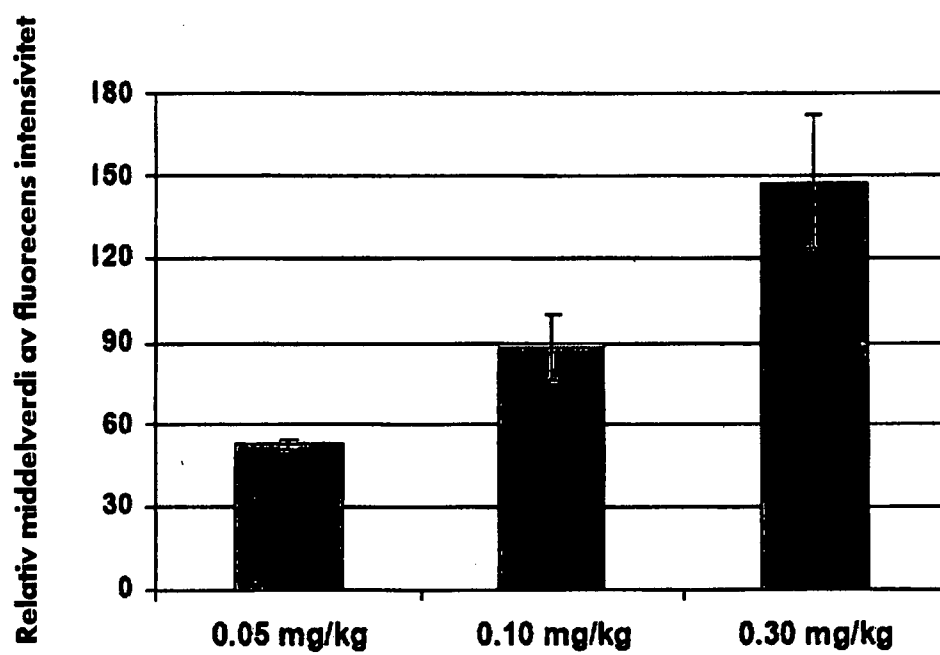


Figur 19

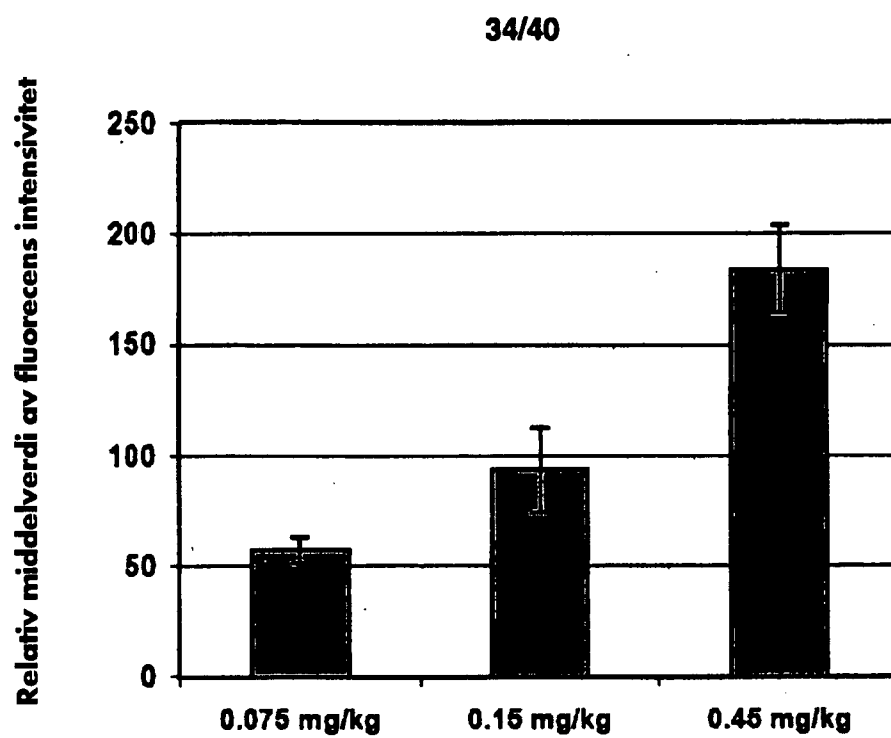
32/40



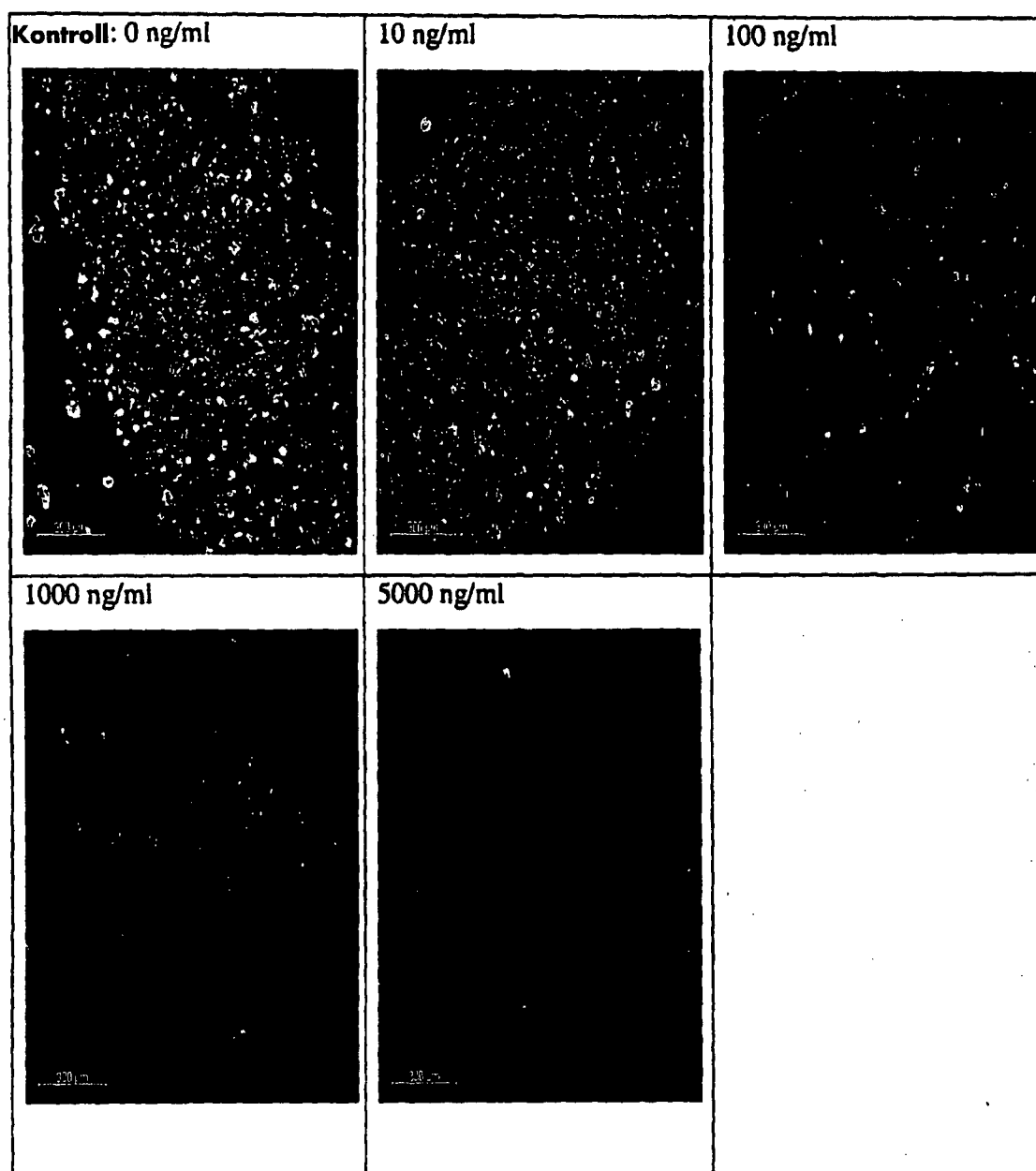
33/40



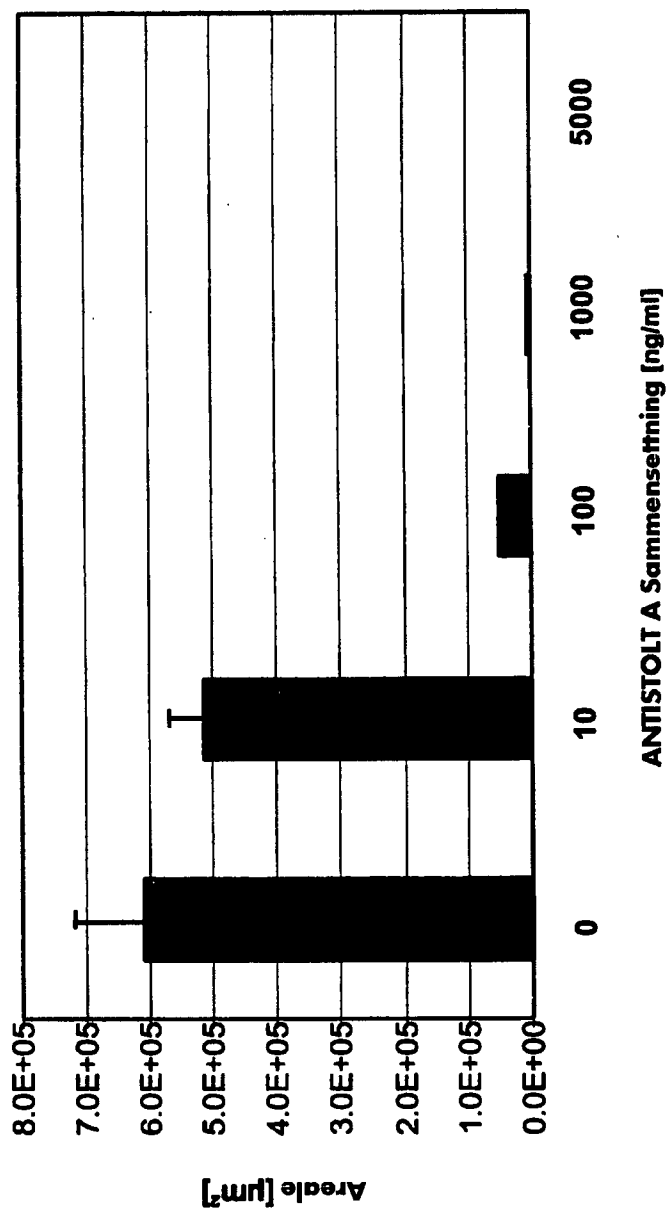
Figur 21

**Figur 22**

35/40

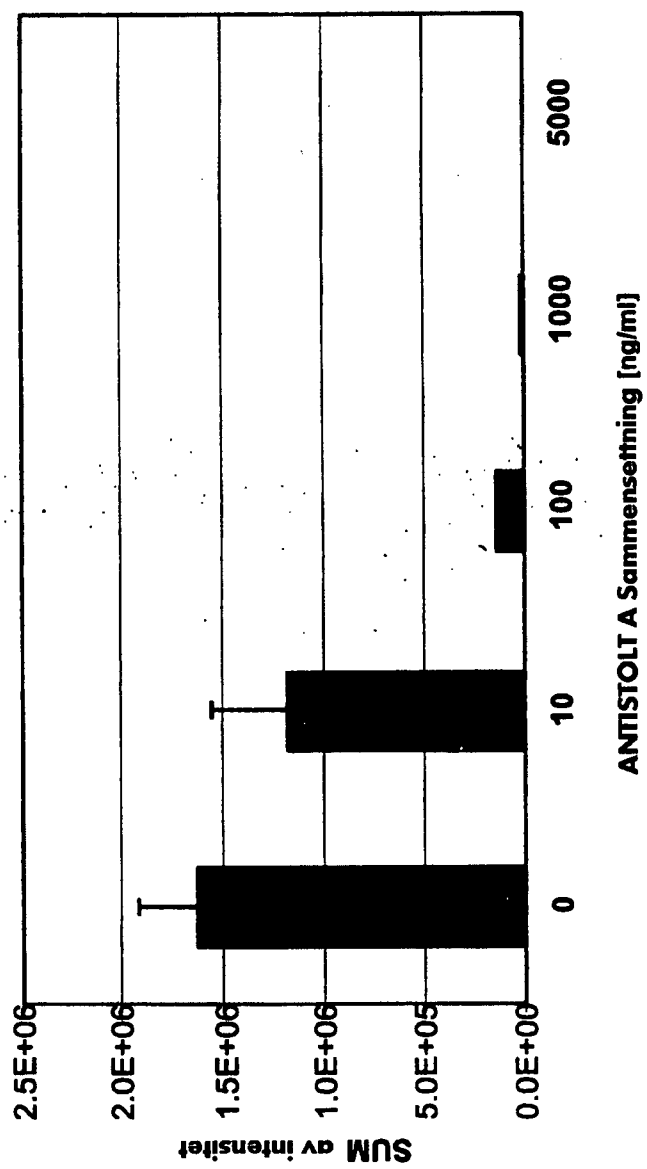
**Figur 23**

36/40



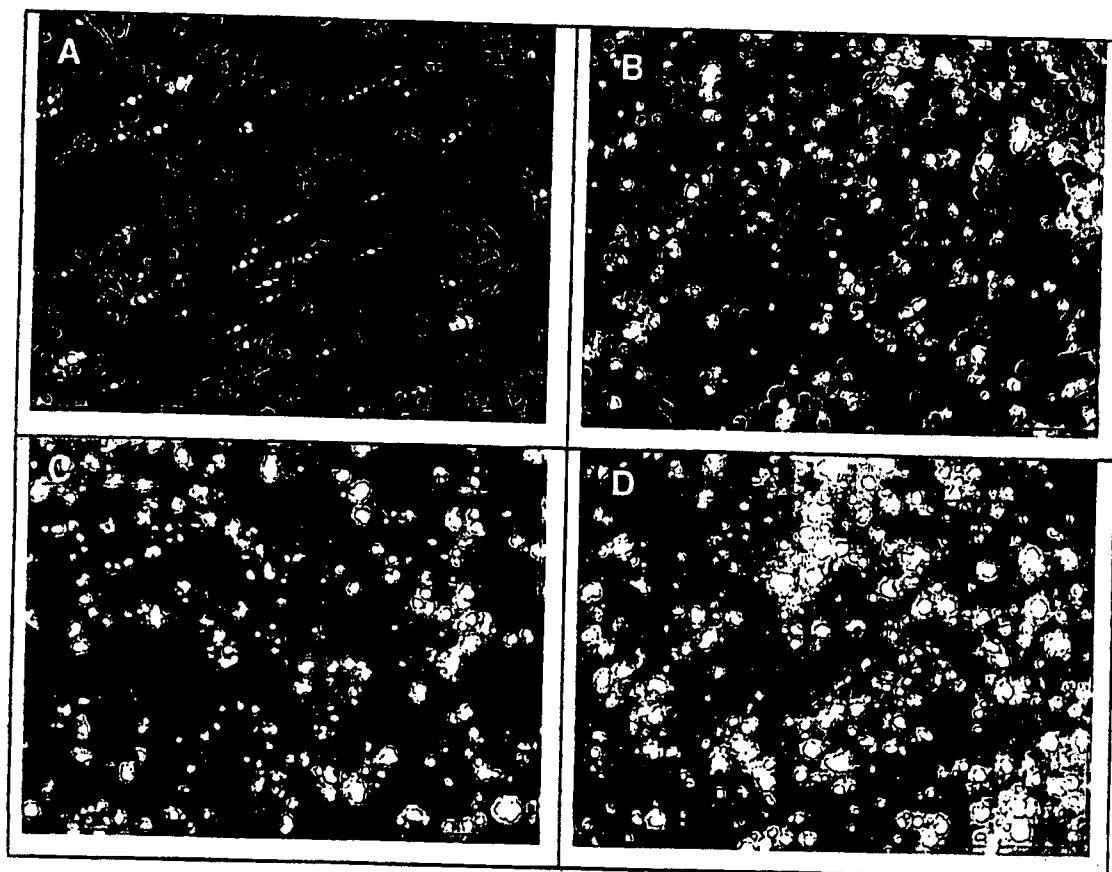
Figur 24A

37/40

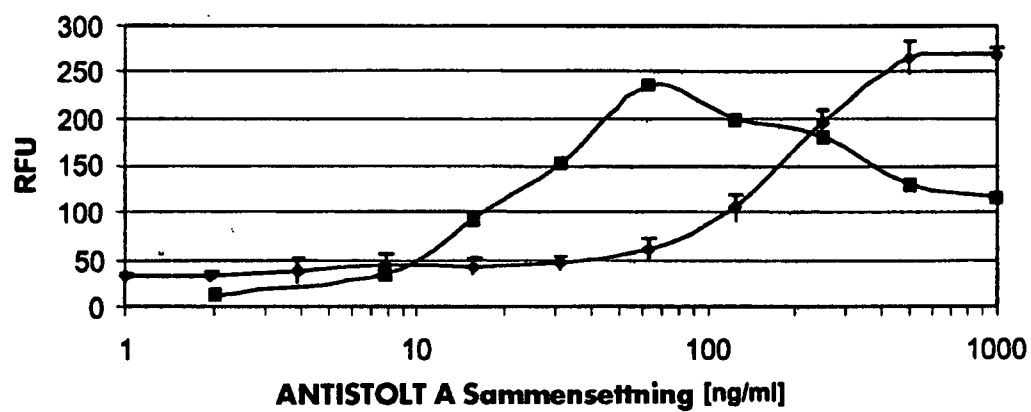


Figur 24B

38/40

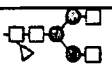
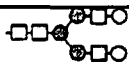
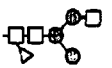
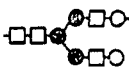
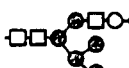
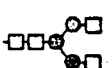
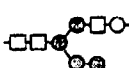
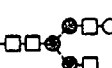
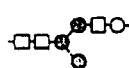
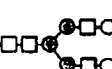
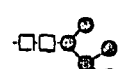
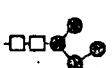
**Figure 25**

39/40

P388 Celler + Abeta fluor kuler

Figur 26

40/40

Navn	Struktur ¹⁾	Navn ²⁾	Struktur ¹⁾
Asn 306_G0		Asn 52_G2_0NANA-F	
Asn 306_G0-GlcNac		Asn 52_G2_1NANA-F	
Asn 306_G1		Asn 52_G2_2NANA-F	
Asn 306_G2		Asn 52_hyb_Man5_1NANA	
Asn 306_G0-F		Asn 52_hyb_Man4_1NANA	
Asn 306_G1-F		Asn 52_hyb_Man3_1NANA	
Asn 306_G2-F		Asn 52_Man5	
Asn 306_Man5			

1) Fucose , Mannose , N-Acetylglucosamine , Galactose , N-Acetylneuraminsyre 

2) "hyb" Angir hybridstrukturer

Figur 27