



(12) PATENT

(19) NO

(11) 339745

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20063624	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2005.01.10 PCT/US2005/00013
(22)	Inng.dag	2006.08.10	(85)	Videreføringsdag	2006.08.10
(24)	Løpedag	2005.01.10	(30)	Prioritet	2004.01.12, US, 60/535,764
(41)	Alm.tilgj	2006.10.03			
(45)	Meddelt	2017.01.30			
(73)	Innehaver	Mentrik Biotech, LLC, Two Lincoln Centre, 5420 LBJ Freeway, Suite 410, US-TX75240 DALLAS, USA David Matthew Marquis, 2106 Meadowgreen Court, US-CA92024 ENCINITAS, USA Jeffry Dean Watkins, 3442 Fortuna Ranch Road, US-CA92024 ENCINITAS, USA Barrett W Allan, 542 San Dieguito Drive, US-CA92024 ENCINITAS, USA Ying Tang, 7179 Park Village Road, US-CA92129 SAN DIEGO, USA			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Antistoff og farmasøytisk preparat.			
(56)	Anførte publikasjoner	WOLFENSTEIN-TODEL C. ET AL., "The amino acid sequence of heavy chain disease protein zuc. structure of the Fc fragment of immunoglobulin G3", Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 71, no. 4, 1976, side 907-914 US 2004002587 A1 US 6277375 B1			
(57)	Sammendrag				

Det beskrives polypeptid Fc-områdevarianter og oligonukleotider som koder Fc-områdevarianter. Spesifikt beskrives det preparater omfattende nye Fc-områdevarianter, metoder for å identifisere brukbare Fc-områdevarianter og videre metoder for å benytte Fc-områdevarianter for behandling av sykdommer.

Foreliggende oppfinnelse vedrører antistoff og farmasøytisk preparat.

Oppfinnelsens bakgrunn

Det finnes fem typer immunoglobuliner i mennesker. Disse grupper er kjent som IgG, IgM, IgD, IgA og IgE og atskilles basert på isotypene av tungkjedegenet (γ , μ , δ , α henholdsvis ϵ). Den mest kjente type er IgG og består av to identiske tungkjedepolypeptider og to identiske rettkjedepolypeptider (se fig. 1). De to tungkjeder er kovalent bundet til hverandre via disulfidbindinger og hver lettkjede er forbundet via en disulfidbinding (se fig. 1). Hver tungkjede inneholder rundt 445 aminosyrerester og hver lettkjede inneholder rundt 215 aminosyrerester.

Hver tunge kjede inneholder fire distinkte domener som er generelt angitt som variabelt domene (VH), konstant tungdomene 1 (CH1), konstant tungdomene 2 (CH2) og konstant tungdomene 3 (CH3) (se fig. 1). CH1- og CH2-domene er forbundet via et hengselområde (interdomenedeler) som gir Ig fleksibilitet. Hver lette kjede inneholder to distinkte domener som generelt angis som variabel lett (VL) og konstant lett (CL).

De variable områder av de tunge og lette kjeder binder direkte antigen og er ansvarlige for diversiteten og spesifisiteten for Ig'ene. Hver VL og VH har tre komplementaritetsbestemmende områder (CDR'er, også kjent som hypervariable områder). Når VL og VH kommer sammen via interaksjoner av tunge og lette kjeder, danner CDR'ene en bindingsoverflate som kommer i kontakt med antigenet.

Mens de variable områder er involvert i antigenbinding, er tungkjedekonstantdomener, primært CH2 og CH3, involvert i ikke-antigenbindingsfunksjoner. Dette området, generelt kjent som Fc-området, har mange viktige funksjoner. For eksempel binder Fc-området komplement, som kan utløse fagocytose eller komplementavhengig cytotoxicitet (CDC). Fc-området binder også Fc-reseptorer som kan utløse fagocytose eller antistoffavhengig, cellulær cytotoxicitet (ADCC). Fc-området spiller også en rolle ved å hjelpe til å opprettholde immunoglobulin i sirkulasjon og interagerer med protein A, som vanligvis benyttes for å rense immunoglobulin.

Det har i den senere tid vært gjort forsøk på å forbedre de immunogeniske kvaliteter og antigenbindingsegenskapene for antistoffer. For eksempel er det utviklet monoklonale, kimeriske og humaniserte antistoffer for immunterapi. Eksempler på antistoffer som er godkjent for human immunoterapi, og med den tilsvarende sykdom, inkluderer

RITUXAN (lymfom), SYNAGIS (infeksiøs sykdom), ZENEPAX (nyretransplantasjon), REMICADE (Crohn's sykdom og reumatoid artritt), HERCEPTIN (brystkarsinom) og EDRECOLOMAB (koloncancer). Imidlertid er det mange antistoffer som har gått inn i kliniske prøver, men som ikke har fått godkjenning på grunn av mangel på effektivitet eller andre assosierte problemer.

- Det som trengs og for å forbedre effektiviteten og godkjenneshastigheten for ytterligere terapeutiske antistoffer, er preparater og metoder for å endre Fc-områdene for å generere varierte polypeptider med forbedrede egenskaper.
- 10 Wolfenstein-Todel C. et al., "The amino acid sequence of heavy chain disease protein ZUC. Structure of the Fc fragment of immunoglobulin G3", Biochemical and Biophysical beskriver sekvensen til Fc fragmentet av humant IgG3 ved anvendelse av naturlig-forekommende $\gamma 3$ tungkjede variant (ZUC). Til tross for at molekylet er
- 15 deletert i det indre inneholder det 248 residier, inkludert hele Fc fragmentet. Den nesten hele sekvensen av C 2 og C 3 domener (posisjon 234 til 446) indikerer et ekstremt nære evolusjonsmessig forhold med $\gamma 1$ og $\gamma 4$ kjeder. Det er en 95% homologi mellom IgG3 og IgG1 og 92% mellom IgG3 og IgG4 i C 2 i C 3 domener.
- 20 US2004002587 A1 beskriver polypeptid Fc region varianter og oligonukleotider kodende for Fc region varianter, og deler derav. Spesielt refererer den til aminosyremodifikasjoner i posisjonene 280 og 290.
- US 6277375 B1 beskriver rekombinante vektorer kodende for immunoglobulin-lignende domener og deler derav, så som antistoff Fc-hengselsfragmenter, subfragmenter og mutante domener med utvidete biologiske halveringstider.

Oppsummering av oppfinnelsen

- 30 Foreliggende oppfinnelse vedrører følgende antistoff omfattende en variant av et opphavshuman-Fc-område eller en del derav, der varianten omfatter minst én aminosyresubstitusjon sammenlignet med opphavs-Fc-området, der aminosyresubstitusjonen er i posisjonen 247L, 247H og 247I av human-Fc-sekvensen.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre antistoff, idet minst én aminosyresubstitusjon i variant-Fc-området er 247L.

- 5 Foreliggende oppfinnelse vedrører videre antistoff idet minst én aminosyresubstitusjon i variant-Fc-området er 247H.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre antistoff idet minst én aminosyresubstitusjon i variant-Fc-området er 247I.

- 10 Foreliggende oppfinnelse vedrører videre antistoff idet det omfatter varianten av et opphavs-Fc-område som medierer antistoffavhengig, cellemediert cytotoksisitet (ADCC) i nærvær av effektorceller mer effektivt enn antistoffet omfattende opphavs-Fc-området.
- 15 Foreliggende oppfinnelse vedrører videre antistoff idet antistoffet omfattende variant-Fc-området, viser relative, ADCC-spesifikke aktivitetsverdier større enn 100 når antistoffet som omfatter opphavs-Fc-området, viser relativ ADCC-spesifikk aktivitet på 100 målt med samme analyse.
- 20 Foreliggende oppfinnelse vedrører videre antistoff idet antistoffet omfattende varianten av et opphavs-Fc-område, medierer komplementavhengig (CDC) mer effektivt enn antistoffet omfattende opphavs-Fc-området.

- 25 Foreliggende oppfinnelse vedrører videre antistoff idet antistoffet omfattende varianten av et opphavs-Fc-område, viser relative, CDC-spesifikke aktivitetsverdier mindre enn 100 når antistoffet omfattende opphavs-Fc-området, viser relative, CDC-spesifikke aktiviteter på 100 målt med samme analyse.

- 30 Foreliggende oppfinnelse vedrører videre antistoff idet opphavs-Fc-området er en klasse valgt fra gruppen bestående av IgG, IgM, IgA, IgD og IgE.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre antistoff idet opphavs-Fc-området er en underklasse valgt fra gruppen bestående av IgG1, IgG2, IgG3 og IgG4.

- 35 Foreliggende oppfinnelse vedrører videre antistoff idet antistoffet er et monoklonalt antistoff.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre antistoff idet antistoffet spesifikt binder human CD20.

- Det er videre beskrevet et monoklonalt antistoff som omfatter to identiske
5 tungkjedepolypeptider og to identiske lettkjedepolypeptider.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre farmasøytisk preparat, idet det omfatter et antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1-13.

- 10 I noen utførelsesformer er det gitt et peptid (inneholdende P247L-aminosyremodifikasjoner) omfattende sekvensen som vist i SEKV.ID. NR. 15. I andre utførelsesformer en nukleinsyresekvens som koder et CH2-område med P247L-modifikasjonen (for eksempel SEKV.ID. NR. 40). I noen utførelsesformer tilveiebringes en aminosyresekvens som koder et CH2-område med P247L-
15 modifikasjonen omfattende SEKV.ID. NR. 15. I visse utførelsesformer tilveiebringes et peptid (inneholdende A330K-modifikasjonen) med sekvensen som vist i SEKV.ID. NR. 16. I ytterligere utførelsesformer tilveiebringes en nukleinsyresekvens som koder et CH2-område med A330K-modifikasjonen (for eksempel SEKV.ID. NR. 41). I ytterligere utførelsesformer tilveiebringes en aminosyresekvens som koder et CH2-
20 område med A330K-modifikasjonen omfattende SEKV.ID. NR. 16.

- I noen utførelsesformer tilveiebringer oppfinnelsen preparater omfattende en variant (eller en nukleinsyresekvens som koder varianten) av et opphavspolypeptid med minst en andel av et Fc-område der varianten omfatter minst én aminosyremodifikasjon i
25 posisjon 247 i Fc-området valgt blant P247H, P247I og P247L.

- I noen utførelsesformer tilveiebringer foreliggende oppfinnelse preparater omfattende en variant av et opphavspolypeptid med minst en del av et Fc-område der varianten medierer antistoffavhengig, cellemediert cytotoksitet (ADCC) i nærvær av effektor-
30 celler mer effektivt enn opphavspolypeptidet og omfatter minst én aminosyre-modifikasjon i posisjon 247 i Fc-området. I andre utførelsesformer tilveiebringes metoder omfattende: a) å tilveiebringe i) et preparat omfattende en variant av et opphavspolypeptid med minst en andel av et Fc-område der varianten medierer antistoffavhengig, cellemediert cytotoksitet (ADCC) i nærvær av effektorceller mer
35 effektivt enn opphavspolypeptidet og omfatter minst én aminosyremodifikasjon i posisjon 247 i Fc-området og ii) et individ med ett eller flere symptomer på en sykdom;

og b) administrere preparatet til individet under betingelser slik at minst ett av symptomene reduseres. I spesielle utførelsesformer omfatter varianten et antistoff eller et immunoaderhin, og individet har symptomer på en antistoff- eller immunoaderhin-responsiv sykdom.

5

- I visse utførelsesformer omfatter varianten minst en del av Fc-området (for eksempel 40 %, 50 %, 60 %, 80 % eller 90 % eller mer av et Fc-område inneholdende aminosyremodifikasjonen). I noen utførelsesformer omfatter polypeptidvariantene et CH2- eller CH3-område. I ytterligere utførelsesformer omfatter preparatene en
- 10 aminosyresekvens omfattende SEKV.ID. NR. 13. I noen utførelsesformer omfatter preparatene en aminosyresekvens omfattende SEKV.ID. NR. 14. I noen utførelsesformer omfatter preparatene en aminosyresekvens omfattende SEKV.ID. NR. 15. I visse utførelsesformer omfatter preparatene en nukleinsyresekvens omfattende SEKV.ID. NR. 38 og/eller SEKV.ID. NR. 39 og/eller SEKV.ID. NR. 40 eller
- 15 komplementet derav eller sekvenser som binder til SEKV.ID. NR. 38, 39 eller 40 under betingelser med høy stringens. I ytterligere utførelsesformer tilveiebringes vertsceller (for eksempel CHO-celler) og vektorer omfattende SEKV.ID. NR. 38 og/eller SEKV.ID. NR. 39 og eller SEKV.ID. NR. 40. I spesielle utførelsesformer tilveiebringes et computeravlesbart medium, der dette koder en representasjon av SEKV.ID. NR. 13,
- 20 14, 15, 38, 39 eller 40.

- I visse utførelsesformer medierer polypeptidvarianten antistoffavhengig, cellemediert cytotoxicitet (ADCC) i nærvær av effektorceller mer effektivt enn opphavspolypeptidet. I noen utførelsesformer omfatter polypeptidvarianten et antistoff eller anti-
- 25 stofffragment (for eksempel polyklont antistoff, monoklont antistoff, kimerisk antistoff, humanisert antistoff eller Fc-fragment). I noen utførelsesformer omfatter opphavspolypeptidet et human-IgG Fc-område. I ytterligere utførelsesformer omfatter opphavspolypeptidet et human IgG1-, IgG2-, IgG3- eller IgG4-Fc-område. I andre utførelsesformer omfatter opphavspolypeptidet en aminosyresekvens valgt blant
- 30 SEKV.ID. NR. 1-12.

- I foretrukne utførelsesformer er aminosyremodifikasjonen P247H, P247I eller P247L. I visse utførelsesformer omfatter polypeptidvarianten en andre, tredje, fjerde og så videre aminosyremodifikasjon i Fc-området (se for eksempel tabell 1). I noen utførelsesformer
- 35 er varianten et CHO-uttrykt polypeptid.

I visse utførelsesformer omfatter varianten minst en del av Fc-området (for eksempel 40 %, 50 %, 60 %, 80 % eller 90 % eller mer av et Fc-område inneholdende aminosyremodifikasjonen). I noen utførelsesformer omfatter polypeptidvariantene et CH2- eller CH3-område. I ytterligere utførelsesformer omfatter preparatene en

5 aminosyresekvens omfattende SEKV.ID. NR. 31. I visse utførelsesformer omfatter preparatene en nukleinsyresekvens omfattende SEKV.ID. NR. 56, eller komplementet derav eller sekvenser som binder til SEKV.ID. NR. 56 under betingelser med høy stringens. I ytterligere utførelsesformer tilveiebringes vertsceller (for eksempel CHO-celler) og vektorer omfattende SEKV.ID. NR. 56. I spesielle utførelsesformer

10 tilveiebringes et computeravlesbart medium, der dette koder en representasjon av SEKV.ID. NR. 31 eller 56.

I visse utførelsesformer medierer polypeptidvarianten utarming av målceller i en full-blodanalyse mer effektivt enn opphavspolypeptidet. I noen utførelsesformer omfatter

15 polypeptidvarianten et antistoff eller antistofffragment (for eksempel polyklont antistoff, monoklont antistoff, kimerisk antistoff, humanisert antistoff eller Fc-fragment). I noen utførelsesformer omfatter opphavspolypeptidet et human-IgG Fc-område. I ytterligere utførelsesformer omfatter opphavspolypeptidet et human IgG1-, IgG2-, IgG3- eller IgG4-Fc-område. I andre utførelsesformer omfatter opphavspolypeptidet en aminosyresekvens valgt blant SEKV.ID. NR. 1-12.

20

I visse utførelsesformer blir variantene ifølge oppfinnelsen og nukleinsyresekvensene som koder variantene, tilveiebrakt med minst én annen komponent i et sett. For eksempel kan et slikt sett eller et kit omfattende minst én varianttype og skrevne

25 instruksjoner for bruk av varianten. Settet kan også inneholde buffere og andre brukbare reagenser.

I visse utførelsesformer tilveiebringes metoder omfattende: a) å tilveiebringe i) celler som uttrykker målantigen (CD20, for eksempel), ii) et preparat omfattende en variant av

30 et opphavspolypeptid med minst en del av et Fc-område, der varianten omfatter minst én aminosyremodifikasjon i Fc-området, og iii) effektorceller (anrikede PBMC'er fra én eller flere humane donorer, som eksempel) og b) å bringe målcellene i kontakt med preparatet og effektorcellene under betingelser slik at varianten binder til målcellene (for eksempel via en ligand uttrykt på celleoverflaten) og c) å måle avlivingen av

35 målceller (for eksempel frigivning av LDH eller krom 51).

I noen utførelsesformer tilveiebringes metoder for å identifisere dualspesiesforbedrede varianter omfattende: a) å tilveiebringe i) målceller, ii) preparat omfattende en kandidatvariant av et opphavspolypeptid med et Fc-område, der kandidatvarianten omfatter minst én aminosyremodifikasjon i Fc-området, og der kandidatvarianten medierer målcellecytotoksisitet i nærvær av en første spesies av effektorceller mer effektivt enn opphavspolypeptidet, og iii) andre spesieseffektorceller, og b) å inkubere preparatet med målcellene under betingelser slik at kandidatvarianten binder målcellene og derved genererer kandidatvariantbundne målceller, c) å blande de andre spesieseffektorceller med kandidatvariantbundne målceller, d) å måle målcellecytotoksisiteten (for eksempel mediert av kandidatvarianten), e) å bestemme hvorvidt kandidatvarianten medierer målcellecytotoksisitet i nærvær av andre spesieseffektorcellene mer effektivt enn opphavspolypeptidet. I noen utførelsesformer omfatter metoden videre screening av opphavspolypeptidet på samme måte med de andre spesieseffektorcellene. I ytterligere utførelsesformer blir trinnene b) og c) gjennomført samtidig. I spesielle utførelsesformer omfatter metoden videre trinn f) for identifisering av en kandidatvariant som dualspesiesforbedret variant som medierer målcellecytotoksisitet i nærvær av de andre spesieseffektorcellene mer effektivt enn opphavspolypeptidet. I andre utførelsesformer omfatter metoden videre trinn f) for identifisering av en kandidatvariant som en dualspesiesforbedret variant som medierer målcellecytotoksisitet i nærvær av andre spesieseffektorceller rundt 1,2 ganger (eller rundt 1,5 ganger, 5 ganger eller rundt 10 ganger) mer effektivt enn opphavspolypeptidet (for eksempel observeres rundt 1,2 ganger mer målcellelysering).

I andre utførelsesformer tilveiebringes metoder for å identifisere dualspesiesforbedrede varianter omfattende: a) å tilveiebringe i) målceller, ii) et preparat omfattende en kandidatvariant av et opphavspolypeptid med et Fc-område, der kandidatvarianten omfatter minst én aminosyremodifikasjon i Fc-området, og iii) første spesieseffektorceller, og iv) andre spesieseffektorceller, og b) å inkubere preparatet med målcellene under betingelser slik at kandidatvarianten binder målcellene og derved genererer kandidatvariantbundne målceller, c) å blande de første spesieseffektorceller med kandidatvariantbundne målceller, d) å måle målcellecytotoksisiteten (for eksempel mediert av kandidatvarianten), e) å bestemme at kandidatvarianten medierer målcellecytotoksisitet i nærvær av første spesieseffektorcellene mer effektivt enn opphavspolypeptidet, og f) å blande andre spesieseffektorcellene med de kandidatvariantbundne målceller (for eksempel som generert i trinn b), g) å måle målcellecytotoksisiteten (for eksempel mediert av kandidatvarianten), h) å bestemme hvorvidt kandidatvarianten

medierer målcellecytotoksisitet i nærvær av andre spesieseffektorcellene mer effektivt enn opphavspolypeptidet.

I spesielle utførelsesformer omfatter metoden videre et trinn for å bestemme evnen hos opphavspolypeptidet til å mediere målcellecytotoksisitet i nærvær av den første og/eller den andre spesies. For eksempel kan metoden videre omfatte blanding av de første og andre spesieseffektorcellene med opphavspolypeptidbundne målceller og så å måle målcellecytotoksisiteten (for eksempel å bestemme en verdi slik at det er en verdi variantene kan sammenlignes mot).

10

I visse utførelsesformer omfatter metoden videre trinn g) for administrering av den dualspesiesforbedrede variant til et testdyr, der testdyret er et medlem av den andre spesies. I andre utførelsesformer omfatter metoden videre, før trinn a), et trinn med screening av kandidatvarianten i en Fc-reseptor(FcR)-bindingsanalyse. I visse utførelsesformer er FcR-bindingsanalysen en Fc-neonatal reseptor(FcRn)-bindingsanalyse.

15

I visse utførelsesformer omfatter metoden videre, før trinn a), et trinn med screening av kandidatvarianten i en CDC-analyse (se for eksempel del IV nedenfor). I noen utførelsesformer er de første spesies av effektorceller humanperiferblodmononukleære celler (PBMC'er). I andre utførelsesformer er de første spesies av effektorceller muse-PBMC'er eller rotte-PBMC'er. I visse utførelsesformer er de andre spesies av effektorceller muse-PBMC'er eller rotte-PBMC'er. I spesielle utførelsesformer er de andre spesies av effektorceller human PBMC'er.

25

Det er videre mulig å tilveiebringe fremgangsmåter for å identifisere dualspesiesforbedrede varianter omfattende: a) å tilveiebringe i) et preparat omfattende en kandidatvariant av et opphavspolypeptid med et Fc-område, der kandidatvarianten omfatter minst én aminosyremodifikasjon i Fc-området, og der kandidatvarianten medierer CDC mer effektivt enn opphavspolypeptidet, og iii) en andre spesieskilde av komplement, og b) inkubering av preparatet med de andre komplementspesies; og c) å bestemme hvorvidt kandidatvarianten medierer CDC mer effektivt enn opphavspolypeptidet. I visse utførelsesformer omfatter fremgangsmåten videre trinn d) for identifisering av en kandidatvariant som en dualspesiesforbedret variant.

35

I visse utførelsesformer er målcellene humane celler (for eksempel som overuttrykker ett eller flere av de følgende tumorassosierte antigener: CD20, CD22, CD33, CD40, CD63, EGF-reseptor, her-2-reseptor, prostataspesifikk membranantigen, Lewis Y-karbohydrat, GD₂- og GD₃-gangliosider, lamp-1, CO-029, L6 og ephA2). I visse

5 utførelsesformer omfatter varianten et antistoff eller en del derav, spesifikk for målcellene. I andre utførelsesformer medierer kandidatvariantene målcellecytotoksitet i nærvær av de første spesies av effektorceller rundt 1,2 ganger mer effektivt enn opphavspolypeptidet. I noen utførelsesformer omfatter trinn e) gjennomføring av en kontrollreaksjon med opphavspolypeptidet. I ytterligere utførelsesformer omfatter

10 målingen kvantitering av målcelledød eller målcellelysering. I andre utførelsesformer er målcellene infisert med virus (for eksempel HIV, CMV, hepatitt B eller RSV), eller mikrobielle organismer (for eksempel Staphylococcus, Streptococcus, Pseudomonas og så videre). I visse utførelsesformer er målcellene mikrobielle organismer (for eksempel Staphylococcus, Streptococcus, Pseudomonas og så videre). I noen utførelsesformer er

15 målcellene erstattet med virus (for eksempel HIV, CMV, hepatitt B eller RSV).

I noen utførelsesformer tilveiebringes preparater omfattende et polypeptid, der polypeptidet omfatter: i) et ikke-modifisert, humant rammeverk (for eksempel er ingen endringer foretatt på et naturlig forekommende, humant rammeverk, og ii) et variant Fc-

20 område. I visse utførelsesformer er det ikke-modifiserte, humane rammeverk et humant germelinrammeverk. I andre utførelsesformer tilveiebringes preparater omfattende et polypeptid der polypeptidet omfatter: i) minst én randomisert CDR-sekvens og ii) et variant Fc-område. I ytterligere utførelsesformer tilveiebringer oppfinnelsen preparater omfattende et polypeptid der polypeptidet omfatter: i) et ikke-modifisert, humant

25 rammeverk (for eksempel humant germelinrammeverk), ii) minst én randomisert CDR-sekvens, og iii) et variant Fc-område.

Beskrivelse av figurene

Figur 1 viser en skjematisk presentasjon av et IgG-molekyl med de forskjellige områder

30 og seksjoner merket.

Figur 2 viser en innretning av forskjellige parentale Fc-aminosyresekvenser inkludert human IgG1 (med ikke en SEKV.ID. NR. 1 og en allotype vist), human IgG2 (SEKV.ID. NR. 2), human IgG3 (SEKV.ID. NR. 3), human IgG4 (SEKV.ID. NR. 4),

35 murin IgG1 (SEKV.ID. NR. 5), murin IgG2A (SEKV.ID. NR. 6), murin IgG2B (SEKV.ID. NR. 7) og murin IgG3 (SEKV.ID. NR. 8).

Figur 3 viser forskjellige aminosyresekvenser, inkludert CH2-området (SEKV.ID. NR. 9) og CH3-området (SEKV.ID. NR. 10) av human IgG1, så vel som en f-allotyp (SEKV.ID. NR. 11) og en z-allotyp (SEKV.ID. NR. 12) sekvenser av human IgG1 som inkluderer CH1-, hengsel-, CH2- og CH3-områdene.

5

Figur 4 viser de endrede aminosyresekvenser av variantene innen konteksten av lokale, omgivende sekvenser.

Figur 5 viser nukleotidsekvenser som koder parentale polypeptider.

10

Figur 6 viser de endrede nukleinsyresekvenser av variantene i konteksten av lokal-omgivende nukleinsyresekvenser.

Figur 7A viser resultatene av en ADCC-analyse som sammenligner villtype Fc-området med A330K, A330R, I332E og kombinasjonen av mutasjoner ved både posisjoner 330 og 332.

Figur 7B viser resultatene av en ADCC-analyse omfattende Fc-områdeaminosyre-variantene I332D og I332E til Fc-området glycanmodifiseringsvariant 33 (GnTIII) og effekten av aminosyre pluss glycanmodifikasjon 33 (I332E + GnTIII) på ADCC-aktiviteten.

20

Figur 8 viser representative ADCC-data oppnådd ved bruk av rensset variant IgG.

Figur 9 viser ADCC-aktiviteter av variabelområdevarianter med lav affinitet (6F1) og relativt høy affinitet (33 og 5) til CD20-antigen mot Wil-2 (A) eller SKW6.4 (B) målcellelinjer.

25

Figur 10 viser titreringskurven av FcγRI-binding til Fc-områdevariant IgG.

30

Figurene 11A, B og C viser representative CDC-data oppnådd fra titrering av Fc-områdevarianter ved bruk av humankomplement og Ramos-målceller.

Figur 12 viser representativ B-celleutarming med AME-133 (variabelt området 33 med I332E Fc-variantsekvensen), Rituxan og ikke-spesifikk IgG ved bruk av en fullblodprøve inneholdende VV(høy affinitet)-genotypen av FcγRIIIa-reseptoren.

35

Figur 13 viser representativ B-celleutarming med AME-133 (variabelt område 33 med I332E Fc-variantsekvensen), Rituxan og ikke-spesifikk IgG ved bruk av en fullblodprøve inneholdende FF(lavaffinitet)-genotypen av FcγRIIIa-reseptoren.

- 5 Figur 14 viser representativ B-cellutarming med Rituxan, ikke-spesifikk IgG og med varianter av A378D og T256P, I332E ved bruk av en fullblodprøve.

Figur 15 viser aminosyresekvensen av de lette (SEKV.ID. NR. 57) og de tunge (SEKV.ID. NR. 58) kjeder av AME-133 (variabelt område 33 med I332E Fc-variantsekvensen).

Figur 16 viser nukleotidsekvensen av de lette (SEKV.ID. NR. 59) og de tunge (SEKV.ID. NR. 60) kjeder av AME-133 (variabelt område 33 med I332E Fc-variantsekvensen).

15

Definisjoner

For å lette en forståelse av oppfinnelsen er et antall termer definert nedenfor.

20 Som benyttet her henviser uttrykkene "individ" og "pasient" til et hvilket som helst dyr som et pattedyr som en hund, katt, fugl, husdyr, og fortrinnsvis et menneske (for eksempel et menneske med en sykdom).

Som benyttet her henviser uttrykkene "nukleinsyremolekyl som koder", "DNA-sekvens som koder" og "DNA som koder" til rekkefølgen eller sekvensen av deoksyribonukleotider langs en tråd av deoksyribonukleinsyre. Rekkefølgen av disse deoksyribonukleotider bestemmer rekkefølgen av aminosyrer langs polypeptid(protein)-kjeden. DNA-sekvensen koder således for aminosyresekvensen.

30 DNA-molekyler sies å ha "5'-ender" og "3'-ender" fordi mononukleotider omsettes for å gi oligonukleotider eller polynukleotider på en måte slik at 5'-fosfat av én mononukleotidpentosering er festet til 3'-oksygenet av naboen i en retning via en fosfodiesterbinding. Derfor er en ende av et oligonukleotid eller polynukleotid angitt som "5'-enden" hvis 5'-fosfatet ikke er bundet til 3'-oksygenet av en mononukleotidpentosering og som "3'-enden" hvis 3'-oksygenet ikke er bundet til et 5'-fosfat av en subsekvent mononukleotidpentosering. Som angitt her kan en nukleinsyresekvens, selv om den er 35 integral til en større oligonukleotid eller polynukleotid, også sies å ha 5'- og 3'-ender. I

- lineære eller sirkulære DNA-molekyler er diskrete elementer angitt som "oppstrøms" eller 5' av en "nedstrøms" eller 3'-elementer. Denne terminologi reflekterer det faktum at transkripsjonen skjer i en 5' → 3'-modus langs DNA-tråden. Promoter- og enhancer-elementer som styrer transkripsjonen av et linket gen, er generelt lokalisert 5' eller oppstrøms det kodende området. Imidlertid kan enhancerelementer utøve sin effekt selv når de er lokalisert 3' av promoterelementet og det kodende området. Transkripsjons-terminerings- og polyadenyleringssignaler er lokalisert 3' eller nedstrøms det kodende området.
- 10 Som benyttet her henviser uttrykkene "kodon" eller "triplett" til en tuplet av tre nabonukleotidmonomerer som spesifiserer én av de tjue naturlig forekommende aminosyrer som finnes i polypeptidbiosyntesen. Uttrykket inkluderer også ikke-sens kodoner som ikke spesifiserer noen aminosyre.
- 15 Som benyttet her betyr uttrykkene "et oligonukleotid med en nukleotidsekvens som koder et polypeptid", "polynukleotid med en nukleotidsekvens som koder et polypeptid", og "nukleinsyresekvens som koder et polypeptid", en nukleinsyresekvens omfattende det kodende området av et spesielt polypeptid. Det kodende området kan være til stede i en cDNA-, genomisk DNA- eller RNA-form. Hvis nærværet er i DNA-
- 20 form, kan oligonukleotidet eller polynukleotidet være enkelttrådet (det vil si senstråd) eller dobbelttrådet. Egnede kontrollelementer som enhancere/promotere, spleisingsforbindelser, polyadenyleringssignaler og så videre, kan anbringes i nærhet til det kodende området av genet hvis nødvendig for å tillate riktig initiering av transkripsjon og/eller korrekt prosessering av det primære RNA-transkript. Alternativt kan det
- 25 kodende området som benyttes i ekspresjonsvektorene ifølge oppfinnelsen, inneholde endoge enhancere/promotere, spleisingsforbindelser, intervenserende sekvenser, polyadenyleringssignaler og så videre, eller en kombinasjon av både endogene og eksogene kontrollelementer.
- 30 Som benyttet her benyttes uttrykkene "komplementær" eller "komplementaritet" under henvisning til polynukleotider (det vil si en sekvens av nukleotider) som henger sammen ved baseparingsreglene. For eksempel er sekvensen "A-G-T" komplementær til sekvensen "T-C-A". Komplementariteten kan være "partiell" der kun noen av nukleinsyrenes baser er tilpasset i henhold til baseparingsreglene. Det kan videre være "full-
- 35 stendig" eller "total" komplementaritet mellom nukleinsyrene. Graden av komplementaritet mellom nukleinsyretråder har signifikante effekter på effektiviteten og styrken for

hybridisering mellom nukleinsyretråder. Dette er av spesiell betydning i forsterkningsreaksjoner, så vel som detekteringsmetoder som avhenger av binding mellom nukleinsyrer.

- 5 Som benyttet her blir uttrykket "komplementet av" en gitt sekvens benyttet under henvisning til sekvensen som er fullstendig komplementær til sekvensen over hele sin lengde. For eksempel er sekvensen A-G-T-A "komplementet" av sekvensen T-C-A-T.

- Uttrykket "homologi" (når det er i referanse til nukleinsyresekvenser) henviser til en
 10 grad av komplementaritet. Det kan være partiell homologi eller fullstendig homologi (det vil si identitet). En partielt komplementær sekvens er én som i det minste partielt inhiberer en fullstendig komplementær sekvens fra hybridisering til en målnukleinsyre og henvises til ved bruk av den funksjonelle term "i det vesentlige homolog". Uttrykket "inhibering av binding", benyttet under henvisning til nukleinsyrebinding, henviser til
 15 inhibering av binding forårsaket av konkurranse av homologe sekvenser for binding til en målsekvens. Inhibering av hybrideringen av den fullstendig komplementære sekvens til målsekvensen kan undersøkes ved bruk av hybridiseringsanalyse (Southern eller Northern blott, oppløsningshybridisering og lignende) under betingelser med lav stringens. En i det vesentlige homolog sekvens eller probe vil konkurrere med og
 20 inhibere bindingen (det vil si hybrideringen) av en fullstendig homolog sekvens til et mål under betingelser med lav stringens. Dette skal ikke si at betingelsene med lav stringens er slik at ikke-spesifikk binding er tillatt; lave stringensbetingelser krever at bindingen av to sekvenser til hverandre er en spesifikk (det vil si selektiv) interaksjon. Fraværet av ikke-spesifikk binding kan testes ved bruken av et andre mål som mangler
 25 selv en partiell grad av komplementaritet (for eksempel mindre enn rundt 30 % identitet); i fravær av ikke-spesifikk binding vil proben ikke hybridere til det andre ikke-komplementære mål.

- Den kjente teknikk ved godt at tallrike ekvivalente betingelser kan benyttes for å om-
 30 fatte lavstringensbetingelser; faktorer som lengden og arten (DNA, RNA, basesammensetning) av proben og arten av målet (DNA, RNA, basesammensetning, til stede i oppløsning i immobilisert og så videre) og konsentrasjonen av salter og andre komponenter (for eksempel nærværet eller fraværet av formamid, dekstransulfat, polyetylglykol) tas i betraktning og hybridiseringsoppløsningen kan varieres for å generere betingelser
 35 med lavstringenshybridisering forskjellig fra, men ekvivalent med, de ovenfor angitte betingelser. I tillegg kjenner teknikken betingelser som fremmer hybridisering under

betingelser med høy stringens (for eksempel å øke temperaturen ved hybrideringen og/eller vasketrinnene, bruken av formamid i hybridiseringsoppløsning og så videre).

- En nukleinsyresekvens (for eksempel som koder et variant Fc-område eller en del derav)
- 5 kan produsere multiple RNA-spesies som genereres ved differensialsplicing av primær-RNA-transkriptet. cDNA'er som spleisevarianter av det samme gen, vil inneholde områder av sekvensidentitet eller fullstendig homologi (som representerer nærværet av det samme exon eller en del av det samme exon eller begge cDNA'er) og områder med fullstendig ikke-identitet (for eksempel som representerer nærværet av
- 10 exon "A" på cDNA 1 der cDNA 2 inneholder exon "B" i stedet). Fordi de to cDNA'er inneholder områder med sekvensidentitet vil de begge hybridere til en probe avledet fra det totale gen eller deler av genet inneholdende sekvenser funnet på begge cDNA'er; de to spleisevarianter er derfor i det vesentlige homologe til en slik probe og til hverandre.
- 15 Benyttet under henvisning til en enkelttrådet nukleinsyresekvens henviser uttrykket "i det vesentlige homolog" til en hvilken som helst probe som kan hybridere (det vil si er komplementet av) den enkelttrådede nukleinsyresekvens under betingelser med lav stringens.
- 20 Som benyttet her benyttes uttrykket "hybridering" under henvisning til paringen av komplementære nukleinsyrer. Hybridering og hybridiseringsstyrke (det vil si styrken av forbindelsen mellom nukleinsyrene) påvirkes av faktorer som graden av komplementaritet mellom nukleinsyrene, stringensen ved de involverte betingelser, T_m -verdien for det dannede hybrid og G:C-forholdet i nukleinsyrene.
- 25 Som benyttet her benyttes uttrykket " T_m " i referanse til "smeltetemperaturen". Smeltetemperaturen er den temperatur ved hvilken en populasjon av dobbeltrådede nukleinsyremolekyler blir halvdissosiert til enkelttråder. En ligning for beregning av T_m for nukleinsyrer er vel kjent i teknikken. Som indikerte ved standard referanser kan et
- 30 enkelt estimat av T_m -verdien beregnes ved ligningen:

$$T_m = 81,5 + 0,41 (\% G + C),$$

- der en nukleinsyre er i vandig oppløsning ved 1 M NaCl (se for eksempel Anderson and
- 35 Young, Quantitative Filter Hybridization, in Nucleic Acid Hybridization [1985]). Andre referanser inkluderer mer sofistikerte beregninger som tar strukturelle så vel som

sekvenskarakteristika i betraktning for beregninger av T_m , og i enkelte tilfeller kan T_m bestemmes empirisk ved å begynne med beregnede T_m og så å teste små økninger eller reduksjoner av temperatur og å undersøke effekten på populasjonen av nukleinsyre-molekyler.

5

- Som benyttet her benyttes uttrykket "stringens" under henvisning til betingelsene for temperatur, ionestyrke og nærværet av andre forbindelser som organiske oppløsningsmidler, under hvilken nukleinsyrehybridering gjennomføres. Fagmannen på området vil erkjenne at "stringente" betingelser kan endres ved å variere parametrene som nettopp
- 10 beskrevet, enten individuelt eller i sammenheng. Med "høystringens"-betingelser vil nukleinsyrebasesparing inntre kun mellom nukleinsyrefragmenter som har høy frekvens av komplementære basesekvenser (for eksempel hybridisering under "høystringens"-betingelser kan inntre mellom homologer med rundt 85-100 % identitet, fortrinnsvis rundt 70-100 % identitet). Med medium stringensbetingelser vil nukleinsyrebases-
- 15 paringen inntre mellom nukleinsyrer mellom en intermediat frekvens av komplementære basesekvenser (for eksempel hybridisering under "middels stringens"-betingelser som kan inntre mellom homologer med rundt 50-70 % identitet). Således er betingelser med "svak" eller "lav" stringens ofte krevd med nukleinsyrer som er avledet fra organismer som er genetisk forskjellige da komplementaritetetsfrekvenssekvensene
- 20 vanligvis er mindre.

- "Høystringens"-betingelser, benyttet under henvisning til nukleinsyrehybridering, omfatter betingelser ekvivalent med binding eller hybridisering ved 42 °C i en oppløsning bestående av 5X SSPE (43,8 g/l NaCl, 6,9 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ og 1,85 g/l EDTA, pH
- 25 justert til 7,4 med NaOH), 0,5 % SDS, 5X Denhardt's reagens og 100 µg/ml denaturert laksesperma DNA, fulgt av vasking i en oppløsning omfattende 0,1X SSPE, 1,0 % SDS ved 42 °C når en probe med en lengde på 500 nukleotider benyttes.

- "Medium stringensbetingelser", benyttet under henvisning til nukleinsyrehybridering,
- 30 omfatter betingelser ekvivalent med binding eller hybridisering ved 42 °C i en oppløsning bestående av 5X SSPE (43,8 g/l NaCl, 6,9 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ og 1,85 g/l EDTA, pH regulert til 7,4 med NaOH), 0,5 % SDS, 5X Denhardt's reagens og 100 µg/ml denaturert laksesperma DNA, fulgt av vasking i en oppløsning omfattende 1,0X SSPE, 1,0 % SDS ved 42 °C når en probe med en lengde rundt 500 nukleotider benyttes.

35

"Lavstringensbetingelser" omfatter betingelser ekvivalent med binding eller hybridisering ved 42°C i en oppløsning bestående av 5X SSPE (43,8 g/l NaCl, 6,9 g/l NaH₂PO₄ H₂O og 1,85 g/l EDTA, pH regulert til 7,4 med NaOH), 0,1 % SDS, 5X Denhardt's reagens [50X Denhardt's inneholder pr. 500 ml: 5 g Ficoll (Type 400, Pharmacia), 5 g BSA (Fraction V; Sigma)] og 100 g/ml denaturert laksesperma DNA, fulgt av vasking i en oppløsning omfattende 5X SSPE, 0,1 % SDS ved 42 °C når en probe med en lengde rundt 500 nukleotider benyttes.

De følgende uttrykk benyttes for å beskrive sekvenssammenhengen mellom to eller flere polynukleotider: "referansesekvens", "sekvensidentitet" og "prosent sekvensidentitet". En "referansesekvens" er en definert sekvens som benyttes som en basis for en sekvenssammenligning; en referansesekvens kan være et undersett av en større sekvens, for eksempel som et segment av en full-lengde cDNA-sekvens som er gitt i en sekvensliste eller kan omfatte en fullstendig gensekvens. Generelt er en referansesekvens minst 20 nukleotider lang, hyppig minst 25 nukleotider lang og ofte minst 50 nukleotider lang (for eksempel kan en hvilken som helst av SEKV.ID. NR. 32-37 benyttes som referansesekvens). Fordi to polynukleotider hver kan (1) omfatte en sekvens (det vil si en del av den fullstendige polynukleotidsekvens) som er lik mellom de to polynukleotider og (2) videre omfatte en sekvens som er divergent mellom de to polynukleotider, blir sekvenssammenligninger mellom to (eller flere) polynukleotider typisk gjennomført ved sammenligning av sekvenser av de to polynukleotider over et "sammenligningsvindu" for å identifisere og å sammenligne lokale områder av sekvenslikhet. Et "sammenligningsvindu" som benyttet her, henviser til et konseptuelt segment på minst 20 på hverandre følgende nukleotidposisjoner der én polynukleotidsekvens kan sammenlignes med en referansesekvens på minst 20 på hverandre følgende nukleotider og der andelen av polynukleotidsekvens i sammenligningsvinduet kan omfatte addisjoner eller delesjoner (det vil si gap) på 20 % eller mindre, sammenlignet med referansesekvensen (som ikke omfatter addisjoner eller delesjoner) for optimal innretning av de to sekvenser. Optimal innretning av sekvenser for innretning i et sammenligningsvindu kan gjennomføres med den lokale homologialgoritme til Smith and Waterman [Smith and Waterman, "Adv. Appl. Math.", 2: 482 (1981)] med homologi-innretningsalgoritmen til Needleman and Wunsch [Needleman and Wunsch, "J. Mol. Biol.", 48:443 (1970)], ved søking for likhet ved metoden til Pearson and Lipman [Pearson and Lipman, "Proc. Natl. Acad. Sci.", (U.S.A.) 85:2444 (1988)], ved komputerte implementeringer av disse algoritmer (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA i the Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, "Genetics Computer

Group, 575 Science", Dr. Madison, Wis.) eller ved inspeksjon og den beste innretning (det vil si som resulterer i den høyeste prosent homologi over sammenligningsvinduet), generert ved de forskjellige metoder som velges. Uttrykket "sekvensidentitet" betyr at to polynukleotidsekvenser er identiske (det vil si på en nukleotid-for-nukleotidbasis) over sammenligningsvinduet. Uttrykket "prosent sekvensidentitet" beregnes ved sammenligning av to optimalt innrettede sekvenser over sammenligningsvinduet ved bestemmelse av antallet posisjoner på hvilke identiske nukleinbaser (for eksempel A, T, C, G, U eller I) inntreffer i begge sekvenser for å gi antallet tilpassede posisjoner, dividering av antallet tilpassede posisjoner med det totale antall posisjoner i sammenligningsvinduet (dvs. vinduets størrelse) og å multiplisere resultatet med 100 for å oppnå prosent sekvensidentitet. Sammenligningsvinduet som benyttet ifølge foreliggende søknad, er den totale lengde av den angitte referansesekvens (det vil si hvis SEKV.ID. NR. 33 angis som referansesekvens, er prosent sekvensidentitet sammenlignet over hele lengden av SEKV.ID. NR. 33).

Som benyttet her henviser uttrykket "probe" til en oligonukleotid (det vil si en sekvens av nukleotider), uansett om den opptrer naturlig som i et rensset restriksjonsdigest, eller er produsert syntetisk, rekombinant eller ved PCR-forsterking, det vil si i stand til hybridisering til et annet oligonukleotid av interesse. En probe kan være enkelttrådet eller dobbelttrådet. Prober er nyttige ved detektering, identifisering og isolering av spesielle gensekvenser. Det er tatt sikte på at en hvilken som helst probe som benyttes ifølge oppfinnelsen, kan merkes med et hvilket som helst "rapportørmolekyl", slik at det er detekterbart i et hvilket som helst detekteringssystem inkludert, men ikke begrenset til, enzym (for eksempel ELISA, så vel som enzybaserte, histokjemiske analyser), fluorescente, radioaktive og luminescente systemer. Det er ikke ment at oppfinnelsen skal begrenses til noe spesielt detekteringssystem eller -merkelapp.

Som benyttet her henviser uttrykket "polymerasekjedereaksjon" ("PCR") til den metode som er beskrevet i US 4 683 195, 4 683 202 og 4 965 188, herved ansett som del av beskrivelsen som beskriver en metode for å øke konsentrasjonen av et segment av en målsekvens i en blanding av genomisk DNA uten kloning eller rensing. Denne prosess for forsterkning av målsekvensen består av innføring av et stort overskudd av to oligonukleotidprimere til DNA-blandingen inneholdende den ønskede målsekvens, fulgt av en nøyaktig sekvens av termisk syklisering i nærvær av en DNA-polymerase. De to primere er komplementære til de respektive tråder i den dobbelttrådede målsekvens. For å bevirke forsterkning blir blandingen denaturert og primerne så ansluttet til sine

komplementære sekvenser innen mål-molekylet. Etter anneling blir primerne forlenget med en polymerase for å danne et nytt par av komplementære tråder. Trinnene med denaturering, primeranneling og polymeraseforlengelse kan gjentas mange ganger (det vil si denaturering, anneling og forlengelse utgjør én "syklus", og det kan være

5 tallrike "sykler") for å oppnå en høy konsentrasjon av et forsterket segment av ønsket målsekvens. Lengden av det forsterkede segment av den ønskede målsekvens bestemmes av de relative andeler av primerne med henblikk på hverandre og derfor er denne lengde en kontrollerbar parameter. På grunn av det repeterende aspekt ved prosessen angis metoden som "polymerasekjedereaksjon" (heretter "PCR"). Fordi de ønskede,

10 forsterkede segmenter av målsekvensen blir de dominante sekvenser (uttrykt ved konsentrasjon) i blandingen, sies de å være "PCR-forsterket".

Med PCR er det mulig å forsterke en enkelt kopi av en spesifikk målsekvens i genomisk DNA til et nivå som er detekterbart ved flere forskjellige metodologier (som hybridisering med en merket probe; innarbeiding av biotinylerte primere fulgt av avidinenzym-

15 konjugatdetektering; innkorporering av ^{32}P -merkede deoksynukleotidtrifosfater som dCTP eller dATP i det forsterkede segment). I tillegg til genomisk DNA kan hvilke som helst oligonukleotid- eller polynukleotidsekvenser forsterkes med det egnede sett av primermolekyler. Særlig er de forsterkede segmenter som dannes ved PCR, i seg selv

20 effektive templat for etterfølgende PCR-forsterkninger.

Uttrykket "isolert" benyttet i forbindelse med en nukleinsyre, som i "et isolert oligonukleotid" eller "isolert polynukleotid" henviser til en nukleinsyresekvens som er identifisert og separert fra minst én kontaminant nukleinsyre med hvilken den vanligvis

25 forbindes i sin naturlige kilde. Isolert nukleinsyre er til stede i en form eller i en omgivelse som er forskjellig fra den i hvilken den finnes i naturen. Isolerte nukleinsyremolekyler er derfor forskjellige fra nukleinsyremolekyler slik det eksisterer i naturlige celler. Imidlertid inkluderer et isolert nukleinsyremolekyl et nukleinsyremolekyl inneholdt i celler som vanligvis uttrykker polypeptider der for eksempel nukleinsyremolekyler er i en kromosomal lokasjon forskjellig fra de naturlige celler. Isolert

30 nukleinsyre, oligonukleotid eller polynukleotid kan være til stede i enkelttråd- eller dobbelttrådform. Når en isolert nukleinsyre, et isolert oligonukleotid eller polynukleotid skal benyttes for å uttrykke et protein, vil oligonukleotidet eller polynukleotidet inneholde som et minimum, en sens- eller kodende tråd (det vil si oligonukleotidet eller

35 polynukleotidet kan være enkelttrådet), men kan inneholde både sens- og antisens-trådene (det vil si at oligonukleotidet eller polynukleotidet kan være dobbelttrådet).

Som benyttet her henviser uttrykkene "del" benyttet under henvisning til en nukleotid-sekvens (som i "en del av en gitt nukleotidsekvens") til fragmenter av denne sekvens. Fragmentene kan variere i størrelse fra ti nukleotider til hele nukleotidsekvensen minus ett nukleotid (for eksempel 10 nukleotider, 20, 30, 40, 50, 100, 200 og så videre).

5

Som benyttet her henviser uttrykket "del" under henvisning til en aminosyresekvens (som i "en del av en gitt aminosyresekvens") til et fragment av denne sekvens. Fragmentene kan variere i størrelsesområde fra seks aminosyrer til hele aminosyresekvensen minus én aminosyre (for eksempel 6 aminosyrer, 10, 20, 30, 40, 75, 200 og så videre).

10

Som benyttet her henviser uttrykket "renset" eller "å rense" til fjerning av kontaminanter fra en prøve. For eksempel kan antigenspesifikke antistoffer renses ved fjerning av kontaminerende, ikke-immunoglobulinproteiner; de renses også ved fjerning av immunoglobulin som ikke binder til det samme antigen. Fjerning av ikke-immunoglobulinproteiner og/eller fjerning av immunoglobuliner som ikke binder til et spesielt antigen, resulterer i en økning av prosentandelen av antigenspesifikke immunoglobuliner i prøven. I et annet eksempel blir rekombinante, antigenspesifikke polypeptider uttrykt i bakterievertsceller og polypeptidene renses ved fjerning av vertscelleproteiner; prosent rekombinante, antigenspesifikke polypeptider økes derfor i prøven.

20

Uttrykket "rekombinant DNA-molekyl" som benyttet her, henviser til et DNA-molekyl som består av segmenter av DNA, forent ved hjelp av molekylære, biologiske teknologier.

25 Uttrykket "rekombinant protein" eller "rekombinant polypeptid" som benyttet her, henviser til et proteinmolekyl som uttrykkes fra et rekombinant DNA-molekyl.

Uttrykket "nativt protein" benyttes her for å indikere at et protein ikke inneholder aminosyrerester som koder for vektorsekvenser, det vil si at det native protein inneholder kun de aminosyrer som finnes i proteinet slik dette vanligvis opptrer i naturen. Et nativt protein kan fremstilles ved rekombinante midler eller kan isoleres fra en naturlig forekommende kilde.

35 Uttrykket "Southern blot" henviser til analyse av DNA på agarose- eller arkylamidgeler for å fraksjonere DNA i henhold til størrelse, fulgt av overføring av DNA fra gelen til en fast bærer som nitrocellulose eller en nylonmembran. Den immobiliserte DNA blir så

probet med en merket probe for å detektere DNA-spesies som er komplementære til den benyttede probe. Denne DNA kan spaltes med restriksjonsenzymmer før elektroforese. Etter elektroforese kan DNA partielt depurineres og denatureres før eller under overføring til den faste bærer. Southern blot er et standard verktøy for molekylærbiologer

5 (J. Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, NY, s 9.31-9.58 [1989]).

Uttrykket "Northern blot" som benyttet her, henviser til analyse av RNA ved elektroforese av RNA på agarosegel for å fraksjonere RNA i henhold til størrelse, fulgt av

10 overføring av RNA fra gelen til en fast bærer som nitrocellulose eller en nylon-membran. Den immobiliserte RNA blir så probet med en merket probe for å detektere RNA-spesies som er komplementære til den benyttede probe. Northern blot er et standardverktøy for molekylærbiologer (J. Sambrook, et al., supra, s 7.39-7.52 [1989]).

15 Uttrykket "Western blot" henviser til analyse av ett eller flere proteiner (eller polypeptider) som er immobilisert på en bærer som nitrocellulose eller en membran. Proteinene kjøres på akrylamidgeler for å separere proteinene, fulgt av overføring av proteinet fra gelen til en fast bærer som nitrocellulose eller en nylonmembran. De immobiliserte proteiner eksponeres deretter til antistoffer med reaktivitet mot et antigen

20 av interesse. Bindingen av antistoffene kan detekteres ved forskjellige metoder, inkludert bruken av radiomerkede antistoffer.

Uttrykket "antigenisk determinant" som benyttet her, henviser til den del av et antigen som gir kontakt med et spesielt antistoff (det vil si en epitop). Når et protein eller et

25 fragment av et protein benyttes for å immunisere et vertsdyr, kan tallrike områder av proteinet indusere produksjon av antistoffer som binder spesifikt til et gitt område eller en tredimensjonal struktur i proteinet; disse områder eller strukturer angis som antigeniske determinanter. En antigenisk determinant kan konkurrere med det intakte antigen (det vil si "immunogene" som benyttes for å utløse immunresponsen) for

30 binding til et antistoff.

Uttrykket "transgene" som benyttet her, henviser til et fremmed-, heterologt eller autologt gen som er plassert i en organisme ved innføring av genet i nyfertiliserte egg eller tidlige embryoer. Uttrykket "fremmed gen" henviser til en hvilken som helst nukleinsyre (for eksempel gensekvens) som innføres i genomet hos et dyr ved eksperimentell

35 manipulering og kan inkludere gensekvenser som finnes i dyret så lenge det innførte

gen ikke befinner seg på samme lokasjon som det naturlig forekommende gen. Uttrykket "autologt gen" er ment å omfatte varianter (for eksempel polymorfismer eller mutanter) av det naturlig forekommende gen. Uttrykket transgen omfatter således erstatning av det naturlig forekommende gen med en variant form av genet.

5

Som benyttet her blir uttrykket "vektor" benyttet under henvisning til nukleinsyremolekyler som overfører ett eller flere DNA-segmenter fra én celle til en annen. Uttrykket "vehikkel" benyttes noen ganger om hverandre med uttrykket "vektor".

- 10 Uttrykket "ekspresjonsvektor" som benyttet her, henviser til et rekombinant DNA-molekyl inneholdende en ønsket, kodende sekvens og egnede nukleinsyresekvenser som er nødvendige for ekspresjon av den operativt linkede, kodende sekvens i en spesiell vertsorganisme. Nukleinsyresekvenser som er nødvendige for ekspresjon i prokaryoter, inkluderer vanligvis en promoter, en operator (eventuell) og et ribosombindingssete,
- 15 ofte sammen med andre sekvenser. Eukaryotiske celler er kjent for å benytte promotere, enhancere og terminerings- og polyadenyleringssignaler.

- Som benyttet her henviser uttrykket "vertscelle" til en hvilken som helst eukaryotisk eller prokaryotisk celle (for eksempel bakterieceller som *E. coli*, CHO-celler, gjær-
- 20 celler, pattedyrceller, avianceller, amfibianceller, planteceller, fiskeceller og insekts-celler), uansett om de er lokalisert *in vitro* eller *in vivo*. For eksempel kan vertsceller være lokalisert i et transgenisk dyr.

- Uttrykkene "transfeksjon" og "transformasjon" som benyttet her, henviser til inn-
- 25 føringen av fremmed-DNA i celler (for eksempel eukaryotiske eller prokaryotiske celler). Transfeksjon kan gjennomføres ved et antall midler som er velkjente i teknikken inkludert kalsiumfosfat-DNA-kopresipitering, DEAE-dekstranmediert transfeksjon, polybrenmediert transfeksjon, elektroforering, mikroinjeksjon, liposomfusjon, lipofeksjon, protoplastfusjon, retroviral infeksjon og biolistikk.

30

Uttrykket "stabil transfeksjon" eller stabilt transfektert" henviser til innføringen og integreringen av fremmed-DNA i genomet av den transfekterte celle. Uttrykket "stabil transfektant" henviser til en celle som har stabilt integrert fremmed-DNA i det

genomiske DNA.

35

Uttrykket "transient transfeksjon" eller transient transfektert" henviser til innføring av fremmed-DNA i en celle der dette fremmed-DNA ikke integrerer i genomet i den transfekterte celle. Dette fremmed-DNA forblir i nukleus hos den transfekterte celle i flere dager. I løpet av dette tidsrom blir et fremmed-DNA gjenstand for den regulator-

5 iske kontroll som styrer ekspresjonen av endogene gener i kromosomene. Uttrykket "transient transfektant" henviser til celler som har tatt opp fremmed-DNA, men som kan ha sviktet når det gjelder integrering av denne DNA.

Uttrykket "kalsiumfosfatkopresipitering" henviser til en teknikk for innføring av

10 nukleinsyrer i en celle. Opptaket av nukleinsyrer i celler forsterkes når nukleinsyren presenteres som et kalsiumfosfat-nukleinsyrekopresipitat. Den originale teknikk til Graham og van der Eb (Graham and van der Eb, Virol., 52:456 [1973]) er modifisert av flere grupper for å optimalisere betingelsene for spesielle celletyper. Teknikken er godt kjent med disse tallrike modifikasjoner.

15 Et "preparat omfattende en gitt polynukleotidsekvens" som benyttet her, henviser generelt til et hvilket som helst preparat som inneholder den gitte polynukleotidsekvens. Preparatet kan omfatte en vandig oppløsning. Preparater som omfatter polynukleotid-sekvenser som for eksempel koder et variant Fc-område eller fragmenter derav, kan

20 benyttes som hybridiseringsprober. I dette tilfellet blir variant Fc-området som koder polynukleotidsekvenser, typisk benyttet i en vandig oppløsning inneholdende salter (for eksempel NaCl), detergenter (for eksempel SDS) og andre komponenter (for eksempel Denhardts oppløsning, tørrmelk, laksesperma DNA og så videre).

25 Uttrykket "testforbindelse" eller "kandidatforbindelse" henviser til en hvilken som helst kjemisk enhet, et farmasøytikum, medikament og lignende, som kan benyttes for å behandle eller forhindre en sykdom, tilstand eller forstyrrelse av en kroppsfunksjon eller som på annen måte endrer den fysiologiske eller cellulære status for en prøve. Test-

forbindelser omfatter både kjente og potensielle terapeutiske forbindelser. En test-

30 forbindelse kan bestemmes til å være terapeutisk ved screening ved bruk av screeningsmetodene som er beskrevet i oppfinnelsen. En "kjent terapeutisk forbindelse" henviser til en terapeutisk forbindelse som er påvist (for eksempel ved dyreforsøk eller tidligere erfaring ved administrering til mennesker) å være effektiv ved slik terapi eller prevensjon.

Som benyttet her henviser uttrykket "respons", benyttet under henvisning til en analyse, til generering av et detekterbart signal (for eksempel akkumulering av rapportørprotein, økning i ionekonsentrasjon, akkumulering av et detekterbart, kjemisk produkt).

- 5 Som benyttet her henviser uttrykket "rapportørgen" til et gen som koder et protein som kan analyseres. Eksempler på rapportørgener inkluderer, men er ikke begrenset til, luciferase (se for eksempel deWet et al., Mol. Cell. Biol. 7:725 [1987] og US 6 074 859, begge ansett som del av beskrivelsen), grønt, fluorescent protein (f.eks. GenBank aksessnr. U43284; et antall GFP-varianter er kommersielt tilgjengelige fra CLONTECH
10 Laboratories, Palo Alto, CA), kloramfenikolacetyltransferase, β -galaktosidase, alkalisk fosfatase og pepperrotperoksidase.

- Som benyttet her henviser uttrykket "computerhukommelse" og "computerhukommelsesinnretning" til et hvilket som helst lagringsmedium som kan lese av en computer-
15 prosessor. Eksempler på computerhukommelser inkluderer, men er ikke begrenset til, RAM, ROM, computerbrikker, digitale videodisker (DVD'er), kompaktdisker (CD'er), harddiskdrivere (HDD) og magnetbånd.

- Som benyttet her henviser uttrykket "computerlesbart medium" til en hvilken som helst
20 innretning eller system for lagring og å tilveiebringe informasjon (for eksempel data og instruksjoner) til en computerkompressor. Eksempler på computerlesbare medier inkluderer, men er ikke begrenset til, DVD'er, CD'er, harddiskdrivere, magnetbånd og servere for streamingmedier over nettverk.

- 25 Som benyttet her henviser uttrykket "computerlesbart medium som koder en representering" av en nukleinsyre eller aminosyresekvens, til computeravlesbart medium som har lagret informasjon som, avlevert til en prosessor, tillater at sekvensen av nuklein- eller aminosyresekvensen vises for en bruker (for eksempel trykkes ut eller presenteres på en skjerm).

- 30 Som benyttet her benyttes uttrykkene "prosessor" og "sentralprosessenhhet" eller "CPU" om hverandre og henviser til en innretning som er i stand til å lese et program fra en computerhukommelse (for eksempel ROM eller en annen computerhukommelse) og så å gi et sett av trinn i henhold til programmet.

Som benyttet her benytter nummereringen av aminosyrerester i en immunoglobulin tungkjede EU-indeksformatet som i Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. utg., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), ansett som del av beskrivelsen. "UE-indeksformatet som i Kabat" henviser
5 til restnummereringen av human IgG1-EU-antistoffet.

Som benyttet her er et "opphavspolypeptid" et polypeptid som omfatter en aminosyresekvens som kan forandres eller endres (for eksempel en aminosyresubstitusjon, -addisjon eller delesjon) for å gi en variant. I foretrukne
10 utførelsesformer omfatter opphavspolypeptidet minst en del av et naturlig forekommende Fc-område eller et Fc-område med aminosyresekvensmodifikasjoner (for eksempel addisjoner, delesjoner og/eller substitusjoner). I noen utførelsesformer er varianter som er kortere eller lengre enn opphavspolypeptidet, spesifikt omfattet. I spesielt foretrukne utførelsesformer skiller opphavspolypeptidet seg i funksjon (for
15 eksempel effektorfunksjon, binding og så videre) sammenlignet med en variant.

Som benyttet her henviser uttrykket "variant av et opphavspolypeptid" til et peptid omfattende en aminosyresekvens som skiller seg fra den til opphavspolypeptidet ved minst én aminosyremodifisering. I visse utførelsesformer omfatter varianten minst en del
20 av et Fc-område (for eksempel minst 40 %, 50 %, 75 % eller 90 % av et Fc-område). I foretrukne utførelsesformer omfatter varianten et Fc-område av et opphavspolypeptid med minst én aminosyremodifikasjon.

Som benyttet her henviser uttrykket "Fc-område" til et C-terminalområde av en
25 immunoglobulin tungkjede (for eksempel som vist i figur 1). "Fc-området" kan være et nativt sekvens-Fc-område eller et variant-Fc-område. Selv om de generelt aksepterte grenser for Fc-området for en immunoglobulin tungkjede kan variere, er human IgG-tungkjede-Fc-områder vanligvis definert til å strekke seg fra en aminosyrerest ved posisjon Cys226 eller fra Pro230, til karboksylterminus. I noen utførelsesformer om-
30 fatter varianter kun deler av Fc-området og kan eventuelt inkludere karboksylterminus. Fc-området av et immunoglobulin omfatter generelt to konstante domener, CH2 og CH3, som for eksempel vist i figur 1. I enkelte utførelsesformer omfattes varianter med ett eller flere av de konstante domener. I andre utførelsesformer omfattes varianter uten slike konstante domener (eller med kun deler av slike konstante domener).

Som benyttet her omfatter "CH2-domenet" (også angitt som "C γ 2"-domene) generelt strekket av rester som forløper fra rundt aminosyre 231 til rundt aminosyre 340 i et Fc-område (for eksempel i det humane IgG Fc-område). CH2-domenet er unikt dit hen at det ikke nært er parett med et annet domene. Tvert i mot er to N-linkede, forgrenede

5 karbohydratkjeder anbrakt mellom to CH2-domener av et intakt, nativt IgG-molekyl.

Som benyttet her omfatter "CH3-domenet" (også angitt som "C γ 3"-domene) generelt strekket av rester C-terminalt til et CH2-domene i et Fc-område (for eksempel fra rundt aminosyrerest 341 til rundt aminosyrerest 447 av en human IgG Fc-område).

10

Som benyttet her kan et Fc-område ha "effektorfunksjoner" som er ansvarlige for å aktivere eller redusere en biologisk aktivitet (for eksempel i et individ). Eksempler på effektorfunksjoner inkluderer, men er ikke begrenset til: C1q-binding; komplement-avhengig cytotoxicitet (CDC); Fc-reseptorbinding; antistoffavhengig, cellemediert

15 cytotoxicitet (ADCC); fagocytose; nedregulering av celleoverflateresptorer (for eksempel B-celleresptor; BCR) og så videre. Slike effektorfunksjoner kan kreve at Fc-området kombineres med et bindingsdomene (for eksempel et antistoffvariabelt domene) og kan bedømmes ved bruk av forskjellige analyser (for eksempel Fc-bindingsanalyse, ADCC-analyser, CDC-analyser, målcelleutarming fra hel- eller

20 fraksjonerte blodprøver og så videre).

Som benyttet her henviser uttrykket "nativ sekvens-Fc-område" eller "villtype Fc-område" til en aminosyresekvens som er identisk med aminosyresekvensen i et Fc-område som vanligvis finnes i naturen. Eksempler på native sekvenshuman-Fc-områder

25 er vist i figur 2 og inkluderer et nativt sekvenshuman IgG1-Fc-område (f- og a,z-allotyper); nativt sekvenshuman-IgG2-Fc-område; nativt sekvenshuman-IgG3-Fc-område og nativt sekvenshuman-IgG4-Fc-område, så vel som naturlig forekommende varianter derav. Native sekvensmurin-Fc-områder er også vist i figur 2. Andre sekvenser er også tatt sikte på og kan lett oppnås fra forskjellige web-seter (for

30 eksempel NCBI's web-sete).

Som benyttet her henviser uttrykket "variant Fc-område" til aminosyresekvenser som skiller seg fra den til et nativt sekvens-Fc-område (eller deler derav) på grunn av minst én aminosyremodifikasjon (for eksempel substitusjon, insersjon eller delesjon),

35 inkludert heterodimeriske varianter hvori tungkjedesubenhetssekvensene kan skille seg

fra hverandre. I foretrukne utførelsesformer har variant Fc-området minst en aminosyre-substitusjon sammenlignet med et nativt sekvens-Fc-område (for eksempel fra rundt én til rundt ti aminosyresubstitusjoner og fortrinnsvis fra rundt én til rundt fem aminosyre-substitusjoner i et nativt sekvens Fc-område). I foretrukne utførelsesformer vil variant

5 Fc-områder ha minst rundt 80 % homologi med et nativt sekvens-Fc-område, fortrinnsvis minst rundt 90 % homologi og aller helst rundt 95 % homologi.

Som benyttet her henviser uttrykket "homologi", benyttet under henvisning til aminosyresekvenser, til den prosentandel av rester i en aminosyresekvensvariant som er

10 identisk med den native aminosyresekvens etter innretning av sekvensene og innføring av gap, hvis nødvendig, for å oppnå maksimal prosenthomologi.

Uttrykket "Fc-områdeholdig polypeptid" henviser til et polypeptid, for eksempel et antistoff eller immuno adhesiv (se definisjoner nedenfor) som omfatter et Fc-område.

15

Uttrykket "Fc-reseptor" og "FcR" benyttes for å beskrive en reseptor som binder til et Fc-område (for eksempel Fc-området av et antistoff eller antistofffragment). Uttrykket inkluderer den neonatale reseptor, FcRn, som er ansvarlig for overføring av maternale IgG'er til fetus.

20

Som benyttet her henviser uttrykket "antistoffavhengig, cellemediert cytotoksisitet" og "ADCC" til en cellemediert reaksjon hvori cytotoksiske celler (for eksempel ikke-spesifikke) som uttrykker FcR'er (for eksempel naturlige dreper(NK)-celler, neutrofiler og makrofager) gjenkjenner bundet antistoff på en målcelle og deretter forårsaker

25 lysering av målcellene. Primær cellene for mediering av ADCC, NK-celler, uttrykker FcγRIII, mens monocytter uttrykker FcγRI, FcγRII og FcγRIII.

Som benyttet her henviser uttrykket "effektorceller" til leukocytter som uttrykker én eller flere FcR'er og utøver effektorfunksjoner. Fortrinnsvis uttrykker cellene minst

30 FcγRIII og utøver en ADCC-effektorfunksjon. Eksempler på leukocytter som medierer ADCC, inkluderer perifere, blodmononukleære celler (PBMC), naturlige dreper(NK)-celler, monocytter, cytotoksiske T-celler og neutrofiler. Effektorcellene kan isoleres fra en nativ kilde (for eksempel fra blod).

35 Som benyttet her henviser uttrykket "fullblod" eller tilsvarende til ikke-fraksjonerte blodprøver.

Som benyttet her er en polypeptid med "endret" FcR-bindingsaffinitet eller ADCC-aktivitet én som har enten forsterket (det vil si økt) eller svekket (det vil si redusert) FcR-bindingsaktivitet og/eller ADCC-aktivitet sammenlignet med et opphavspolypeptid eller et polypeptid omfattende et nativt sekvens-Fc-område. En polypeptidvariant som

5 "viser økt binding" til en FcR, binder minst én FcR med bedre affinitet enn opphavspolypeptidet. En polypeptidvariant som "viser redusert binding" til en FcR, binder minst én FcR med dårligere affinitet enn opphavspolypeptidet. Slike varianter som viser redusert binding til en FcR, kan ha liten eller ingen erkjennbar binding til en FcR, for eksempel 0-20 % binding til denne FcR sammenlignet med opphavspolypeptidet. En

10 polypeptidvariant som binder en FcR med "bedre affinitet" enn et opphavspolypeptid, er ett som binder en hvilken som helst én eller flere av de ovenfor identifiserte FcR'er med høyere bindingsaffinitet enn opphavsantistoffet når mengdene av polypeptidvarianten og opphavspolypeptidet i en bindingsanalyse er i det vesentlige like, og alle andre betingelser er identiske. For eksempel kan en polypeptidvariant med forbedret FcR-

15 bindingsaffinitet, vise fra rundt 1,10 ganger til rundt 100 ganger (mer spesifikt fra rundt 1,2 ganger til rundt 50 ganger) forbedring (det vil si økning) av FcR-bindingsaffiniteten sammenlignet med opphavspolypeptidet, der FcR-bindingsaffiniteten for eksempel bestemmes i en ELISA-analyse.

20 Som benyttet her henviser en "aminosyremodifikasjon" til en forandring i aminosyresekvensen for en gitt aminosyresekvens. Eksempler på modifikasjoner inkluderer, men er ikke begrenset til, en aminosyresubstitusjon, -insersjon og/eller delesjon. I foretrukne utførelsesformer er aminosyremodifikasjonen en substitusjon (for eksempel i et Fc-område eller et opphavspolypeptid).

25

Som benyttet her henviser en "aminosyremodifikasjon ved" en spesifikk posisjon (for eksempel i Fc-området) til en substitusjon eller delesjon av den spesifiserte rest eller insersjon av minst én aminosyrerest ved siden av den spesifiserte rest. Ved insersjon "ved siden av" en spesifisert rest menes insersjon med én til to rester derav. Insersjonen

30 kan være N-terminal eller C-terminal til den spesifiserte rest.

Som benyttet her henviser "aminosyresubstitusjon" til erstatning av minst én eksisterende aminosyrerest i en gitt aminosyresekvens med en annen forskjellig "erstatnings"-aminosyrerest. Erstatningsresten eller -restene kan være "naturlig forekommene aminosyrerester" (for eksempel kodet av den genetiske kode) eller valgt blant: alanin (Ala);

35 arginin (Arg); asparagin (Asn); aspartinsyre (Asp); cystein (Cys); glutamin (Gln);

glutaminsyre (Glu); glysin (Gly); histidin (His); isoleucin (Ile); leucin (Leu); lysin (Lys); metionin (Met); fenylalanin (Phe); prolin (Pro); serin (Ser); treonin (Thr); tryptofan (Trp); tyrosin (Tyr); og valin (Val). Substitusjon med én eller flere, ikke-naturlig forekommende aminosyrerester er også omfattet innen definisjonen av en

5 aminosyresubstitusjon som gitt her. En "ikke-naturlig forekommende aminosyrerest" henviser til en rest forskjellig fra de naturlig forekommende aminosyrerester som er oppsummert ovenfor, som er i stand til kovalent å binde nær aminosyrerester i en polypeptidkjede. Eksempler på ikke-naturlig forekommende aminosyrerester inkluderer norleucin, ornitin, norvalin, homoserin og andre aminosyrerester som er analoger som

10 de som er beskrevet av Ellman et al. Meth. Enzym. 202: 301-336 (1991), ansett som del av beskrivelsen.

Som benyttet her henviser uttrykket "aminosyreinsersjon" til innarbeiding av minst én aminosyre i en gitt aminosyresekvens. I foretrukne utførelsesformer vil en insersjon

15 vanligvis være insersjon av én eller to aminosyrerester. I andre utførelsesformer inkluderer begrepet insersjon av større peptider (for eksempel insersjon av fra tre til rundt fem og sågar opp til ti aminosyrerester).

Som benyttet her henviser uttrykket "aminosyredelesjon" til fjerning av minst én

20 aminosyrerest fra en gitt aminosyresekvens.

Uttrykket "analysesignal" henviser til utgangen fra en hvilken som helst metode for detektering av protein-protein-interaksjoner, inkludert, men ikke begrenset til, absorpsjonsmålinger fra kolorimetriske analyser, fluorescent intensitet eller disintegreringer pr. min. Analyseformater kan inkludere ELISA, fac'er eller andre metoder. En

25 forandring i "analysesignalet" kan reflektere en forandring i cellelevedyktighet og/eller en forandring i den kinetiske av-hastighet, den kinetiske på-hastighet eller begge deler. Et "høyere analysesignal" henviser til det målte utgangstall som er større enn et annet tall (for eksempel kan en variant ha et høyere (større) målt tall i en ELISA-analyse

30 sammenlignet med opphavspolypeptidet). Et "lavere" analysesignal henviser til det målte utgangstall som er mindre enn et annet tall (for eksempel kan en variant ha et lavere (mindre) målt tall i en ELISA-analyse sammenlignet med opphavspolypeptidet).

Uttrykket "bindingsaffinitet" henviser til likevektsdissosiasjonskonstanten (uttrykt i

35 konsentrasjonsenheter) assosiert med hver Fc-reseptor-Fc-bindingsinteraksjon. Bindingsaffiniteten er direkte relatert forholdet mellom kinetisk av-hastighet (generelt

angitt i enheter av invers tid, for eksempel sekunder⁻¹) dividert med den kinetiske på-hastighet (generelt angitt i konsentrasjonsenheter pr. tidsenhet, for eksempel molar/sek). Generelt er det ikke mulig utvetydig å angi hvorvidt forandringer i likevektsdissosiasjonskonstantene skyldes forskjeller i på-hastigheter, av-hastigheter eller begge deler,

5 hvis ikke hver av disse parametre bestemmes eksperimentelt (for eksempel ved BIACORE- eller SAPIDYNE-målinger).

Som benyttet her henviser uttrykket "hengselområde" til strekket av aminosyrer i human IgG1 som forløper fra Glu216 til Pro230 av human IgG1. Hengselområder av andre

10 IgG-isotyper kan innrettes med IgG1-sekvensen ved å anbringe de første og siste cysteinrester som utgjør inter-tung kjede S-S-bindinger, i de samme posisjoner.

Som benyttet her henviser uttrykket "lavere hengselområde" av et Fc-område til strekket av aminosyrerester umiddelbart C-terminalt til hengselområdet (for eksempel rester 233

15 til 239 av Fc-området av IgG1).

"C1q" er et polypeptid som inkluderer et bindingssete for Fc-området av et immunoglobulin. C1q sammen med to serinproteaser, C1r og C1s, utgjør det komplekse C1, den første komponent av den komplementavhengige cytotoxiskitets(CDC)-vei.

20

Som benyttet her benyttes uttrykket "antistoff" i den bredeste forstand og dekker spesifikt monoklonale antistoffer (inkludert full-lengdemonoklonale antistoffer), polyklonale antistoffer, multispesifikke antistoffer (for eksempel bispesifikke antistoffer) og antistofffragmenter, så lenge disse viser den ønskede, biologiske aktivitet.

25

Som benyttet her henviser uttrykket "antistofffragment" til en del av et intakt antistoff. Eksempler på antistofffragmenter inkluderer, men er ikke begrenset til, lineære antistoffer, enkeltkjedeantistoffmolekyler, Fc- eller Fc'-peptider, Fab- og Fab-fragmenter og multispesifikke antistoffer dannet fra antistofffragmenter. Antistofffragmentene bi-

30 beholder fortrinnsvis minst en del av hengslen og eventuelt CH1-området av en IgG-tung kjede. I andre foretrukne utførelsesformer omfatter antistofffragmentene minst en del av CH2-området eller hele CH2-området.

Som benyttet her er uttrykket "funksjonelt fragment" benyttet under henvisning til et

35 monoklonalt antistoff, ment å henvise til en del av det monoklonale antistoff som fremdeles bibeholder en funksjonell aktivitet. En funksjonell aktivitet kan for eksempel

- være antigenbindingsaktivitet eller -spesifisitet. Monoklonale antistoff-funksjonelle fragmenter inkluderer for eksempel individuelle tunge eller lette kjeder eller fragmenter derav, som VL, VH og Fd; monovalente fragmenter som Fv, Fab og Fab'; bivalente fragmenter som F(ab')₂; enkeltkjede Fc (scFv); og Fc-fragmenter. Slike uttrykk er for eksempel beskrevet av Harlowe and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); *Molec. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference* (Myers, R.A. (ed.), New York: VCH Publisher, Inc.); Huston et al., *Cell Biophysics*, 22:189-224 (1993); Pluckthun and Skerra, *Meth. Enzymol.*, 178:497-515 (1989) og i Day, E.D., *Advanced Immunochemistry*, Second Ed., Wiley-Liss, Inc., New York, NY (1990). Uttrykket funksjonelt fragment er ment for eksempel å inkludere fragmenter som produseres ved proteasedigestering eller reduksjon av et monoklonalt antistoff og ved rekombinante DNA-metoder som er velkjente for fagmannen.
- Som benyttet her er "humaniserte" former av ikke-humane (for eksempel murine) antistoffer slike som inneholder minialsekvensen eller ingen sekvens avledet fra ikke-human immunoglobulin. For det meste er humaniserte antistoffer humanimmunoglobuliner (resipient antistoff) der rester fra et hypervariabelt område hos resipienten er erstattet med rester fra et hypervariabelt område av en ikke-human spesies (donor-antistoff) som mus, rotte, kanin eller ikke-human primat med den ønskede spesifisitet, affinitet og kapasitet. I enkelt tilfeller blir Fv-rammeverksområde(FR)-restene av humanimmunoglobulinet erstattet med tilsvarende ikke-humane rester. Videre kan humaniserte antistoffer omfatte rester som ikke finnes i det resipiente antistoffet eller i donorantistoffet. Disse modifikasjoner gjøres generelt for videre å raffinere antistoff-tytelsen. Generelt vil det humaniserte antistoff omfatte i det vesentlige alt av minst én, typisk to, variable domener, der alle eller i det vesentlige alle hypervariable løkker tilsvarende de til ikke-humant immunoglobulin og alle eller i det vesentlige alle av FR-restene er de til en human immunoglobulinsekvens. Det humaniserte antistoff kan også omfatte minst en del av et immunoglobulinkonstant område (Fc), typisk det til et humant immunoglobulin. Eksempler på metoder som benyttes for å generere humaniserte antistoffer er beskrevet i US 5 225 539 i navnet Winter et al.

- Som benyttet her henviser uttrykket "hypervariabelt område" til aminosyrerestene av et antistoff som er ansvarlig for antigenbinding. Det hypervariable område omfatter aminosyrerester fra et "komplementaritetsbestemmende område" eller "CDR" (det vil si restene 24-34 (L1), 50-56 (L2) og 89-97 (L3) i det lettkjedevariable domene og 31-35

- (H1), 50-65 (H2) og 95-102 (H3) i det tungkjedevariable domene; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. utg. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) og/eller de rester fra en "hypervariabel løkke" (det vil si restene 26-32 (L1), 50-52 (L2) og 91-96 (L3) i det lett-kjede-
- 5 variable domene og 26-32 (H1), 53-55 (H2) og 96-101 (H3) i det tungkjedevariable domene: Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). "Rammeverk"- eller "FR"-rester er de variable domenerester andre enn de hypervariable områderester som definert her.
- 10 Som benyttet her designerer uttrykket "immunoadhesin" antistofflignende molekyler som kombinerer bindingsdomenet av et heterologt "adhesin"-protein (for eksempel en reseptor, en ligand eller et enzym) med et immunoglobulinkonstant domene. Strukturelt omfatter immunoadhesiner en funksjon av adhesinamminosyresekvensen med den
- 15 ønskede bindingsspesifisitet som er forskjellig fra antigengjenkjennelsen og bindingssete (antigenkombineringssete) til et antistoff (det vil si er "heterolog") med en immunoglobulinkonstant domenesekvens.

- Som benyttet her henviser "ligandbindingsdomene" til en hvilken som helst nativ reseptor eller et hvilket som helst område eller derivat derav som bibeholder minst en
- 20 kvalitativ ligandbindingsevne hos en tilsvarende nativ reseptor. I visse utførelsesformer er reseptoren fra et celleoverflatepolypeptid med et ekstracellulært domene som er homolog til et medlem av immunoglobulinsupergenfamilien. Andre reseptorer som ikke er medlemmer av immunoglobulinsupergenfamilien, men ikke desto mindre spesifikt er dekket ved denne definisjon, er reseptorer for cytokiner og særlig reseptorer med
- 25 tyrosinkinaseaktivitet (reseptortyrosinkinaser), medlemmer av hematopoietin- og nervevektsfaktorreseptorsuperfamiliene og celleadhesjonsmolekyler (for eksempel E-, L- og P-selektiner).

- Som benyttet her designerer uttrykket "reseptorbindingsdomene" til en hvilken som
- 30 helst nativ ligand for en reseptor inkludert celleadhesjonsmolekyler eller et hvilket som helst område eller derivat av en slik nativ ligand som bibeholder minst en kvalitativ reseptorbindingsevne til en tilsvarende nativ ligand.

- Som benyttet her omfatter "antistoffimmunoadhesinkimera" et molekyl som kombinerer
- 35 minst ett bindingsdomene av et antistoff med minst ett immunoadhesin. Eksempler

inkluderer, men er ikke begrenset til, de bispesifikke CD4-IgG-kimerer som er beskrevet av Berg et al. i PNAS (USA) 88:4723-4727 (1991) og Charnow et al. i J. Immunol., 153:4268 (1994).

- 5 Som benyttet her er et "isolert" polypeptid ett som er identifisert og separert og/eller oppnådd fra et område av sin naturlige omgivelse. Kontaminantkomponenter fra dens naturlige omgivelse er materialer som vil interferere med diagnostiske eller terapeutiske anvendelser for polypeptider og kan inkludere enzymer, hormoner og andre proteinholdige eller ikke-proteinholdige soluter. I vise utførelsesformer blir det isolerte polypeptidet rensed (1) til mer enn 95 vekt% polypeptider som bestemt ved Lowry-metoden og fortrinnsvis mer enn 99 vekt%, (2) til en grad tilstrekkelig til å oppnå minst 15 rester N-terminal- eller intern aminosyresekvenser ved bruk av en spinnekoppsekventator, eller (3) til en homogenitet med SDS-page under reduserende eller ikke-reduserende betingelser ved bruk av Coomassie-blå eller sølvfarge. Isolerte polypeptider inkluderer polypeptidet *in situ* innen rekombinante celler fordi minst én komponent av polypeptidenes naturlige omgivelse ikke vil være til stede. Vanligvis vil imidlertid isolert polypeptid fremstilles ved minst ett rensetrinn.

- 20 Som benyttet her designerer uttrykket "behandling" til både terapeutisk behandling og profylaktiske eller preventative forholdsregler. De som trenger behandling inkluderer de som allerede er rammet av forstyrrelsen, så vel som de der forstyrrelsen skal forhindres.

- 25 Som benyttet her henviser uttrykket "forstyrrelse" til en hvilken som helst tilstand som vil trekke fordel av behandling med en polypeptidvariant, inkludert kroniske og akutte forstyrrelser eller sykdommer (for eksempel patologiske tilstander som predisponerer en pasient til en spesiell forstyrrelse). I visse utførelsesformer er forstyrrelsen en cancer.

- 30 Som benyttet her henviser uttrykkene "cancer" og "cancerøs" til, eller beskriver, den fysiologiske tilstand hos pattedyr som typisk karakteriseres ved ikke-regulert cellevekst. Eksempler på cancer inkluderer, men er ikke begrenset til, karcinomer, lymfomer, blastomer, sarkomer og leukemi. Mer spesielle eksempler på slik cancer inkluderer skvamøs cellecancer, smålungecellecancer, ikke-smålungecellecancer, adenokarsinom i lungene, skvamøs karsinom i lungene, cancer i peritoneum, hepatocellulær cancer, gastrointestinal cancer, pankreatisk cancer, glioblastom, cervikal-, ovarie-, lever- eller blærecancer, hepatom, bryst-, kolon-, colorektal- og endometrial eller uterinkarsinom,

spyttkjertelkarsinom, nyre-, lever-, prostata-, vulval- eller tyroidcancer, hepatisk karsinom og forskjellige typer hode- og halscancer.

Som benyttet her er uttrykket "HER2-uttrykkende cancer" ett som omfatter celler som
 5 har HER2-reseptorprotein (for eksempel Genbank aksessnr. X03363) til stede på celleoverflaten, slik at et anti-HER2-antistoff er i stand til å binde til canceren.

Som benyttet her henviser uttrykket "merkelapp" til en detekterbar forbindelse eller et preparat som direkte eller indirekte er konjugert til et polypeptid. Merkelappen kan i seg
 10 selv være detekterbar (for eksempel radioisotopmerkelapper eller fluorescente merkelapper) eller de kan, når det gjelder en enzymatisk merkelapp, katalyserer kjemisk endring av en substratforbindelse eller et preprat som er detekterbart.

Som benyttet her henviser uttrykkene "kontrollelement", "kontrollsekvens" og "regulatorisk element" til et genetisk element som kontrollerer et visst aspekt ved ekspresjonen
 15 av nukleinsyresekvenser. For eksempel er en promoter et regulatorisk element som letter initiering av transkribering av et operativt forbundet, kodende område. Andre regulatoriske elementer inkluderer spleisesignaler, polyadenyleringssignaler, termineringssignaler og så videre. Kontrollelementer som er egnede for prokaryoter, inkluderer
 20 for eksempel en promoter, eventuelt en operatorsekvens, og et ribosombindingssete. Eukaryotiske celler er velkjente for å benytte promotere, polyadenyleringssignaler og enhancere.

Som benyttet her er nukleinsyren "operativt forbundet" når den er plassert i en funksjonell sammenheng med et annen nukleinsyresekvens. For eksempel er DNA for en
 25 forsekvens eller sekretorisk leder operativt forbundet til DNA for et polypeptid hvis den uttrykkes som et preprotein som deltar i sekresjonen av polypeptidet; en promoter eller enhancer er operativt forbundet med en kodende sekvens hvis den påvirker transkripsjonen av sekvensen; eller et ribosombindingssete er operativt forbundet med en
 30 kodende sekvens hvis den er posisjonert slik at den letter translasjon. I foretrukne utførelsesformer betyr "operativt forbundet" at de linkede DNA-sekvenser følger på hverandre, og at, når det gjelder en sekretorisk leder, på hverandre følgende og i lese-ramme. Imidlertid behøver enhancere for eksempel ikke å være på hverandre følgende. Linking kan oppnås for eksempel ved ligering ved hensiktsmessige restriksjonsseter.
 35 Hvis slike ikke eksisterer kan syntetiske oligonukleotidadaptorer eller linkere benyttes i henhold til konvensjonell praksis.

Som benyttet her benyttes uttrykkene "celle", "cellelinje" og "cellekultur" om hverandre og betyr at alle disse designeringer inkluderer avkom. Således inkluderer ordene "transformanter" og "transformerte celler" primærsubjektceller og kulturer avledet fra disse uten hensyn til antallet av overføringer. Det skal også være klart at alt avkom ikke
 5 nødvendigvis må være identiske DNA-innhold på grunn av tilsiktede eller utilsiktede mutasjoner. Mutantavkom som har samme funksjon eller biologisk aktivitet som screenet for de i utgangspunktet transformerte celler, er omfattet. Der distinkte designeringer er tilsiktet, vil dette være tydelig fra sakens kontekst.

- 10 Som benyttet her henviser "analytt" til et substrat som ikke kan analyseres. Den foretrukne analytt er et Fc-område inneholdende polypeptid som ikke må analyseres på grunn av evnen til å binde til en Fc-reseptor.

Som benyttet her henviser uttrykket "reseptor" til et polypeptid som er i stand til å binde
 15 minst én ligand. Den foretrukne reseptor er en celleoverflate eller en oppløselig reseptor med et ekstracellulært ligand-bindedomene og eventuelt andre domener (for eksempel transmembrandomene, intracellulært domene og/eller membrananker). En reseptor som skal evalueres i en analyse som beskrevet her, kan være en intakt reseptor eller et fragment eller derivat derav (for eksempel et fusjonsprotein omfattende bindings-
 20 domenet av reseptoren fusert til ett eller flere heterologe polypeptider). Videre kan reseptoren som skal evalueres for bindingsegenskaper, være til stede i en celle eller isolert og eventuelt belagt på en analyseplate eller en annen fast fase eller merket direkte og benyttet som en probe.

- 25 Som benyttet her henviser uttrykket "CHO-uttrykt polypeptid" et polypeptid som rekombinant er uttrykt i kinesiske hamsterovarie(CHO)-celler.

Som benyttet her henviser uttrykket "antistoffresponsiv sykdom" til en hvilken som helst sykdom eller medisinsk tilstand som er påvist å kunne behandles, i det minste i en
 30 viss grad, med antistoffterapi. Eksempler på slike sykdommer og medisinske tilstander inkluderer, men er ikke begrenset til, lymfom (påvist å kunne behandles med RITUXAN), infeksiose sykdommer (påvist å kunne behandles med SYNAGIS), nyretransplantat (ZENAPAX har vist seg å være nyttig), Crohns sykdom og reumatoid artritt (påvist å kunne behandles med REMICADE), brystkarsinom (påvist å kunne
 35 behandles med HERCEPTIN) og koloncancer (påvist å kunne behandles med

EDRECOLOMAB). Som vist her henviser uttrykket "immunoaderesinresponsiv sykdom" til en hvilken som helst av en hvilken som helst sykdom eller medisinsk tilstand som er påvist å kunne behandles, i det minste delvis, med immunoaderesinterapi.

- 5 Som benyttet her er en polypeptidvariant som "medierer antistoffavhengig, cellemediert cytotoxisitet (ADCC) i nærvær av humane effektorceller mer effektivt" enn et opphavsantistoff, et som *in vitro* eller *in vivo* er vesentlig mer effektivt ved mediering av ADCC når mengdene av polypeptidvariant- og opphavsantistoff som benyttes i analysen, i det vesentlige er de samme. For eksempel forårsaker en slik variant en
- 10 høyere mengde av målcellelyseringer i en gitt ADCC-analyse enn opphavspolypeptidet i en identisk ADCC-analyse. Slike varianter kan identifiseres, for eksempel ved bruk av ADCC-analyse, men andre analyser eller metoder for å bestemme ADCC-aktiviteten kan også benyttes (for eksempel dyremodeller). I foretrukne utførelsesformer er polypeptidvarianten fra rundt 1,2, 1,5, 50, 100, 500 eller rundt 1 000 ganger mer effektiv ved
- 15 mediering av ADCC enn opphavspolypeptidet.

- Som benyttet her er en polypeptidvariant som "medierer antistoffavhengig, B-celleutarming fra fullblod mer effektivt" enn et opphavsantistoff, et som *in vitro* eller *in vivo* er vesentlig mer effektivt ved mediering av utarming av B-celler, der mengden polypeptidvariant og opphavsantistoff som benyttes i analysen, er i det vesentlige like. For eksempel forårsaker en slik variant en høyere grad av B-celleutarming ved en gitt analyse enn opphavspolypeptidet i en identisk analyse. Videre kan en slik variant utarme B-celler i samme grad, men ved lavere konsentrasjon enn det som kreves for opphavspolypeptidet i en identisk analyse. Slike variasjoner kan identifiseres, for
- 20 eksempel ved bruk av ADCC-analyse, men andre analyser eller metoder for bestemmelse av ADCC-aktivitet, kan også benyttes (for eksempel dyremodeller). I foretrukne utførelsesformer er forsterkningen i utarming i forhold til opphavspolypeptidet, uavhengig av genotypen av FcRIIIa-genotypen i posisjon 158 (V eller F) og FcRIIa-genotypen i posisjon 131 (H eller R) og polypeptidvarianten er fra rundt 1,2, 1,5, 50,
- 25 100, 500 eller rundt 1 000 ganger mer effektiv for mediering av B-celleutarming enn opphavspolypeptidet.

- Uttrykket "symptomer av et antistoff eller immunoaderesinresponsiv sykdom" henviser til de symptomer som generelt er assosiert med en spesiell sykdom. For eksempel
- 35 inkluderer de symptomer som normalt er assosiert med Crohns sykdom: abdominal

smerte, diaré, rektal blødning, vekttnap, feber, appetittap, dehydrering, anemi, distensjon, fibrose, inflammerte intestiner og dårlig næring.

- Uttrykket "under betingelser slik at symptomene reduseres" henviser til en grad av
- 5 kvalitativ eller kvantitativ reduksjon i detekterbare symptomer av et hvilket som helst antistoff eller immunoadhesinresponsiv sykdom som inkluderer, men ikke er begrenset til, et detekterbart innslag på graden av gjenvinning fra sykdom (for eksempel vekttaps-hastighet) eller reduksjon av minst ett av symptomene som vanligvis assosieres med den spesielle sykdom (hvis for eksempel antistoffet eller den immunoadhesinresponsive
- 10 sykdom var Crohns sykdom, en reduksjon i minst én av de følgende symptomer: abdominal smerte, diaré, rektal blødning, vekttnap, feber, appetittap, dehydrering, anemi, distensjon, fibrose, inflammerte intestiner og dårlig næring).

Beskrivelse av oppfinnelsen

- 15 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer polypeptid Fc-områdevarianter og oligonukleotider som koder Fc-områdevarianter. Spesifikt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse nye Fc-områdevarianter, metoder for å identifisere nyttige Fc-områdevarianter, og metoder for å benytte Fc-områdevarianter for behandling av sykdom. Beskrivelsen av oppfinnelsen tilveiebringes nedenfor i de følgende avsnitt:

20

- I) Antistoff-Fc-områder;
- II) Variant-Fc-områder;
- 25 III) Kombinasjonsvarianter;
- IV) Variantpolypeptidanalyser;
- V) Eksempelvariant Fc-områdeholdige molekyler;
- 30 VI) Nukleinsyresekvenser som koder Fc-områdevarianter;
- VII) Terapeutiske anvendelser og formuleringer; og
- 35 VIII) Ytterligere variant-Fc-områdeanvendelser.

I. Antistoff-Fc-områder

Som beskrevet ovenfor har antistoffer områder, primært CH2-områder og CH3-områder, som er involvert i ikke-antigenbindingsfunksjoner. Sammen er disse områder generelt kjente som Fc-området og har flere effektorfunksjoner som medieres ved binding av effektormolekyler.

Effektorfunksjonene som medieres av antistoff-Fc-området, kan deles opp i to kategorier:

- 10 (1) effektorfunksjoner som opererer etter bindingen av antistoff til et antigen (disse funksjoner involverer for eksempel deltagelsen av komplementkaskaden eller Fc-reseptor(FcR)-bærende celler); og
- 15 (2) effektorfunksjoner som opererer uavhengig av antigenbinding (disse funksjoner gir for eksempel persistens i sirkulasjonen og evnen til å kunne overføres over cellulære barrierer ved transcytose). For eksempel aktiverer bindingen av C1-komponenten av komplementet til antistoffer, komplementsystemet. Etter opsonisering er aktivering av komplementet viktig ved lysing av cellepatogenene. Aktivering av komplementet stimulerer også den inflammatoriske respons og kan også være involvert i autoimmun hypersensitivitet. Videre binder antistoffer til celler via Fc-området med et Fc-reseptorbindingssete på antistoff-Fc-området som binder til en Fc-reseptor (FcR) på en celle. Det foreligger et antall Fc-reseptorer som er spesifikke for forskjellige klasser av antistoff, inkludert IgG (γ -reseptorer), IgE (η -reseptorer), IgA (α -reseptorer) og IgM (μ -reseptorer). Mens foreliggende oppfinnelse ikke er begrenset til noen spesiell mekanisme, utløser binding av antistoff til Fc-reseptorer på celleoverflater, et antall viktige og forskjellige, biologiske responser inkludert oppfangning og destruering av antistoffbelagte partikler, klaring av immune komplekser, lysing av antistoffbelagte målceller ved dreperceller (kalt antistoffavhengig, cellemediert cytotoksitet eller ADCC), frigivning av inflammatoriske mediatorer, placental overføring og kontroll av immunoglobulinproduksjon.
- 20
- 25
- 30

Flere antistoffeffektorfunksjoner medieres av Fc-reseptorer (FcR'er) som binder Fc-området av et antistoff. FcR'er er definert ved deres spesifisitet for immunoglobulinisotyper; Fc-reseptorer for IgG-antistoffer angis som Fc γ R, for IgE som Fc ϵ R og for

IgA som Fc α R og så videre. Disse subklasser av Fc γ R er identifisert: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) og Fc γ RIII (CD16).

- Fordi hver Fc γ R-subklasse kodes av to eller tre flere gener og alternativ RNA-spleising fører til flere transkripter, eksisterer det et bredt spektrum av Fc γ R-isomerer. De tre gener som koder Fc γ RI-subklassen (Fc γ RIA, Fc γ RIB og Fc γ RIC), er klustret i område 1q21.1 av den lange arm av kromosom 1; genene som koder Fc γ RII-isoformene (Fc γ RIIA, Fc γ RIIB og Fc γ RIIC) og de to gener som koder Fc γ RIII (Fc γ RIIIA og Fc γ RIIIB), er alle klustret i område 1q22. Disse forskjellige FcR-subtyper uttrykkes på forskjellige celletyper (se for eksempel Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-492 (1991)). For eksempel er i mennesker Fc γ RIIIB funnet kun på neutrofiler, mens Fc γ RIIIA er funnet på makrofager, monocytter, naturlige dreper(NK)-celler og en subpopulasjon av T-celler. Bemerkelsesverdig er Fc γ RIIIA til stede på NK-celler, én av celletypene som er implikert i ADCC.
- Human Fc γ RIIIA(CD16)-reseptor har en felles polymorfisme i posisjon 158 i sitt ekstra-cellulære domene som koder enten et fenylalanin eller et valin i denne posisjon. V-allelen av Fc γ RIIIA har høyere affinitet til human IgG1 enn F-allelen. V158-allelen medierer også ADCC mer effektivt. Kliniske data har vist en korrelasjon mellom genotypen av Fc γ RIIIA-reseptoren hos pasienter som er gjenstand for Rituxan-behandling og terapeutisk respons. Både kliniske og molekylære responser og tid til progresjon, ble påvist å være overlegne hos pasienter som var homozygøse for Fc γ RIIIA-158V-genotypen (ca. 20 % av populasjonen). Som en kontrast, pasienter som er heterozogøse eller homozygøse for den lavere affinitet Fc γ RIIIA-158F-genotypen (rundt 80 % av populasjonen), responderer dårligere. Disse data antyder av Fc-mutasjoner som forsterker ADCC-aktiviteten for 158F-bærerne, kan forsterke den kliniske effektivitet av antistoffbasert terapi av cancer. En genetisk polymorfisme er også til stede i human Fc γ RIIA (CD32)reseptor i posisjon 131 ved dennes ekstracellulære domene som koder enten et histidin (H) eller arginin (R) ved denne posisjon. Polymorfismen ved posisjon 131 er funnet å påvirke evnen til å binde til human IgG. Nylige data viser også en korrelasjon mellom Fc γ RIIA-posisjon 131-polymorfismen og klinisk respons på Rituxan. Pasienter som er homozygøse for H131-allelen, har en signifikant høyere responsgrad enn de andre 2 grupper.

Fc γ RI, Fc γ RII og Fc γ RIII er immunoglobulinsuperfamilie(IgSF)-reseptorer; Fc γ RI har tre IgSF-domener i sitt ekstracellulære domene, mens Fc γ RII og Fc γ RIII har kun to IgSF-domener i sine ekstracellulære domener.

- 5 En annen type Fc-reseptor er den neonatale Fc-reseptor (FcRn). FcRn er strukturelt lik det vesentlige histokompatibilitetskompleks (MHC) og består av en α -kjede som ikke kovalent er bundet til β 2-mikroglobulin.

II. Variant-Fc-områder

- 10 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer polypeptidvarianter, nukleinsyresekvenser som koder polypeptidvariantene, og metoder for å generere polypeptidvarianter. Fortrinnsvis skiller polypeptidvariantene ifølge oppfinnelsen seg fra et opphavspolypeptid med minst én aminosyremodifikasjon. Opphavs-, "villtype"-, "start"- eller "ikke-variant"-polypeptidet omfatter fortrinnsvis minst en del av et antistoff-Fc-område, og kan fremstilles
- 15 ved bruk av teknikker som er tilgjengelige på området for å generere polypeptider som omfatter et Fc-område eller en del derav. I foretrukne utførelsesformer er opphavspolypeptidet et antistoff. Opphavspolypeptidet kan imidlertid være et hvilket som helst annet polypeptid omfattende minst en del av et Fc-område (for eksempel et immunoaderhin). I visse utførelsesformer kan et variant-Fc-område genereres (for eksempel i henhold til
- 20 metoder som beskrevet her) og kan fuseres til et heterologt polypeptid etter valg, som for eksempel et antistoffvariabelt domene eller bindingsdomene av en reseptor eller ligand.

- I foretrukne utførelsesformer omfatter opphavspolypeptidet et Fc-område eller funksjonelle deler derav. Generelt vil Fc-området av opphavspolypeptidet omfatte et nativt
- 25 sekvens-Fc-område, og særlig et humannativt sekvens-Fc-område. Imidlertid kan Fc-området av opphavspolypeptidet ha en eller flere på forhånd eksisterende aminosyresekvensendringer eller -modifikasjoner fra et nativt sekvens-Fc-område. For eksempel kan C1q-bindingsaktiviteten for Fc-området på forhånd være endret eller Fc γ R-
 - 30 bindingsaffiniteten for Fc-området kan være endret. I ytterligere utførelsesformer er opphavspolypeptid-Fc-området konseptuelt (for eksempel mentalt antatt eller visuelt representert på en computer eller et papir) og mens den ikke fysisk eksisterer, kan antistoffkonstrukturen avgjøres på en ønsket variant Fc-områdeaminosyresekvens og generere et polypeptid omfattende denne sekvens eller en DNA som koder den ønskede
 - 35 variant-Fc-områdeaminosyresekvens. Imidlertid er, i visse utførelsesformer, en nuklein-

syre som koder et Fc-område av et opphavspolypeptid, tilgjengelig og denne nukleinsyresekvens endres for å generere en variantnukleinsyresekvens som koder Fc-område-varianten.

- 5 Nukleinsyren som koder en variant av opphavspolypeptidet, kan fremstilles på i og for seg kjent måte ved bruk av retningslinjer i den foreliggende beskrivelse for spesielle sekvenser. Disse metoder inkluderer, men er ikke begrenset til, seterettet (eller oligonukleotidmediert) mutagenese, PCR-mutagenese og kassettmutagenese for en tidligere fremstilt nukleinsyre som koder polypeptidet. Seterettet mutagenese er en foretrukket
- 10 metode for fremstilling av varianter. Denne teknikk er velkjent på området og det skal for eksempel henvises til Carter et al., *Nucleic Acids Res.* 13: 4431-4443 (1985) og Kunkel et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 82: 488 (1987), begge ansett som del av beskrivelsen. Kort sagt blir ved å gjennomføre seterettet mutagenese av DNA, utgangs-DNA endret ved først samtidig å hybridere ett eller flere oligonukleotider som koder de
- 15 ønskede mutasjoner til en enkelt tråd for slik utgangs-DNA. Etter hybridisering blir en DNA-polymerase benyttet for å syntetisere en hel andre tråd ved bruk av den eller de hybriderte oligonukleotider som en primer, og ved å benytte en enkelt tråd av det angjeldende utgangs-DNA som templat og en DNA-ligase for å ligere den andre tråd for å danne en sirkulær, dobbeltrådet DNA. Således blir oligonukleotidet som koder den
- 20 ønskede mutasjon, innarbeidet i den resulterende, dobbeltrådede DNA.

- PCR-mutagenese er også egnet for å fremstille aminosyresekvensvarianter av utgangspolypeptidet (se for eksempel Vallette et al., *Nuc. Acids Res.* 17: 723-733 (1989), ansett som del av beskrivelsen). Kort sagt og når små mengder templat-DNA benyttes som
- 25 utgangsmateriale i en PCR, kan primere som skiller seg noe i sekvens fra det tilsvarende området i et templat-DNA, benyttes for å generere relativt store mengder av et spesifikt DNA-fragment som skiller seg fra templatsekvensen kun i posisjonene der primerne skiller seg fra templatet.

- 30 En annen metode for å fremstille varianter, kassettmutagenese, er basert på den teknikk som er beskrevet av Wells et al. i *Gene* 34: 315-323 (1985), ansett som del av beskrivelsen. Utgangsmaterialet er plasmidet (eller en annen vektor) som omfatter utgangspolypeptidet DNA som skal muteres. Den eller de angjeldende kodoner i utgangs-DNA som skal muteres, identifiseres. Det må være et unikt restriksjonsendonukleasesete på
- 35 hver side av den eller de identifiserte muterings seter. Hvis ingen slike restriksjons seter foreligger kan de genereres ved bruk av den ovenfor beskrevne oligonukleotidmedierte

mutagenesemetode for å innføre disse i egnede lokasjoner i utgangspolypeptid-DNA'et. Plasmid-DNA'et skjæres så ved disse seter for linearisering. Et dobbelttrådet oligonukleotid som koder sekvensen for DNA mellom restriksjonssetene, men som inneholder den eller de ønskede mutasjoner, syntetiseres ved bruk av standard prosedyrer, mens de to tråder av oligonukleotidet syntetiseres separat og så hybridiseres sammen ved bruk av standard teknikker. Dette dobbelttrådede oligonukleotid angis som kassetten. Denne kassett angis til å ha 5'- og 3'-ender som er kompatible med endene av det lineariserte plasmid, slik at det direkte kan liggeres til plasmidet. Dette plasmid inneholder nå den muterte DNA-sekvens.

10

Alternativt eller i tillegg, kan den ønskede aminosyresekvens som koder en polypeptid-variant, bestemmes og en nukleinsyresekvens som koder slike aminosyresekvens-varianter, kan genereres syntetisk.

- 15 Aminosyresekvensen for opphavspolypeptidet kan modifiseres for å generere et variant-Fc-område med endret Fc-reseptorbindingsaffinitet eller -aktivitet *in vitro* og/eller *in vivo* og/eller endret antistoffavhengig, celledmediert cytotoxicitet (ADCC) (aktivitet *in vitro* og/eller *in vivo*. Aminosyresekvensen for opphavspolypeptidet kan også modifiseres for å generere et variant-Fc-område med endrede komplementbindingsegenskaper
- 20 og/eller sirkulasjonshalveringstid.

Vesentlige modifikasjoner i biologiske egenskaper av Fc-området kan oppnås ved å velge substitusjoner som differerer signifikant i sin virkning på endring (a) av strukturen for polypeptidskjelettet i området for substituering, for eksempel som en ark- eller

25 skruekonformasjon, (b) ladningen eller hydrofobisiteten for molekylet på målsetet eller massen av sidekjeden, (d) interaksjon med karbohydrat, eller (e) fleksibilitet av domenebevegelse. Naturlig forekommende rester er oppdelt i klasser basert på vanlige sidekjedeegenskaper:

30 (1) hydrofobe: norleucin, met, ala, val, leu, ile;

(2) nøytral hydrofil: cys, ser, thr;

(3) sure: asp, glu;

35

(4) basiske: asn, gln, his, lys, arg;

(5) rester som påvirker kjedeorientering: gly, pro; og

(6) aromatiske: trp, tyr, phe.

- 5 Ikke-konservative substitusjoner vil medføre utbytting av et antall av én av disse klasser mot et medlem av en annen klasse. Konservative substitusjoner vil medføre utbytting av et medlem av én av disse klasser mot et annet medlem av den samme klasse.

- Som vist i eksemplene nedenfor kan man konstruere en Fc-områdevariant med endret aktivitet (én eller flere effektorfunksjoner og farmakokinetikk). Man kan for eksempel 10 modifisere én eller flere aminosyrerester av Fc-området for å endre (for eksempel å øke eller redusere) ADCC-aktiviteten. I foretrukne utførelsesformer omfatter én modifikasjon én eller flere av de Fc-områderester som er identifisert her (se for eksempel eksempel 2 og også WO00/42072, begge ansett som del av foreliggende beskrivelse for 15 alle formål). Generelt vil man foreta en aminosyresubstitusjon på én eller flere av Fc-områderestene som er identifisert her som de som effektuerer ADCC-aktivitet for å generere slik Fc-områdevariant. I foretrukne utførelsesformer vil ikke mer enn én til rundt ti Fc-områderester deleteres eller substitueres. Fc-områdene her omfatter én eller flere aminosyremodifikasjoner (for eksempelsubstitusjoner) og vil fortrinnsvis bi- 20 beholde minst 80 % og fortrinnsvis minst 90 %, helst minst 95 % av opphavs-Fc-områdesekvensen eller et nativt sekvenshuman Fc-område.

- Man kan også fremstille aminosyreinsersjons-Fc-områdevarianter, hvilke varianter har endret effektorfunksjon. For eksempel kan man innføre minst én aminosyrerest (for 25 eksempel én eller to aminosyrerester og generelt ikke mer enn 10 rester) ved siden av én eller flere av Fc-områdeposisjonene som er identifisert her til å gi FcR-binding. Med "ved siden av" eller tilsvarende menes innen én til to aminosyrerester fra en Fc-områderest som identifisert her. Slike Fc-områdevarianter kan vise forsterket eller redusert FcR-binding og/eller ADCC-aktivitet i forhold til opphavsmolekylet. For å generere 30 slike insersjonsvarianter kan man evaluere en kokrystallstruktur av et polypeptid omfattende et bindingsområde av en FcR (for eksempel det ekstracellulære domenet av det angjeldende FcR) og Fc-området inn i hvilket aminosyreresten(e) skal innføres (se for eksempel Sonderrmann et al. Nature 406:267 (2000); Deisenhofer, Biochemistry 20 (9): 2361-2370 (1981); og Burmeister et al., Nature 342: 379-383, (1994), alt ansett som del 35 av beskrivelsen) for på rasjonell måte å designere en Fc-områdevariant med for eksempel forbedret FcR-bindingsevne. I foretrukne utførelsesformer tildannes slike

insersjoner en Fc-områdeløkke, men ikke i den sekundære struktur (det vil si i en β -tråd) av Fc-området.

Ved å innføre de egnede aminosyresekvensmodifikasjoner i opphavs-Fc-området, kan man generere et variant-Fc-område som (a) medierer antistoffavhengig, cellemediert cytotoxisitet (ADCC) i nærvær av humane effektorceller mer eller mindre effektivt og/eller (b) medierer komplementavhengig cytotoxisitet (CDC) i nærvær av human komplement mer eller mindre effektivt og/eller (c) binder en Fc- γ -reseptor (Fc γ R) eller Fc-neonatalreseptor (FcRn) med den ønskede affinitet ved forskjellige pH-verdier enn opphavspolypeptidet. Slike Fc-områdevarianter vil generelt omfatte minst én aminosyremodifikasjon i Fc-området.

I foretrukne utførelsesformer er opphavspolypeptid-Fc-området et humant Fc-område, for eksempel et nativhuman-Fc område-human IgG1 (f- og a,z-allotyper), IgG2, IgG3, IgG4 og alle allotyper som er kjent eller beskrevet fra ethvert spesies. Slike områder har sekvenser som de som er vist i figur 2 (SEKV.ID. NR. 1-8), figur 3 (SEKV.ID. NR. 9-12) og figur 5 (SEKV.ID. NR. 32-37).

I visse utførelsesformer og for å generere et Fc-område med forbedret ADCC-aktivitet, har opphavspolypeptidet fortrinnsvis en preeksisterende ADCC-aktivitet (for eksempel omfatter opphavspolypeptidet et humant IgG1- eller humant IgG3-Fc-område). I visse utførelsesformer medierer en variant med forbedret ADCC ADCC i det vesentlige mer effektivt enn et antistoff med et nativsekvens IgG1- eller -IgG3-Fc-område (for eksempel P247L-og I332E-varianter).

I foretrukne utførelsesformer blir én eller flere aminosyremodifikasjoner innført i CH2- og/eller CH3-domenene av et Fc-område. Brukbare aminosyreposisjoner for modifisering for å generere et variant IgG-Fc-område med endret ADCC-aktivitet, inkluderer en hvilken som helst én eller flere av aminosyreposisjonene: 247, 251, 256, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 305, 307, 309, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438, 439 eller 440 i Fc-området. I foretrukne utførelsesformer omfatter opphavs-Fc-området som benyttes som templat for å generere slike varianter, et human-IgG-Fc-område.

I visse utførelsesformer tilveiebringer foreliggende oppfinnelse preparater omfattende en variant av et opphavspolypeptid med Fc-område der varianten medierer antistoff-avhengig, cellemediert cytotoksisitet (ADCC) i nærvær av effektorceller, og omfatter minst én aminosyremodifikasjon i posisjon 247 i Fc-området. I visse utførelsesformer er

5 aminosyremodifikasjonen P247L. I andre utførelsesformer er aminosyremodifikasjonen P247I eller P247H.

Polypeptidvariantene som beskrives overfor, kan gjøres til gjenstand for ytterligere modifikasjoner, avhengig av den ønskede eller tilsiktede bruk av polypeptidet. Slike

10 modifikasjoner kan for eksempel involvere ytterligere endring av aminosyresekvensen (substitusjon, insersjon og/eller delesjon av aminosyrerester), karbohydratmodifikasjoner, fusjon til heterologe polypeptider og/eller kovalente modifikasjoner. Slike ytterligere modifikasjoner kan foretas før, samtidig med eller etter aminosyremodifikasjonene som beskrevet ovenfor, og som resulterer i endring av Fc-reseptorbindingen

15 og/eller ADCC-aktiviteten.

Alternativt eller i tillegg kan det være nyttig å kombinere aminosyremodifikasjoner med én eller flere ytterligere aminosyremodifikasjoner som endrer C1q-bindings- og/eller komplementavhengig cytotoksisitetsfunksjon i Fc-området. Startpolypeptidet av spesiell

20 interesse her, er ett som binder til C1q og viser komplementavhengig cytotoksisitet (CDC). Aminosyresubstitusjoner som beskrevet her, kan tjene til å endre evnen hos utgangspolypeptidet til å binde til C1q og/eller å modifisere dens komplements-avhengige cytotoksisitetsfunksjon (for eksempel å redusere og fortrinnsvis anskaffe disse effektorfunksjoner). Imidlertid er polypeptider omfattende substitusjoner på én

25 eller flere av de beskrevne posisjoner med forberet C1q-bindings- og/eller komplementavhengig cytotoksisitets(CDC)-funksjon, omfattet her. For eksempel kan utgangspolypeptidet være ute av stand til å binde C1q og/eller mediere CDC og kan modifiseres i henhold til den her beskrevne lære slik at den erverver disse ytterligere effektorfunksjoner. Videre kan polypeptider med preeksisterende C1q-bindingsaktivitet,

30 eventuelt videre med evnen til å mediere CDC, modifisere slik at én eller begge av disse aktiviteter forsterkes. Aminosyremodifikasjoner som endrer C1q og/eller modifiserer dens komplementavhengige cytotoksisitetsfunksjon, er beskrevet for eksempel i WO00/42072.

35 Som beskrevet ovenfor kan man designere et Fc-område eller en del derav med endret effektorfunksjon, for eksempel ved å modifisere CDC-aktiviteten og/eller ADCC-

aktiviteten. For eksempel kan man generere et variant-Fc-område med forbedret CDC-aktivitet og forbedret ADCC-aktivitet (for eksempel med både forbedret ADCC-aktivitet og forbedret CDC-aktivitet). Alternativt og når man ønsker at effektor-funksjonen reduseres eller avskaffes, kan man konstruere et variant-Fc-område med

5 redusert CDC-aktivitet og/eller redusert ADCC-aktivitet. I andre utførelsesformer kan man øke kun én av disse aktiviteter og eventuelt også redusere den andre aktivitet, for eksempel for å generere en Fc-områdevariant med forbedret ADCC-aktivitet, men redusert CDC-aktivitet og vise versa. I tillegg kan man konstruere et variant-Fc-område med modifisert bindingsaktivitet til FcRn, protein A og/eller andre Fc-bindings-

10 proteiner.

En hvilken som helst type aminosyresubstitusjon tjener til å endre glykosyleringsmønstret for polypeptidet. Dette kan for eksempel oppnås ved å deletere én eller flere karbohydratdeler som finnes i polypeptidet og/eller å addere ett eller flere glykosylerings-

15 seter som ikke er til stede i polypeptidet. Alternativt kan dette oppnås indirekte ved å endre aminosyrer andre enn glykosyleringsssetet eller ved å arbeide med cellene. Glykosylering av polypeptider er typisk enten N-linket eller O-linket. N-linket henviser til festing av karbohydratdelen på sidekjeden av en asparaginrest. Peptidsekvensene asparagin-X-serin og asparagin-X-treonin, der X er en aminosyre bortsett fra prolin, er

20 gjenkjenningsssekvensene for den enzymatiske festing av karbohydratdelen til asparagin-sidekjeden. Således skaper nærværet av en hvilken som helst av disse peptidsekvenser i et polypeptid, et potensielt glykosyleringssete. O-linket glykosylering henviser til festing av ett av sukrene N-aceylgalaktosamin, galaktose eller xylose til en hydroksy-aminosyre, og vanligvis serin eller treonin, selv om 5-hydroksyprolin eller 5-hydroksy-

25 lysin også kan benyttes.

Addisjon av glykosyleringsseter til polypeptidet gjennomføres hensiktsmessig ved å endre aminosyresekvensen slik at den inneholder én eller flere av de ovenfor nevnte tripeptidsekvenser (for N-linkede glykosyleringsseter). Endringen kan også foretas ved

30 addisjon av eller substitusjon med, én eller flere serin- eller treoninrester til sekvensen av det opprinnelige polypeptid (for O-linkede glykosyleringsseter). Et eksempel på glykosyleringsvariant har en aminosyresubstitusjon av rest Asn 297 av den tunge kjede.

I visse utførelsesformer tilveiebringer oppfinnelsen preparater omfattende en variant av

35 et opphavspolypeptid med et Fc-område, der varianten omfatter minst én overflate-restaminosyremodifikasjon (se for eksempel Deisenhofer, Biochemistry, 28;20(9):2361-

- 70, april 1981 og WO0042072, begge ansett som del av beskrivelsen). I andre utførelsesformer tilveiebringer oppfinnelsen preparater omfattende en variant av et opphavspolypeptid med et Fc-område, der varianten omfatter minst én ikke-overflaterest-aminosyremodifikasjon. I ytterligere utførelsesformer omfatter oppfinnelsen en variant
- 5 av et opphavspolypeptid med et Fc-område, der varianten omfatter minst én overflateaminosyremodifikasjon og minst én ikke-overflateaminosyremodifikasjon.

III. Kombinasjonsvarianter

- I visse utførelsesformer omfatter variantene ifølge oppfinnelsen to eller flere aminosyremodifikasjoner (for eksempel substitusjoner). Slike kombinasjonsvarianter kan for eksempel fremstilles ved å velge to eller flere av de ovenfor beskrevne aminosyremodifikasjoner. Tabell 1 nedenfor gir eksempler på kombinasjoner av to eller flere aminosyresubstitusjoner. For eksempel viser den første rekke i tabell 1 mulige kombinasjoner av P247H med andre aminosyresubstitusjoner i posisjonene 251, 256, 268,
- 15 280, 330, 332, 339, 378 og 440 (for eksempel viser denne rekke kombinasjoner av to, tre, fire, fem, seks, sju, åtte, ni og ti aminosyremodifikasjoner).

Tabell 1
Eksempler på kombinasjonsvarianter

20

Mutasjon	Posisjon									
	247	251	256	268	280	330	332	339	378	440
P247H		F	M, P	D, E	A, K	K, R	D, E	T	D	Y
P247I		F	M, P	D, E	A, K	K, R	D, E	T	D	Y
P247L		F	M, P	D, E	A, K	K, R	D, E	T	D	Y
L251F	H, I, L		M, P	D, E	A, K	K, R	D, E	T	D	Y
T256M	H, I, L	F		D, E	A, K	K, R	D, E	T	D	Y
T256P	H, I, L	F		D, E	A, K	K, R	D, E	T	D	Y
H268D	H, I, L	F	M, P		A, K	K, R	D, E	T	D	Y
H268E	H, I, L	F	M, P		A, K	K, R	D, E	T	D	Y
D280A	H, I, L	F	M, P	D, E		K, R	D, E	T	D	Y
D280K	H, I, L	F	M, P	D, E		K, R	D, E	T	D	Y
A330K	H, I, L	F	M, P	D, E	A, K		D, E	T	D	Y
A330R	H, I, L	F	M, P	D, E	A, K		D, E	T	D	Y
I332E	H, I, L	F	M, P	D, E	A, K	K, R		T	D	Y
I332D	H, I, L	F	M, P	D, E	A, K	K, R		T	D	Y

A339T	H, I, L	F	M, P	D, E	A, K	K, R	D, E		D	Y
A378D	H, I, L	F	M, P	D, E	A, K	K, R	D, E	T		Y
S440Y	H, I, L	F	M, P	D, E	A, K	K, R	D, E	T	D	

**** Merk at tabellen benytter EU-nummerering som i Kabat.**

Kombinasjonsvariantene som vist i tabell 1 og andre kombinasjonsvarianter (som de som er besrkevet i WO00-42072), kan testes for en gitt aktivitet (for eksempel FcR-bindingssaktivitet, ADCC-aktivitet og CDC-aktivitet) i et antall analyser (se for eksempel del IV nedenfor). I denne forbindelse kan brukbare kombinasjonsvarianter identifiseres.

I visse, foretrukne utførelsesformer har kombinasjonsvariantene ifølge oppfinnelsen én aminosyremodifikasjon som øker ADCC-aktivitet og én aminosyremodifikasjon som øker neonatal Fc-reseptor(FcRn)bindingsaffinitet (for eksempel ved pH 6,0, men ikke ved pH 7,0 eller 7,4). I andre utførelsesformer har kombinasjonsvariantene ifølge oppfinnelsen en overflateaminosyremodifikasjon og en ikke-overflateaminosyremodifikasjon. Ytterligere kombinasjonsvarianter kan genereres ved å kombinere to eller flere av aminosyremodifikasjonene som beskrevet her eller minst én av aminosyremodifikasjonene som beskrevet her, med de som er beskrevet i WO00/42072.

IV. Variantpolypeptidanalyser

Det er beskrevet forskjellige analyser for screening av Fc-områdevarianter.

Screeningsanalyser kan benyttes for å finne eller for å bekrefte brukbare varianter. For eksempel kan kombinasjonsvarianter (se tabell 1) screenes for å finne varianter med endret FcR-binding og/eller endret ADCC og/eller endret CDC-aktivitet (for eksempel økt eller redusert ADCC eller CDC-aktivitet) og/eller modifisert evne til å utarme målceller (for eksempel B-celler) fra fullblod. Også som beskrevet nedenfor, kan analysene benyttes for å finne eller bekrefte varianter som har fordelaktig terapeutisk aktivitet i et individ (for eksempelet menneske med symptomer på et antistoff eller immunoadhesinresponsiv sykdom). Et antall analysetyper kan benyttes for å evaluere enhver forandring i en variant sammenlignet med opphavspolypeptidet (se for eksempel screeningsanalysene i WO00/42072, ansett som del av beskrivelsen). Ytterligere eksempler på analyser er beskrevet nedenfor.

- I foretrukne utførelsesformer er variantene ifølge oppfinnelsen antistoffer som i det vesentlige bibeholder evnen til å binde antigen (via et ikke-modifisert antigenbindingsområde eller et modifisert antigenbindingsområde) sammenlignet med ikke-variant (opphavs)polypeptidet (for eksempel er bindingsevnen fortrinnsvis ikke dårligere enn
- 5 rundt 20 ganger eller ikke dårligere enn rundt 5 ganger den til ikke-variantpolypeptidet). Bindingsevnen for polypeptidvarianten til antigen kan bestemmes ved bruk av teknikker som ELISA, fluorescensaktivert celledaterings(FACS)analyser eller radioimmuno-presipitering (RIA) som eksempler.
- 10 Fc-reseptor(FcR)-bindingsanalyser kan benyttes for å dømme variantene ifølge oppfinnelsen. For eksempel kan binding av Fc-reseptorer som FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIII, FcRn og så videre, måles ved titrering av polypeptidvariant og å måle bundet polypeptidvariant ved bruk av et antistoff som spesifikt binder til polypeptidvarianten i et ELISA-format (se eksemplene nedenfor). For eksempel kan en variant omfattende et
- 15 antistoff, screenes i en standard ELISA-analyse for å bestemme binding til et FcRn ved pH 6,0 og pH 7,0 eller 7,4. En fast overflate belagt med streptavidin eller Neutravidin, kan benyttes for å fange biotinmerket FcRn fra en hvilken som helst spesies, som mus eller mennesker. Etter blokkering kan oppfangingsreseptoren inkuberes med variantpolypeptider (antistoffer) fortynnet i buffere ved pH 6,0 eller pH 7,0. I det følgende
- 20 trinn blir et molekyl som er spesifikt for humanantistoffer, tilsatt (for eksempel geite(Fab')₂-antihuman-Fab konjugert til et enzym). Deretter kan et substrat settes til for å bestemme mengden binding av variantpolypeptidet til det immobiliserte FcRn ved pH 6,0 eller pH 7,0 eller 7,4. Resultatene av denne analyse kan sammenlignes med opphavs(ikke-variant)polypeptidets evne til å binde den samme FcR. I andre utførelses-
- 25 former er komponentene for å gjennomføre en analyse (for eksempel med FcRn) for å screene varianter, pakket i et sett (for eksempel med bruksinstruksjoner).
- En antistoffavhengig, cellulær cytotoxissitets(ADCC)-analyse kan også benyttes for å screene varianter ifølge oppfinnelsen. ADCC-analyser kan gjennomføres *in vitro* eller
- 30 *in vivo*. For å bedømme ADCC-aktiviteten for en polypeptidvariant kan en *in vitro*-ADCC-analyse gjennomføres ved bruk av varierende effektor:målforhold. Et eksempel på ADCC-analyse kan benytte en målcellelinje som uttrykker et hvilket som helst av de følgende målantigener: CD20, CD22, CD33, CD40, CD63, EGF-reseptor, her-2-reseptor, prostataspesifikk membranantigen, Lewis Y-karbohydrat, GD₂- og GD₃-gangliosider, lamp-1, CO-029, L6 og ephA2. Effektorceller kan oppnås fra en frisk
- 35 donor (for eksempel på forsøksdagen) og PBMC renses ved bruk av Histopaque

- (Sigma). Målceller blir så preinkubert med en IgG-variant ved for eksempel 0,1-1 000 ng/ml i rundt 30 min før blanding med effektorceller ved et effektor:målforhold på for eksempel 40:1, 20:1 og 10:1. ADCC-aktivitet kan så måles kolorimetrisk ved bruk av et cytotoxissitetsdetekteringskit (Roche Molecular Biochemicals) for kvantitering av celledød og lysering basert på måling av laktatdehydrogenase(LDH)-aktiviteten frigitt fra cytosolen av skadede celler til supernatanten. ADCC-aktivitet kan også bestemmes for krom 51-ladete målcelleanalyser ved å måle det resulterende frigitte krom 51. Antistoffuavhengig, cellulær cytotoxissitet kan bestemmes ved å måle LDH-aktiviteten fra mål- og effektorceller i fravær av antistoff. Total frigivning kan måles etter tilsetning av 1 % Triton X-100 til blandingen av mål- og effektorceller. Inkubering av mål- og effektorceller kan gjennomføres for en optimalperiode (0,54-18 timer) ved 37 °C i 5,0 % CO₂ og så følges av sentrifugering av analyseplatene. Supernatantene kan så overføres til 96-brønners plater og inkuberes med LDH-detekteringsreagens i 30 min ved 25 °C. Prøveabsorbansen kan så måles ved 490 nm ved bruk av en mikropplateleser. Prosent cytotoxissitet kan så beregnes ved bruk av den følgende ligning: % cytotoxissitet = forsøksverdi - lav kontroll/høy kontroll - lav kontroll x 100 %. Prosent cytotoxissitet for anti-CD20 og varianter kan så sammenlignes direkte med like mengder RITUXAN for å gi måling av relativ effektivitet. Et eksempel på ADCC-analyse kan benytte SKW6.4-celler som overeksprimerer CD20-antigenet (for eksempel ervervet fra the American Type Culture Collection) som kilden for målceller. Mange variasjoner av denne analyse er velkjente på området (se for eksempel Zuckerman et al., CRC Crit Rev Mikrobiol 1978; 7(1):1-26).

- Brukbare effektorceller for slike analyser inkluderer, men er ikke begrenset til, naturlige dreper(NK)-celler, makrofager og andre perifere blodmononukleære celler (PBMC). Alternativt eller i tillegg kan ADCC-aktiviteten for polypeptidvariantene ifølge oppfinnelsen bedømmes *in vivo*, for eksempel i en dyremodell som den som er beskrevet av Clynes et al. i PNAS (USA) 95:652-656 (1998). Variantene ifølge oppfinnelsen kan også screenes for komplementaktivering. For å bedømme komplementaktivering kan det gjennomføres en komplementavhengig cytotoxissitets(CDC)-analyse (se for eksempel Gazzano-Santoro et al. i J. Immunol. Methods, 202:163 (1996)). For eksempel kan forskjellige konsentrasjoner av polypeptidvariantene og humankomplementet fortynnes med buffer. Celler som uttrykker antigenet hvortil polypeptidvarianten binder, kan fortynnes til en densitet på rundt 1×10^6 celler/ml. Blandinger av polypeptidvariant, fortynnet humankomplement og celler som uttrykker antigenet, kan settes til en flatbunnet vevskultur 96-brønners plate og inkuberes i 2

timer ved 37 °C og 5 % CO₂ for å lette komplementmediert cellelysering. 50 µl alamar-blue (Accumed International) kan så settes til hver brønn og inkuberes over natten ved 37 °C. Absorbansen kan måles ved bruk av et 96-brønners fluorimeter med en eksitering ved 530 nm og emisjon ved 590 nm. Resultatene kan uttrykkes i relative fluorescensenheter (RFU). Prøvekonsentrasjonene kan beregnes fra en standardkurve og prosentaktivitet sammenlignet med ikke-variantpolypeptid, kan rapporteres for polypeptidvarianten av interesse.

I visse utførelsesformer aktiverer variantene ifølge oppfinnelsen ikke komplement. For eksempel viser en polypeptidvariant rundt 0-10 % CDC-aktivitet i denne analyse sammenlignet med et kontrollantistoff med et ikke-mutert IgG1-Fc-område. Fortrinnsvis synes varianten ikke å ha noen CDC-aktivitet (for eksempel over bakgrunnen) i den ovenfor nevnte CDC-analyse. I andre utførelsesformer finnes variantene ifølge oppfinnelsen å ha økt CDC sammenlignet med et opphavspolypeptid (viser for eksempel rundt 2 ganger til rundt 100 ganger (eller større) forbedring av CDC-aktivitet *in vitro* eller *in vivo* når IC₅₀-verdiene sammenlignes).

Variantene ifølge oppfinnelsen kan også screenes for utarming av målceller i en fullblodanalyse. For eksempel kan forskjellige konsentrasjoner av polypeptidvarianten med CD20-målspesifisitet screenes for utarming av B-celler i en fullblodanalyse ved bruk av fac'er (Vugmeyster et al., 2003 Cytometry 52A, 101-109). Nytrukket blod inkuberes med varierende konsentrasjoner av polypeptidvariant ved 37 °C og 5 % CO₂ i 4 timer (tiden kan varieres). Etter inkubering blir røde blodlegemer lysert i henhold til produsentens retningslinjer med en ammoniumkloridreagens (Beckton-Dickinson katalog nr. 555899) og B-celler detekteres ved fac'er ved bruk av et fluorescentmerket antistoff som er spesifikt for B-celler (for eksempel anti-CD19). Resultatene kan uttrykkes som % utarming av B-celler i forhold til enten en ubehandlet prøve eller en prøve inkubert med et irrelevant (ikke-utarmende) antistoff.

I foretrukne utførelsesformer utarmer variantene B-celler mer effektivt enn opphavspolypeptidet. En variant kan utarme B-celler for eksempel til en faktor rundt 2 eller høyere, og fortrinnsvis en faktor rundt 5 eller høyere. Videre kan en variant vise større potens med henblikk på utarming av B-celler. For eksempel kan en variant utarme den samme prosentandel av B-celler i forhold til opphavspolypeptid, men å benytte en mindre mengde med en faktor rundt 5 og fortrinnsvis mindre med en faktor rundt 10 av antistoffet. Målcelleutarming som medieres av varianter, kan være rundt 5 til rundt

100 ganger, og er fortrinnsvis rundt 5 til rundt 1 000 ganger forbedret sammenlignet med opphavspolypeptidet.

Variantene ifølge oppfinnelsen kan også screenes *in vivo*. En hvilken som helst type av
 5 *in vivo*-analyse kan benyttes. Et spesielt eksempel på én type analyse tilveiebringes
 nedenfor. Dette eksempel på analyse tillater preklinisk evaluering av Fc-varianten *in*
vivo. En variant for testing kan innarbeides i Fc-området av et spesielt antistoff som er
 kjent for å ha en viss aktivitet. For eksempel kan en variant innarbeides i Fc-området av
 et anti-CD20-IgG ved mutagenese. Dette tillater at en parental IgG og en Fc-variant IgG
 10 direkte kan sammenlignes med RITUXAN (kjent for å fremme tumorregresjon). Den
 prekliniske evaluering kan foretas i 2 faser (en farmakokinetisk og en farmakodynamisk
 fase). Formålet med fase I-farmakokinetiske studier er å bestemme hvorvidt det er for-
 skjeller i klaringshastigheten mellom en Fc-variant IgG og antistoffet med kjent *in vivo*-
 aktivitet (for eksempel RITUXAN). Forskjeller i klaringshastighet kan forårsake
 15 differanser i stabiltilstandsnivået av IgG i serum. Hvis differanser i stabiltilstands-
 konsentrasjonene detekteres, bør disse som sådanne normaliseres for å umuliggjøre
 nøyaktige sammenligninger. Formålet med fase II-farmakodynamiske studier er å
 bestemme effekten av Fc-mutasjoner på, i dette tilfellet, tumorvekst. Tidligere studier
 med RITUXAN benyttet en enkel dose som fullstendig inhiberte tumorvekst. Fordi
 20 dette ikke tillot måling av kvantitative forskjeller, bør et doseområde benyttes.

Fase I-farmakokinetisk sammenligning av en Fc-variant, villtype parental Fc og
 RITUXAN, kan gjennomføres på følgende måte. Først kan 40 µg pr. dyr injiseres
 intravenøst og plasmanivået for IgG kvantiteres ved 0, 0,25, 0,5, 1, 24, 48, 72, 96, 120,
 25 168 og 336 timer. Data kan tilpasses for eksempel ved bruk av et farmakokinetisk
 program (WinNonLin) ved bruk av en null-lag toroms farmakokinetisk modell for å
 oppnå en klaringshastighet. Klaringshastigheten kan benyttes for å definere stabil
 tilstandsplasmanivå med den følgende ligning: $C = \text{dose}/(\text{klaringshastighet} \times \tau)$, der τ er
 intervallet mellom dosene og C er plasmanivået ved stabil tilstand. Farmakokinetiske
 30 forsøk kan gjennomføres i ikke-tumorbærende mus med for eksempel et minimum på
 5 mus pr. tidspunkt.

En dyremodell kan benyttes for den neste fase på følgende måte. Den høyre flanke av
 CB17-SCID-mus kan implanteres med 10^6 Raji-celler, subkutan. En intravenøs bolus
 35 av Fc-varianten, villtype Fc og RITUXAN, kan påbegynnes umiddelbart etter
 implantering og fortsettes inntil tumorveksten er større enn en diameter på 2 cm.

Tumorvolumet kan så bestemmes hver mandag, onsdag og fredag ved å måle lengde, bredde og dybde av tumoren ved bruk av en skyvelær (tumorvolum = $W \times L \times D$). Et plott av tumorvolum versus tid vil gi tumorveksthastighet for den farmakodynamiske beregning. Et minimum på rundt 10 dyr pr. gruppe bør benyttes.

5

Fase II-farmakodynamisk sammenligning av Fc-varianten, villtype Fc og RITUXAN, kan gjennomføres på følgende måte. Basert på publiserte data inhiberte RITUXAN ved 10 µg/g ukentlig fullstendig tumorvekst *in vivo* (Clynes et al. i Nat. Med. 2000 april; 6(4):443-6, 2000). Derfor kan et ukentlig doseringsområde på 0 µg/g, 5 µg/g, 1 µg/g, 10 0,5 µg/g og 0 µg/g testes. Stabiltilstandplasmanivået ved hvilket tumorveksthastigheten inhiberes med 50 %, kan bestemmes grafisk ved sammenhengen mellom stabiltilstandsplasmanivå og effektivitet. Stabiltilstandsplasmanivået kan beregnes som beskrevet ovenfor. Hvis nødvendig kan τ justeres i henhold til hver Fc-variant og Fc-villtypen avhengig av deres farmakokinetiske egenskaper for å oppnå sammenlignbart 15 stabiltilstandsplasmanivå som RITUXAN. Statisk forbedrede, farmakodynamiske verdier av Fc-varianten sammenlignet med det parentale polypeptid (for eksempel Fc-villtype) og RITUXAN, vil generelt antyde at Fc-varianten gir forbedret aktivitet *in vivo*.

20 Ytterligere farmakodynamisk sammenligning av Fc-varianten, villtype Fc og RITUXAN, kan gjennomføres i cynomolgøse aper som beskrevet tidligere (Reff et al., Blood 83, 435-445, 1994). En doserespons for utarming av perifere B-celler og lymfeknute B-celler kan benyttes for å sammenligne de relative potenser av Fc-varianten med villtype Fc og RITUXAN, administrert intravenøst og/eller subkutan. Statisk for- 25 bedrede, farmakodynamiske verdier av Fc-varianten sammenlignet med det parentale polypeptid (for eksempel Fc-villtypen) og RITUXAN, vil generelt indikere at Fc-varianten gir forbedret aktivitet *in vivo*.

I ytterligere utførelsesformer blir variantene ifølge oppfinnelsen screenet slik at 30 varianter som er nyttige for terapeutisk anvendelse i minst to spesies, identifiseres. Slike varianter angis her som "dual-spesiesforbedrede varianter" og er spesielt nyttige for å identifisere varianter som er terapeutiske i mennesker og som også viser (eller sannsynligvis vil vise) effektivitet i en dyremodell. I denne forbindelse tilveiebringer foreliggende oppfinnelse metoder for å identifisere varianter som har en sterk sjanse for å 35 kunne godkjennes for humanklinisk testing fordi animalmodelldata sannsynligvis vil

understøtte enhver human testanvendelse som foretas i henhold til offisielle reguleringsorganisasjoner (for eksempel U.S. Food and Drug Administration).

- I visse utførelsesformer blir dualspesiesforbedrede varianter identifisert ved først å gjennomføre en ADCC-analyse ved bruk av humaneffektorceller for å finne forbedrede varianter, og så å gjennomføre en andre ADCC-analyse ved bruk av muse-, rotte- eller ikke-human primat-effektorceller for å identifisere et subsett av de forbedrede varianter som er dualspesiesforbedrede varianter. I noen utførelsesformer tilveiebringer oppfinnelsen fremgangsmåter for å identifisere dualspesiesforbedrede varianter omfattende:
- 5 a) å tilveiebringe i) målceller, ii) et preparat omfattende en kandidatvariant av et opphavspolypeptid med minst en andel av et Fc-område, der kandidatvarianten omfatter minst en aminosyremodifikasjon i Fc-området og der kandidatvarianten medierer målcellecytotoksisitet i nærvær av en første spesies (for eksempel menneske) av effektorceller mer effektivt enn opphavspolypeptidet, og iii) andre spesies (for eksempel mus,
 - 10 rotte eller ikke-human primat) effektorceller, og b) å inkubere preparatet med målcellene under betingelser slik at kandidatvarianten binder målcellene og derved genererer kandidatvariantbundne målceller, c) å blande de andre spesies-effektorcellene med de kandidatvariantbundne målceller, og d) å måle målcellecytotoksisiteten som medieres av kandidatvarianten. I visse utførelsesformer omfatter metoden videre trinn e)
 - 15 omfattende å bestemme hvorvidt kandidatvarianten medierer målcellecytotoksisitet i nærvær av andre spesies-effektorceller mer effektivt enn opphavspolypeptidet. I noen utførelsesformer omfatter metoden videre trinn f) for identifisering av en kandidatvariant som en dualspesiesforbedret variant som medierer målcellecytotoksisitet i nærvær av de andre spesies-effektorcellene mer effektivt enn opphavspolypeptidet. I fore-
 - 20 trukne utførelsesformer blir de identifiserte dualspesiesvarianter screenet *in vivo* i én eller flere dyreanalyser.

- I visse utførelsesformer blir dualspesiesforbedrede varianter identifisert ved først å gjennomføre en fullblodanalyse ved bruk av humanblod for å finne forbedrede varianter, og så å gjennomføre en andre fullblodanalyse ved bruk av muse-, rotte- eller ikke-human primatblod for å identifisere et subsett av de forbedrede varianter som er dualspesiesforbedrede varianter. I noen utførelsesformer tilveiebringer oppfinnelsen metoder for å identifisere dualspesiesforbedrede varianter omfattende: a) å tilveiebringe
- 30 i) målceller, ii) et preparat omfattende en kandidatvariant av et opphavspolypeptid med minst en andel av et Fc-område, der kandidatvarianten omfatter minst en aminosyremodifikasjon i Fc-området og der kandidatvarianten medierer målcellearming i nærvær
 - 35

av en første spesies (for eksempel human) av blod mer effektivt enn opphavspolypeptidet, og iii) andre spesies (for eksempel mus-, rotte- eller ikke-human primat-) blod, og b) å inkubere preparatet med målcellene under betingelser slik at kandidatvarianten binder til målcellene og derved genererer kandidatvariantbundne målceller, c) å blande
 5 andre spesiesblod med de kandidatvariantbundne målceller, og d) å måle målcelleutarming som medieres av kandidatvarianten. I visse utførelsesformer omfatter metoden videre trinn e) å bestemme hvorvidt kandidatvarianten medierer målcelleutarming i nærvær av andre spesiesblod mer effektivt enn opphavspolypeptidet. I noen utførelsesformer omfatter metoden videre trinn f) for identifisering av en kandidatvariant som en
 10 dualspesiesforbedret variant som medierer målcelleutarming i nærvær av andre spesiesblod mer effektivt en opphavspolypeptidet. I foretrukne utførelsesformer blir de identifiserte dualspesiesvarianter så screenet *in vivo* i én eller flere dyreanalyser.

I visse utførelsesformer blir dualspesiesforbedrede varianter identifisert ved å gjennom-
 15 føre en hvilken som helst av analysene ovenfor ved bruk av humankomponenter (for eksempel humanceller, human-Fc-reseptorer og så videre) for å identifisere forbedrede varianter, og så å gjennomføre de samme analyser (eller en annen analyse) med ikke-humane, animale komponenter (for eksempel museceller, muse-Fc-reseptorer og så videre). I denne forbindelse kan et undersett av varianter som virker godt i henhold til et
 20 gitt kriterium i både humanbaserte analyser og andre spesiesbaserte analyser, identifiseres.

Et eksempel på en prosess for å identifisere dualspesiesforbedrede varianter er som følger. Først blir en nukleinsyresekvens som koder minst en del av et IgG-område,
 25 mutert slik at aminosyresekvensen som uttrykkes, har minst én aminosyreforandring, for derved å generere en variant. Denne uttrykte IgG-variant karakteriseres så i en ADCC-analyse ved bruk av human-PBMC'er eller et undersett (for eksempel NK-celler eller makrofager). Hvis forsterket ADCC-aktivitet finnes, blir varianten så screenet i en andre ADCC-analyse ved bruk av muse- eller rotte-PBMC'er. Alternativt eller i tillegg
 30 kan en analyse gjennomføres med varianten for binding til klonede gnagerreseptorer eller -cellelinjer. Hvis til slutt varianten finnes å være forbedret i den andre analyse, noe som gjør den til en dualforbedret variant, blir så varianten screenet *in vivo* i mus eller rotter.

35 V) Eksempler på variant-Fc-områdeholdige molekyler

Variant-Fc-områdene ifølge oppfinnelsen kan være en del av store molekyler. De større molekyler kan for eksempel være monoklonale antistoffer, polyklonale antistoffer, kimeriske antistoffer, humaniserte antistoffer, bispesifikke antistoffer, immunoadhesiner og så videre. Som sådanne er det klart at det er et bredt område av anvendelsesmuligheter for variant-Fc-områdene ifølge oppfinnelsen.

A. Antistoffer inneholdende variant-Fc-områder

I foretrukne utførelsesformer er variant-Fc-områdeholdige molekyler (for eksempel polypeptid) et antistoff. Teknikker for å produsere antistoffer er beskrevet nedenfor.

10

(i) Antigenseleksjon og -fremstilling

Generelt gjelder at når det variant-Fc-områdeholdige molekyl er et antistoff, er antistoffet rettet mot et antigen av interesse. Fortrinnsvis er antigenet et polypeptid og administrering av antistoffet til et pattedyr som lider av en sykdom eller forstyrrelse, kan resultere i en terapeutisk fordel for dyret. Imidlertid kan det også benyttes antistoffer rettet mot ikke-polypeptidantigener (som tumorassosierte glykolipidantigener, se for eksempel US 5 091 178).

Eksempler på antigener inkluderer, men er ikke begrenset til, molekyler som renin; et veksthormon, inkludert humanveksthormon og bovinveksthormon; veksthormon-frigivende faktor; paratyroidhormon; tyroidstimulerende hormon; lipoproteiner; α -1-antitrypsin; insulin-A-kjede; insulin B-kjede; proinsulin, follikkelstimulerende hormon; calcitonin; luteiniserende hormon; glukagon; klumpingsfaktorer som faktor VIIIc, faktor IX, vevsfaktor (TF) og von Willebrands faktor; antiklumpingsfaktorer som protein C; atrial-natriuretisk faktor; lungesurfaktant; en plasminogenaktivator som urokinase eller humanurin- eller vevstypeplasminogenaktivator (t-PA); bombesin; trombin; hemopoietisk vekstfaktor; tumornekrosefaktor- α og - β ; enkefalinase; RANTES (regulert ved aktivering av normal T-celleuttrykt og -sekretet); humanmakrofag-inflammatorisk protein (MIP-1- α); et serumalbumin som humanserumalbumin; Muellerian-inhiberende substans; relaxin A-kjede; relaxin B-kjede; prorelaxin; musegonadotropinassosiert peptid; et mikrobielt protein, som β -laktamase; DNase; IgE; et cytotoksisk T-lymfocytassosiert antigen (CTLA), som CTLA-4; inhibin; aktivin; vaskulær endotelialcellevekstfaktor (VEGF); reseptorer for hormoner eller vekstfaktorer; protein A eller D; reumatoidfaktorer; en neurotrofisk faktor som beinavledet neurotrofisk faktor (BDNF), neurotrofin-3, -4, -5, eller -6 (NT-3, NT-4, NT-5 eller NT-6) eller en nervevekstfaktor; plateavledet vekstfaktor (PDGF); fibroblastvekstfaktor som

- α FGF og β FGF; epidermal vekstfaktor (EGF); transformerende vekstfaktor (TGF) som TGF- α og TGF- β , inkludert TGF- 1, TGF- 2, TGF- 3, TGF- 4 eller TGF- 5; insulinlignende vekstfaktor-I og -II (IGF-I og IGF-II); des (1-3)-IGF-I (hjerne IGF-I), insulinlignende vekstfaktorbindende proteiner; CD-proteiner som CD3, CD4, CD8, CD19 og
- 5 CD20; erythropoietin; osteoinduktive faktorer; immunotoksiner; et beinmorfogenetisk protein (BMP); et interferon som interferon- α , - β og - γ ; kolonistimulerende faktorer (CSF'er), for eksempel M-CSF, GM-CSF og G-CSF; interleukiner (IL'er), for eksempel IL-1 til IL-10; superoksiddismutase; T-cellerreseptorer; overflatemembranproteiner; nedbrytningsakselererende faktor; viralantigen som for eksempel en del av AIDS-
- 10 konvolutten; transportproteiner; homing-reseptorer; addressiner; regulatoriske proteiner; integriner som CD11 a, CD11 b, CD11c, CD18, et ICAM, VLA-4 og VCAM; et tumor-assosiert antigen som HER2-, HER3- eller HER4-reseptor; et medlem av en apoptose-vei; og fragmenter av hvilke som helst av de ovenfor anførte polypeptider.
- 15 Foretrukne antigener inkluderer, men er ikke begrenset til, CD-proteiner som CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 og CD34; medlemmer av ErbB-reseptorfamilien som EGF-reseptoren, HER2-, HER3- eller HER4-reseptor; celledhesjonsmolekyler som LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, α 4/p7 integrin og (Xv/p3 integrin som inkluderer enten en (?) eller subenheter derav (for eksempel anti-CD11a-, anti-CD18-
- 20 eller anti-CD11b-antistoffer); vekstfaktorer som VEGF; vevfaktor (TF); α -interferon (α -IFN); et interleukin, som IL-8; IgE; blodgruppeantigener; flk2/flt3-reseptor; obesitets-(OB)-reseptor; mpl-reseptor; CTLA-4; protein C og så videre.

- Oppløselige antigener eller fragmenter derav, eventuelt konjugert til andre molekyler,
- 25 kan benyttes som immunogener for generering av antistoffer. For transmembranmolekyler som reseptorer, fragmenter av disse (for eksempel det ekstracellulære domenet av en reseptor), kan benyttes som immunogenet. Alternativt kan celler som uttrykker transmembranmolekylet, benyttes som immunogen. Slike celler kan avledes fra en naturlig kilde (for eksempel cancercellelinjer) eller kan være celler som er trans-
- 30 formert ved rekombinante teknikker for å uttrykke det transmembrane molekyl. Andre antigener og former derav som er nyttige for fremstilling av antistoffer, vil være åpenbare for fagmannen.

(ii) Polyklonale antistoffer

- 35 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer polyklonale antistoffer med variant-Fc-områder. For eksempel kan et humant immunoglobulinrepertoar, inneholdende modifiserte G1-

konstante områder, transplanteres inn i immunoglobulininaktiverte mus og resultere i mus som uttrykker et IgG-repertoar inneholdende modifiserte Fc-områder (se for eksempel Mendez, MJ et al., Nature Genetics 15:146 (1997)). Polyklonale antistoffer dyrkes fortrinnsvis i dyr ved flere subkutane (sc) eller intraperitoneale (ip) injeksjoner av det relevante antigen og en adjuvans. Det kan være nyttige å konjugere det relevante antigen til et protein som er immunogenisk i spesies som skal immuniseres (for eksempel nøkkelhull-limpet hemocyanin, serumalbumin, bovintyroglobulin eller soyabønne-tyrpsininhibitor) ved bruk av et bifunksjonelt eller derivatiserende middel (for eksempel maleimidobenzoylsulfosuccinimidester for konjugering gjennom cysteinrester, N-hydroksysuccinimid for konjugering gjennom lysinrester, glutaraldehyd, ravsyreanhydrid, SOCl_2 eller $\text{R1N}=\text{C}=\text{NR}$, der R og R1 er forskjellige alkylgrupper.

Eksempler på en generell immuniseringsprosess for en kanin og mus er som følger.

Dyrene immuniseres mot antigenet, immunogene konjugater eller derivater ved å kombinere for eksempel 100 µg eller 5 µg av proteinet eller konjugatet (for eksempel for en kanin henholdsvis mus) med 3 volumer Freund's komplette adjuvans og så å injisere oppløsningen intradermalt ved flere seter. Én måned senere blir dyrene boosted med 1/5 eller 1/10 av den opprinnelige mengde av peptid eller konjugat i Freund's komplette adjuvans ved subkutan injeksjon ved multiple seter. 7 til 14 dager senere tappes dyrene og serum analyseres på antistofftiter. Dyrene boosted inntil titeren jevner seg ut. Fortrinnsvis blir dyrene boosted med konjugatet av samme antigen, men konjugert til et annet protein og/eller via en annen fornetningsreagens. Konjugater kan også lages i rekombinant cellekultur som proteinfusjoner. I tillegg er aggregeringsmidler som alum, hensiktsmessig å benytte for å forsterke immunresponsen.

(ii) Monoklonale antistoffer

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer monoklonale antistoffer med variant-Fc-områder. Monoklonale antistoffer kan tildannes på et antall måter inkludert ved bruk av hybridomametoden (for eksempel som beskrevet av Kohler et al., Nature, 256: 495, 1975, ansett som del av beskrivelsen) eller ved rekombinante DNA-metoder (for eksempel US 4 816 567).

I hybridomametoden blir en mus eller et annet egnet vertsdyr, for eksempel en hamster eller en makakape, immunisert for å elisitere lymfocytter som produserer eller er i stand

til å produsere antistoffer som spesifikt vil binde til proteinet som benyttes for immunisering. Alternativt kan lymfocytter immuniseres *in vitro*. Lymfocytter fuseres så med myelomaceller ved bruk av et egnet fuseringsmiddel som polyetylenglykol for å danne en hybridomacelle. Hybridomacellene som fremstilles på denne måte, sås ut og bygges i et egnet kulturmedium som fortrinnsvis inneholder ett eller flere stoffer som inhiberer veksten eller overlevelsen av de ikke-fuserte, parentale myelomaceller. Hvis for eksempel de parentale myelomaceller mangler enzymet hypoksantinguaninfosforibosyltransferase (HGPRT eller HPRT), vil kulturmediet for disse hybridomaer karakteristisk inkludere hypoksantin, aminopterin og tymidin (HAT-medium), hvilke substanser forhindrer veksten av HGPRT-mangelfulle celler.

Foretrukne myelomaceller er de som fuserer effektivt, understøtter stabilhøynivå-produksjon av antistoff av de valgte antistoffproduserende celler og er sensitive for medium som HAT-medium. Blant disse er foretrukne myelomacellelinjer murin-myelomaliner som de som avledes fra MOPC-21- og MPC-11-musetumorer som er tilgjengelige fra the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA og SP-2- eller X63-Ag8-653-celler som er tilgjengelige fra the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. Humanmyeloma- og musehumanhetero-myelomacellelinjer er også beskrevet for fremstilling av humanmonoklonale antistoffer (se for eksempel Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984)).

Kulturmedium hvori hybridomaceller dyrkes, analyseres på produksjon av monoklonale antistoffer rettet mot antigenet. Fortrinnsvis bestemmes bindingsspesifisiteten for monoklonale antistoffer som fremstilles av hybridomaceller ved immunopresipitering eller ved en *in vitro*-bindingsanalyse, som radioimmunoanalyse (RIA) eller enzymlinket immunoabsorbentanalyse (ELISA). Etter at hybridomaceller som produserer antistoffer med ønsket spesifisitet, affinitet og/eller aktivitet, er identifisert, kan klonene subklones ved begrensede fortynningsprosedyrer og dyrkes ved standard metoder. Egnede kulturmedier for dette formål inkluderer for eksempel D-MEM- eller RPMI-1640-medium. I tillegg kan hybridomaceller dyrkes *in vivo* som ascitestumorer i et dyr. De monoklonale antistoff som skilles ut av subklonene, blir hensiktsmessig separert fra kulturmediet, ascitesfluid eller serum, ved konvensjonelle immunoglobulinrensprosedyrer som for eksempel protein A-sefarose, hydroksylapatittkromatografi, gelelektroforese, dialyse eller affinitetskromatografi.

DNA som koder det monoklonale antistoff, isoleres og sekvenseres ved bruk av konvensjonelle prosedyrer (for eksempel ved bruk av oligonukleotidprober som er i stand til å binde spesifikt til gener som koder de tunge og lette kjeder av de monoklonale antistoffer). Hybridomacellene tjener som foretrukket kilde for slik DNA. Når den først er isolert kan denne DNA anbringes i ekspresjonsvektorer som så transfekteres til vertsceller som *E. coli*-celler, simian-COS-celler, kinesiske hamsterovarie(CHO)-celler eller myelomaceller som ikke ellers produserer immunoglobulinprotein for å oppnå syntesen av monoklonale antistoffer i de rekombinante vertsceller. Rekombinant produksjon av antistoffer er beskrevet i større detaljer nedenfor.

10

I noen utførelsesformer blir antistoffer eller antistoff-fragmenter isolert fra antistoff-fagbiblioteker som er generert ved bruk av de teknikker som for eksempel er beskrevet av McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) og Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) beskriver isoleringen av murin- henholdsvis humanantistoffer ved bruk av fagbiblioteker. Etterfølgende publikasjoner beskriver fremstilling av høyaffinitet (nM-område) humanantistoffer ved kjedeshuffling (Marks et al., *BioTechnology*, 10: 779-783 (1992)), så vel som kombinatorisk infeksjon og *in vivo*-rekombinering som en strategi for å konstruere meget store fagbiblioteker (se for eksempel Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265-2266 (1993)). Således er disse teknikker og tilsvarende teknikker brukbare alternativer til tradisjonelle, monoklonale antistoffhybridomateknikker for isolering av monoklonale antistoffer.

Videre kan dette DNA modifiseres for eksempel ved å substituere den kodende sekvens for det human tung- og lett kjedekonstante området i stedet for de homologe murin-sekvenser (se for eksempel US 4 816 567 og Morrison, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 81: 6851 (1984)) eller ved kovalent til den immunoglobulinkodende sekvens å forene hele eller deler av den kodende sekvens for et ikke-immunoglobulinpolypeptid.

Typisk blir slike ikke-immunoglobulinpolypeptider satt i stedet for de konstante domener av et antistoff eller de settes i stedet for de variable domener av ett antigen-kombinerende sete av et antistoff for å skape et kimerisk, bivalent antistoff omfattende et antigenkombinerende sete med spesifisitet for et antigen og et andre antigen-kombinerende sete med spesifisitet for et annet antigen.

35

(iv) Humaniserte og humanantistoffer

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer humaniserte og humanantistoffer med variant-Fc-område. I foretrukne utførelsesformer omfatter et humanisert antistoff humanantistoffaminosyresekvenser sammen med aminosyrerester som ikke er fra et humanantistoff. I visse utførelsesformer er humansekvensene et humanisert antistoff som omfatter rammeverksområder (Fr'er) og sekvensene eller rester som ikke er fra et humanantistoff omfatter ett eller flere komplementaritetsbestemmende områder (CDR'er).

Det er verdt å merke seg at FR'er og CDR'er kan defineres basert på aminosyrerestnummerering i de tung- og lett kjedevariable områder. Uttrykket komplementaritetsbestemmende område eller CDR er ment å bety de ikke-tilstøtende antigenkombinerende seter som finnes i det variable området av både tung- og lett kjedepolypeptider. Disse områder er definert av Kabat et al. (J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977) og Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest (1991); "Kabat"), Chothia et al. (J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); "Chothia") og MacCallum et al. (J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996); "MacCallum"), der definisjonene inkluderer overlapping eller subset av aminosyrerester sammenlignet med hverandre. Ikke desto mindre er applikeringen av en hvilken som helst av disse definisjoner, alene (som Kabat-definisjonen) eller i kombinasjon (som eksempel den kombinerte definisjon av Kabat og Chothia) for å henvise til en CDR av et antistoff (inkludert et humanisert antistoff), ment å ligge innenfor rammen av begrepet som definert og benyttet her. Aminosyrerestene som omfatter CDR'ene som definert ved hver av de ovenfor angitte referanser, er gitt nedenfor i tabell 6 som sammenligning.

Tabell 6
CDR-definisjoner

	Kabat	Chothia	MacCallum
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58
V _H CDR3	95-102	96-101	93-101
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96

Videre er uttrykket "rammeverk" når det benyttes under henvisning til et antistoffvariabelt område, ment å bety alle aminosyrerester utenfor CDR-områdene innen det

variable området av et antistoff. Derfor har et variabelt områderammeverk en lengde mellom 100-120 aminosyrer, men er ment å henvise kun til disse aminosyrer utenfor CDR'ene. Uttrykket "rammeverksområde" er ment å bety hvert domene av rammeverket som er separert av CDR'ene. De spesifikke eksempler på tungkjedevariabelt område og for CDR'ene som definert av Kabat, tilsvarer derfor rammeverksområde 1 (FR1) domenet av variabelt område som omfatter aminosyrene 1-30; området 2 (FR2) tilsvarer domenet av det variable området omfattende aminosyrene 36-49; området 3 (FR3) tilsvarer domenet av det variable området omfattende aminosyrene 66-94 og området 4 (FR4) tilsvarer domenet av det variable området fra aminosyre 103 til slutten av det variable området. Rammeverksområdene for den lette kjede er tilsvarende separert ved hver av de lettkjedevariable område-CDR'er. Ved på samme måte å benytte definisjonen av CDR'er i henhold til Chothia eller MacCallum eller en hvilken som helst kombinasjon av CDR-definisjoner, er rammeverksgrensene atskilt av de respektive CDR-termini som beskrevet ovenfor. Uansett de mange definisjoner av CDR'er er det i noen utførelsesformer foretrukket å benytte Kabat-definisjonen for å definere CDR'er.

Restene i et humanisert antistoff som ikke er fra et humanantistoff, kan være rester eller sekvenser som er importert fra eller avledet fra andre spesies (inkludert, men ikke begrenset til, mus) eller disse sekvenser kan være tilfeldige aminosyresekvenser (for eksempel generert fra randomiserte nukleinsyresekvenser) som er skutt inn i den humaniserte antistoffsekvens. Som angitt ovenfor er humanaminosyresekvensen i et humanisert antistoff fortrinnsvis rammeverksområdet, mens restene som ikke er fra et humant antistoff (uansett om det er avledet fra en andre spesies eller tilfeldige aminosyresekvenser), fortrinnsvis tilsvarer CDR'ene. I visse utførelsesformer kan imidlertid ett eller flere rammeverksområder inneholde én eller flere ikke-humanaminosyrerester. Når det gjelder endringer eller modifikasjoner (for eksempel ved innføring av en ikke-humanrest) til et ellers humant rammeverk, er det mulig at de endrede eller modifiserte rammeverksområder ligger nær en modifisert CDR fra en annen spesies eller en tilfeldig CDR-sekvens, mens i en annen utførelsesform, et andre rammeverksområde ikke er nabo til en endret CDR-sekvens fra en andre spesies eller den tilfeldige CDR-sekvens. I noen utførelsesformer er rammeverksekvensen av et humanisert antistoff helt og holdent humant (det vil si at det ikke er foretatt noen rammeverksforandringer på humanrammeverket). I foretrukne utførelsesformer er rammeverksekvensen av et humanisert antistoff helt og holdent en human germlinje (det vil si at ingen rammeverksforandringer er foretatt på humangermlinjerammeverket).

Ikke-humane aminosyrerester fra andre spesies eller en tilfeldig sekvens, angis ofte som "import"-rester som typisk er hentet fra et "import"-variabelt domene. Humanisering kan i det vesentlige gjennomføres ved å følge metoden i henhold til Winter et al. (for eksempel Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)) ved å benytte gnager (eller andre pattedyr) CDR'er eller CDR-sekvenser i stedet for de tilsvarende sekvenser av et humanantistoff. Videre er antistoffer der i det vesentlige mindre enn et intakt humanvariabelt domene er substituert med den tilsvarende sekvens fra en ikke-human spesies, også generert (for eksempel US 4 816 567). I praksis er humaniserte antistoffer typiske humanantistoffer hvori noen CDR-rester og eventuelt noen FR-rester er erstattet med rester fra analogseter i gnagerantistoffer eller som angitt ovenfor, hvori CDR-sekvenser er erstattet med tilfeldige sekvenser. Som ikke-begrensede eksempler er metoder for å gi donor CDR-bindingsaffinitet på et antistoffvariabelt områderammeverk, beskrevet i WO 01/27160 A1, ansett som del av beskrivelsen, samt i USSN 09/434 870 og 09/982 464.

Valget av humanvariable domener, både lette og tunge, for anvendelse ved tildanning av de humaniserte antistoffer, er viktig for å redusere antigenisiteten. I henhold til den såkalte "best-fit"-metode blir sekvensen av det variable området av et gnagerantistoff som skal humaniseres, screenet mot hele biblioteket av kjente humanvariabeldomene-sekvenser. Humansekvensen som ligger nærmest den til gnageren, aksepteres så som humanrammeverk (FR) for det humaniserte antistoff (se for eksempel Sims et al., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993) og Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). En annen metode benytter et spesielt rammeverk som er avledet fra konsensus-sekvensen av alle humane antistoffer av en spesiell subgruppe av lette eller tunge kjeder. Det samme rammeverk kan benyttes for flere forskjellige humaniserte antistoffer (se for eksempel Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

I andre utførelsesformer er det intet behov for "forvalg" av noe spesielt humanantistoff-rammeverk (det vil si at det ikke er noe behov for å velge et humanrammeverk med den nærmeste homologi eller sekvensidentitet til et gitt kandidatantistoff som skal humaniseres). I disse utførelsesformer kan et felles eller universelt humanrammeverk benyttes for å akseptere én eller flere human-CDR'er. I den foretrukne utførelsesform blir et enkelt universal-, fullt humant rammeverk benyttet som rammeverk for alle antistoffer som skal humaniseres, uansett homologien til rammeverksekvensen(e) for

kandidatantistoffene. I denne forbindelse kan humaniserte antistoffer genereres uten å foreta noen forandringer i rammeverksområdet. Det universelle, fullt humane rammeverk kan akseptere én eller flere CDR-sekvenser. I én utførelsesform er én eller flere CDR-sekvenser CDR-sekvenser fra et antistoff fra en annen spesies (for eksempel mus eller rotte) som har vært modifisert sammenlignet med den tilsvarende CDR i det intakte antistoff fra de andre spesies (det vil si at det er samtidig innføring av CDR'en og modifikasjon av CDR'en som innføres i det universelle, humane rammeverk). Modifiseringen tilsvarer én eller flere aminosyreforandringer (i den modifiserte CDR) sammenlignet med den tilsvarende CDR i det intakte antistoff fra de andre spesies. I én utførelsesform er alle aminosyrerester i denne CDR inkludert i et bibliotek, mens i andre utførelsesformer ikke alle CDR-aminosyrerester er inkludert i et bibliotek. I en annen utførelsesform er den ene eller de flere CDR-sekvenser tilfeldige sekvenser som går i stedet for CDR-sekvenser.

I foretrukne utførelsesformer blir antistoffer humanisert ved retensjon av høy affinitet for antigenet og andre gunstige, biologiske egenskaper. I noen utførelsesformer er affiniteten for det humaniserte antistoff for antigen høyere enn affiniteten for det ikke-humaniserte, intakte antistoff eller fragment eller del derav (for eksempel kandidat-gnagerantistoffet). I denne forbindelse og i noen utførelsesformer blir humaniserte antistoffer fremstilt ved en prosess med analyse av parentale sekvenser og forskjellige konseptuelle, humaniserte produkter ved bruk av tredimensjonale modeller av de parentale og humaniserte sekvenser. Tredimensjonale immunoglobulinmodeller er vanligvis tilgjengelige og er velkjente for fagfolk på området. Dataprogrammer er tilgjengelige som illustrerer og viser sannsynlige, tredimensjonale, konformasjonelle strukturer av valgte kandidatimmunoglobulinsekvenser. Undersøkelser av disse displayer tillater analyse av den sannsynlige rolle til restene når det gjelder funksjoneringen av kandidatimmunoglobulinsekvensen, det vil si analyse av restene som påvirker evnen hos kandidatimmunoglobulinet til å binde sitt antigen. På denne måte kan FR-rester velges og kombineres fra resipienten og importsekvenser slik at de ønskede antistoffkarakteristika som økt affinitet for målsekvensen(e), oppnås. Generelt er CDR-restene rettet og i det vesentlige involvert i påvirkningen av antigenbinding.

Et antall spesifikke metoder som velkjente for fagfolk på området, kan benyttes for å innføre antistoff-CDR'er (eller tilfeldige sekvenser som kommer i stedet for antistoff-CDR'er) i antistofframmeverket (se for eksempel US 09/434 879 og 09/982 464). I noen utførelsesformer kan overlappingsoligoer benyttes for å syntetisere et antistoffgen eller

en del derav (for eksempel et gen som koder et humanisert antistoff). I en annen utførelsesform kan mutagenese av et antistofftemplat gjennomføres ved bruk av metoder ifølge Kunkel (infra), for eksempel for å innføre en modifisert CDR eller en tilfeldig sekvens i stedet for en CDR. I noen utførelsesformer blir lett- og tungkjedevariabel-

5 områder humanisert separat, og så kouttrykt som et humanisert, variabelt område. I andre utførelsesformer utgjør humaniserte, variable områder det variable området av et intakt antistoff. I noen utførelsesformer er Fc-området av det intakte antistoff omfattet

10 et humanisert, variabelt område, modifisert (for eksempel minst én aminosyremodifikasjon er foretatt i Fc-området). For eksempel kan et antistoff som er humanisert med randomisert CDR og uten rammeverksforandringer, omfatte minst én aminosyre-

modifikasjon i Fc-området.

I andre utførelsesformer benyttes transgeniske dyr (for eksempel mus) som ved immunisering er i stand til å produsere et fullt repertoar av humanantistoff i fravær av

15 endogen immunoglobulinproduksjon. For eksempel er det beskrevet at homozygøs delesjon av det antistofftungkjedeforenende område(JH)gen i kimeriske og germlinjemutante mus, resulterer i fullstendig inhibering av endogen antistoffproduksjon. Overføring av det humane germlinjeimmunoglobulinmønsteret i slike germlinjemutante mus, vil resultere i produksjonen av humanantistoffer ved antigenutfordring (se for

20 eksempel Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993) og Jakobovits et al., Nature, 362: 255-258 (1993)). Humanantistoffer kan også avledes fra fagdisplaybiblioteker (se for eksempel Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227: 381 (1991) og Vaughan et al. Nature Biotech 14: 309 (1996)).

25 Det er beskrevet metoder for å generere humaniserte antistoffer (og antistofffragmenter) som omfatter minst én aminosyremodifikasjon i Fc-området (sammenlignet med et parentalt polypeptid med et Fc-område). Diskutert ovenfor er ytterligere metoder for å generere slike humaniserte antistoffer. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også preparater omfattende antistoffene og antistoff-fragmenter generert av disse

30 metoder. Viktig er det at de humaniseringsmetoder som er beskrevet nedenfor og andre humaniseringsmetoder (for eksempel som beskrevet ovenfor), kan kombineres med Fc-varianten ifølge oppfinnelsen. I denne forbindelse kan humaniserte antistoffer med endrede, unike Fc-områder konstrueres heri.

35 I noen utførelsesformer tilveiebringes det en fremgangsmåte for å konstruere en populasjon av endrede tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer, omfattende: a) å

tilveiebringe en representasjon av første og andre referanseaminoesyresekvenser der den første referansesekvens omfatter sekvensen av et donortungkjedevariabelt område der det donorvariable området omfatter i) rammeverksområder og ii) tre komplementaritetsbestemmende områder som definert ved de kombinerte definisjoner ifølge Kabat og Chothia; idet den andre referansesekvens omfatter sekvensen av et akseptortungkjedevariabelt område omfattende rammeverksområder; b) å syntetisere a) første oligonukleotider som koder deler av rammeverksområdet av det akseptortungkjedevariable området, der delene av rammeverksområdene, sammenlignet med den andre referansesekvens, er umodifisert; og b) en populasjon av andre oligonukleotider som hver koder i) minst en del av et første komplementaritetsbestemmende område som er modifisert i det første komplementaritetsbestemmende området som er valgt fra gruppen bestående av HCDR1, HCDR2 og HCDR3, der det første komplementaritetsbestemmende området omfatter en forskjellig aminosyre på én eller flere posisjoner sammenlignet med de tilsvarende donorkomplementaritetsbestemmende områder av den første referansesekvens, og ii) én eller flere deler av ikke-modifiserte rammeverksområder som er i stand til hybridisering til de første oligonukleotider; c) blanding av de første oligonukleotider med populasjonen av andre oligonukleotider for å skape overlappende oligonukleotider; og d) behandling av de overlappende oligonukleotider under betingelser slik at det konstrueres en populasjon av endrede tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer der rammeverksområdene som kodes av de endrede tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer, er umodifisert med henblikk på den andre referansesekvens.

I noen utførelsesformer er presentasjonen av de første og andre referansesekvenser i elektronisk form. I noen utførelsesformer omfatter metoden videre trinnet (E) å kouttrykke populasjonen av endrede tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer med en lettkjedevariabeltområdekodende nukleinsyre for å gi en divers populasjon av endrede, heteromere, variable områder. I noen utførelsesformer omfatter syntesen kjemisk syntetisering. I noen utførelsesformer er akseptoren human. I noen utførelsesformer omfatter behandlingen i trinn D) forlengelse ved en polymerase.

I andre utførelsesformer tilveiebringes det en fremgangsmåte for å konstruere en populasjon av endrede lettkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer, omfattende: a) å tilveiebringe en representasjon av første og andre referanseaminoesyresekvenser der den første referansesekvens omfatter sekvensen av et donorlettkjedevariabelt område der det

- donorvariable området omfatter i) rammeverksområder og ii) tre komplementaritetsbestemmende områder som definert ved de kombinerte definisjoner ifølge Kabat og Chothia; idet den andre referansesekvens omfatter sekvensen av et akseptorlettkjedevariabelt område omfattende rammeverksområder; b) å syntetisere a) første oligonukleotider som koder deler av rammeverksområdene av det akseptorlettkjedevariable området, der delene av rammeverksområdene, sammenlignet med den andre referansesekvens, er umodifisert; og b) en populasjon av andre oligonukleotider som hver koder i) minst en del av et første komplementaritetsbestemmende område som er modifisert, idet det første komplementaritetsbestemmende området valgt fra gruppen bestående av HCDR1, HCDR2 og HCDR3, der det modifiserte, første komplementaritetsbestemmende området omfatter en annen aminosyre på én eller flere posisjoner sammenlignet med de tilsvarende donorkomplementaritetsbestemmende områder av den første referansesekvens, og ii) én eller flere deler av ikke-modifiserte rammeverksområder som er i stand til hybridisering til de første oligonukleotider; c) blanding av de første oligonukleotider med populasjonen av andre oligonukleotider for å skape overlappende oligonukleotider; og d) behandling av de overlappende oligonukleotider under betingelser slik at populasjon av endrede lettkjedevariabelt-områdekodende nukleinsyrer konstrueres der rammeverksområdene som kodes av de endrede lettkjedevariabelt-områdekodende nukleinsyrer, er umodifiserte med henblikk på den andre referansesekvens.

- I noen utførelsesformer er presentasjonen av de første og andre referansesekvenser i elektronisk form. I noen utførelsesformer omfatter metoden videre trinnet (E) koekspresjon av populasjonen av endrede lettkjedevariabelt-områdekodende nukleinsyrer med en tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyre for å gi en divers populasjon av endrede, heteromere, variable områder. I noen utførelsesformer omfatter syntetiseringen kjemisk syntetisering. I noen utførelsesformer er akseptoren human. I noen utførelsesformer omfatter behandlingen i trinn D) en forlengelse med polymerase.
- I noen utførelsesformer er det tatt sikte på en fremgangsmåte for å konstruere en populasjon av endrede tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer, omfattende: A) å tilveiebringe en representasjon av en første og en andre referanseaminoesyresekvens der den første referansesekvens omfatter sekvensen til et donortungkjedevariabelt område der det donorvariable området omfatter i) rammeverksområder og ii) tre komplementaritetsbestemmende områder som definert ved de kombinerte definisjoner ifølge Kabat og Chothia; idet den andre referansesekvens omfatter sekvenser av et

- akseptortungkjedevariabelt område omfattende rammeverksområder; B) syntetisering av
- a) en populasjon av første oligonukleotider, hvert kodende minst en del av et første
- komplementaritetsbestemmende område valgt fra gruppen bestående av HCDR1,
- HCDR2 og HCDR3, der det modifiserte, første komplementaritetsbestemmende
- 5 området omfatter en annen aminosyre i én eller flere posisjoner sammenlignet med de
- tilsvarende donorkomplementaritetsbestemmende områder av den første referanse-
- sekvens, og b) andre oligonukleotider som koder i) deler av rammeverksområdene av
- det akseptortungkjedevariable området der delene av rammeverksområdene
- sammenlignet med referansesekvensen, er umodifisert, og ii) én eller flere deler av et
- 10 komplementaritetsbestemmende område som er i stand til å hybridere til populasjonen
- av de første oligonukleotider; C) å blande populasjonen av de første oligonukleotider
- med de andre oligonukleotider for å skape overlappende oligonukleotider; og D) å
- behandle de overlappende oligonukleotider under betingelser slik at populasjonen av
- endrede tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer konstrueres, hvor
- 15 rammeverksområdene som kodes av de endrede tungkjedevariabeltområdekodende
- nukleinsyrer, er umodifiserte med henblikk på den andre referansesekvens.

- I noen utførelsesformer er presentasjonen av de første og andre referansesekvenser i
- elektronisk form. I noen utførelsesformer omfatter metoden videre trinnet (E) omfat-
- 20 tende koekspresjon av populasjonen av endrede tungkjedevariabeltområdekodende
- nukleinsyrer med et lettkjedevariabelt område som koder nukleinsyre for å gi en divers
- populasjon av endrede, heteromere, variable områder. I noen utførelsesformer omfatter
- syntetiseringen kjemisk syntetisering. I noen utførelsesformer er akseptoren human. I
- noen utførelsesformer omfatter behandlingen i trinn D) forlengelse med en polymerase.
- 25

- I andre utførelsesformer tilveiebringes det en fremgangsmåte for å konstruere en
- populasjon av endrede lettkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer, omfattende: A) å
- tilveiebringe en representasjon av en første og en andre referanseaminoesyresekvens, idet
- den første referansesekvens omfatter sekvensen til et donorlettkjedevariabelt område,
- 30 idet det donorvariable området omfatter i) rammeverksområder og ii) tre komplemen-
- taritetsbestemmende områder som definert ved de kombinerte definisjoner ifølge Kabat
- og Chothia; og den andre referansesekvens omfatter sekvensen av et akseptorlettkjede-
- variabelt område omfattende rammeverksområder; B) syntetisering av a) en populasjon
- av første oligonukleotider, hvert kodende minst en del av et første komplementaritets-
- 35 bestemmende område valgt fra gruppen bestående av LCDR1, LCDR2 og LCDR3, der
- det modifiserte, første komplementaritetsbestemmende området omfatter en annen

- aminosyre i én eller flere posisjoner sammenlignet med de tilsvarende donorkomple-
mentaritetsbestemmende områder av den første referansesekvens; og b) andre oligo-
nukleotider som koder i) deler av rammeverksområdene av det akseptorlettjedevariable
området der delene av rammeverksområdene sammenlignet med referansesekvensen, er
5 umodifisert, og ii) én eller flere deler av et komplementaritetsbestemmende område som
er i stand til å hybridere til populasjonen av de første oligonukleotider; C) å blande
populasjonen av de første oligonukleotider med andre oligonukleotider for å skape
overlappende oligonukleotider; og D) å behandle de overlappende oligonukleotider
under betingelser slik at det konstrueres en populasjonen av endrede
10 lettjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer, der rammeverksområdene som kodes av
de endrede lettjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer, er umodifiserte med
henblikk på den andre referansesekvens.

- I noen utførelsesformer er presentasjonen av de første og andre referansesekvenser i
15 elektronisk form. I noen utførelsesformer omfatter metoden videre trinnet (E) omfat-
tende koekspresjon av populasjonen av endrede lettjedevariabeltområdekodende
nukleinsyrer med et tungkjedevariabelt område som koder nukleinsyre for å gi en divers
populasjon av endrede, heteromere, variable områder. I noen utførelsesformer omfatter
syntetiseringen kjemisk syntetisering. I noen utførelsesformer er akseptoren human. I
20 noen utførelsesformer omfatter behandlingen i trinn D) forlengelse med en polymerase.

- I andre utførelsesformer tilveiebringes det en metode for å konstruere en populasjon av
endrede tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer, omfattende: A) å tilveiebringe
en representasjon av en første og en andre referanseaminosyresekvens, der den første
25 referansesekvens omfatter sekvensen av et donortungkjedevariabelt område, der det
donorvariable området omfatter i) rammeverksområder og ii) tre komplementaritets-
bestemmende områder, der den andre referansesekvens omfatter et tungkjedevariabelt
område; b) syntetisering av en populasjon av endrede tungkjedevariabeltområde-
antistoffgensekvenser, der rammeverksområdene for de endrede tungkjedevariable
30 områder er identisk med rammeverksområdene for den andre referansesekvens, og
minst en første CDR av de endrede antistoffvariable områder er modifisert, hvori den
modifiserte, første CDR omfatter en annen aminosyre ved én eller flere posisjoner
sammenlignet med den tilsvarende donor-CDR for den første referansesekvens.

- 35 I noen utførelsesformer er presentasjonen av de første og andre referansesekvenser i
elektronisk form. I noen utførelsesformer omfatter fremgangsmåten videre trinnet (E)

omfattende koekspresjon av populasjonen av endrede tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer med en lett kjedevariabeltområdekodende nukleinsyre for å gi en divers populasjon av endrede, heteromere, variable områder. I noen utførelsesformer er akseptoren human. I visse

5 utførelsesformer involverer syntetiseringen bruk av overlappende oligonukleotider. I noen utførelsesformer er CDR'ene definert ved Kabat-definisjonen.

I noen utførelsesformer tas det sikte på en fremgangsmåte for å konstruere en populasjon av endrede lett kjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer, omfattende: A) å til-

10 veiebringe en presentasjon av en første og en andre referanseaminoesyresekvens, der den første referansesekvens omfatter sekvensen til et donorlett kjedevariabelt område, der det donorvariable området omfatter i) rammeverksområder og ii) tre komplementaritetsbestemmende områder; idet den andre referansesekvens omfatter sekvensen av et akseptorlett kjedevariabelt område omfattende rammeverksområder; b) syntetisering av

15 en populasjon av endrede lett kjedevariabeltområdeantistoffgensekvenser, der rammeverksområdene for de endrede lett kjedevariable områder er identiske med rammeverksområdene for den andre referansesekvens, og minst en første CDR av det endrede antistofflett kjedevariable området er modifisert, der den modifiserte, første CDR omfatter en annen aminosyre på én eller flere posisjoner sammenlignet med den tilsvarende

20 donor-CDR av den første referansesekvens.

I noen utførelsesformer er presentasjonen av de første og andre referansesekvenser i elektronisk form. I noen utførelsesformer omfatter metoden videre trinnet (E) ko-

25 ekspresjon av populasjonen av endrede lett kjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer med en tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyre for å gi en divers populasjon av endrede, heteromere, variable områder. I noen utførelsesformer er akseptoren human. I noen utførelsesformer involverer syntetiseringen bruken av overlappende oligonukleotider.

I nok andre utførelsesformer er det tatt sikte på en fremgangsmåte for å konstruere en populasjon av endrede tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer, omfattende: A) å tilveiebringe en presentasjon av en referanseaminoesyresekvens, der referansesekvensen omfatter sekvensen til et akseptortungkjedevariabelt område omfattende rammeverksområder; b) syntetisering av en populasjon av endrede tungkjedevariabeltområdeantistoffgensekvenser, der rammeverksområdene for de endrede tungkjedevariable områder er identiske med rammeverksområdene for referansesekvensen, og

35

minst en første CDR av de endrede antistoffvariable områder omfattende en tilfeldig aminosyresekvens.

- I noen utførelsesformer er presentasjonen av referansesekvensene i elektronisk form. I
- 5 noen utførelsesformer omfatter metoden videre trinnet (E) omfattende koekspresjon av populasjonen av endrede tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer med en lett-kjedevariabeltområdekodende nukleinsyre for å gi en divers populasjon av endrede, heteromere, variable områder. I noen utførelsesformer er akseptoren human. I andre utførelsesformer involverer syntetiseringen bruk av overlappende oligonukleotider. I
- 10 noen utførelsesformer er CDR'ene definert ved Kabat-definisjonen.

- I andre utførelsesformer er det tatt sikte på en fremgangsmåte for å konstruere en populasjon av endrede lett-kjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer, omfattende: A) å tilveiebringe en presentasjon av en referanseaminosyresekvens, der referansesekvensen
- 15 omfatter sekvensen av et akseptorlett-kjedevariabelt område omfattende rammeverks-områder; b) syntetisering av en populasjon av endrede lett-kjedevariabeltområde-antistoffgensekvenser, der rammeverksområdene for de endrede lett-kjedevariable områder er identiske med rammeverksområdene for referansesekvensen, og minst en første CDR i de endrede antistoffvariable områder omfattende en tilfeldig aminosyre-
- 20 sekvens.

- I noen utførelsesformer er presentasjonen av referansesekvensen i elektronisk form. I noen utførelsesformer omfatter metoden videre trinnet (E) omfattende koekspresjon av populasjonen av endrede lett-kjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer med en
- 25 tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyre for å gi en divers populasjon av endrede, heteromere, variable områder. I noen utførelsesformer er akseptoren human. I noen utførelsesformer involverer syntetiseringen bruk av overlappende oligonukleotider. I noen utførelsesformer er CDR'ene definert ved Kabat-definisjonen.

- I nok andre utførelsesformer er det tatt sikte på en fremgangsmåte for å konstruere en populasjon av endrede tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer, omfattende: A) å tilveiebringe en presentasjon av en referanseaminosyresekvens, der referanse-
- 30 sekvensen omfatter sekvensen til et humanakseptortungkjedevariabelt område omfattende rammeverksområder; b) syntetisering av en populasjon av endrede tungkjede-
- 35 variabeltområdeantistoffgensekvenser, der rammeverksområdene for de endrede tung-

- kjedevariable områder er identiske med rammeverksområdene for humanreferansesekvensen, og minst en første CDR av de endrede antistoffvariable områder omfattende en tilfeldig aminosyresekvens. I noen utførelsesformer er presentasjonen av humanreferansesekvensen i elektronisk form. I noen utførelsesformer omfatter metoden videre
- 5 trinnet (E) omfattende koekspresjon av populasjonen av endrede tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer med en lett kjedevariabeltområdekodende nukleinsyre for å gi en divers populasjon av endrede, heteromere, variable områder. I noen utførelsesformer involverer syntetiseringen bruk av overlappende oligonukleotider. I noen utførelsesformer er CDR'ene definert ved Kabat-definisjonen.
- 10
- I andre utførelsesformer er det tatt sikte på en fremgangsmåte for å konstruere en populasjon av endrede lett kjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer, omfattende: A) å tilveiebringe en presentasjon av en referanseaminosyresekvens, der referansesekvensen omfatter sekvensen av et humanakseptorlett kjedevariabelt område omfattende rammeverksområder; b) syntetisering av en populasjon av endrede lett kjedevariabeltområdekodende antistoffgensekvenser, der rammeverksområdene for de endrede lett kjedevariable områder er identiske med rammeverksområdene for humanreferansesekvensen, og minst en første CDR i de endrede antistofflett kjedevariable områder omfattende en tilfeldig aminosyresekvens.
- 15
- 20
- I noen utførelsesformer er presentasjonen av referansesekvensen i elektronisk form. I noen utførelsesformer omfatter metoden videre trinnet (E) omfattende koekspresjon av populasjonen av endrede lett kjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer med en tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyre for å gi en divers populasjon av endrede,
- 25 heteromere, variable områder. I noen utførelsesformer involverer syntetiseringen bruken av overlappende oligonukleotider. I noen utførelsesformer er CDR'ene definert ved Kabat-definisjonen.
- I noen utførelsesformer blir ett eller flere rammeverksområder modifisert samtidig med
- 30 innføringen av én eller flere modifiserte CDR'er. I andre utførelsesformer er de modifiserte rammeverk nabo til de modifiserte CDR'er.
- I noen utførelsesformer tilveiebringer oppfinnelsen fremgangsmåter for å konstruere en populasjon av endrede tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer, omfattende: A)
- 35 å tilveiebringe en presentasjon av første og andre referanseaminosyresekvenser, idet den første referanseaminosyresekvens omfatter sekvensen til et donortungkjedevariabelt

- område, der det donorvariable området omfatter i) rammeverksområder og ii) tre komplementaritetsbestemmende områder som definert ved de kombinerte definisjoner ifølge Kabat og Chothia; den andre referanseaminoesyresekvens omfatter sekvensen av et akseptortungkjedevariabelt område omfattende rammeverksområder; B) syntetisering
- 5 av a) en første populasjon av oligonukleotider, omfattende oligonukleotider som koder et modifisert tungkjedevariabeltområderammeverksområde eller en del derav, der det tungkjedevariable regionsrammeverksområde eller del derav inneholder et antall forandrede aminosyrer på én eller flere posisjoner sammenlignet med akseptorrammeverksområdereferansesekvensen, der rammeverksposisjonen som er forandret, er valgt
- 10 blant akseptorrammeverksposisjonene i den andre referansesekvens som skiller seg ved den tilsvarende posisjon sammenlignet med donorrammeverksposisjonene av den første referansesekvens; og b) en andre populasjon av oligonukleotider som hver koder i) minst ett modifisert, komplementaritetsbestemmende område eller en del derav, der det modifiserte komplementaritetsbestemmende område eller del derav, omfatter en annen
- 15 aminosyre i én eller flere posisjoner sammenlignet med den tilsvarende donorkomplementaritetsbestemmende områdeaminoesyreferansesekvens og ii) én eller flere deler av naborammeverksområder som er i stand til hybridisering til den første populasjon oligonukleotider; og c) å blande de første og andre populasjoner av oligonukleotider for å skape overlappende oligonukleotider; og d) å behandle de overlappende oligonukleotider
- 20 er under betingelser slik at det konstrueres en populasjonen av endrede tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer. I visse utførelsesformer er presentasjonen av de første og andre referansesekvenser i elektronisk form. I andre utførelsesformer omfatter metoden videre trinnet (E) omfattende koekspresjon av populasjonen av endrede tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer med en lett kjedevariabeltområdekodende
- 25 nukleinsyre for å gi en divers populasjon av endrede, heteromere, variable områder. I ytterligere utførelsesformer omfatter syntetiseringen kjemisk syntetisering. I noen utførelsesformer er akseptoren human. I foretrukne utførelsesformer er den ene eller flere av diverse populasjoner av endrede, heteromere, variable områder en del av et antistoff omfattende et Fc-område, der Fc-området omfatter én aminosyremodifikasjon
- 30 sammenlignet med et parentalt polypeptid med et Fc-område.

I ytterligere utførelsesformer tilveiebringer oppfinnelsen fremgangsmåter for å konstruere en populasjon av endrede lett kjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer, omfattende: A) å tilveiebringe en presentasjon av første og andre referanseaminoesyresekvenser, der den første referanseaminoesyresekvens omfatter sekvensen av et donor-

35

lettjkjedevariabelt område, der det donorvariable området omfatter i) rammeverks-
 områder og ii) tre komplementaritetsbestemmende områder som definert ved de kombi-
 nerte definisjoner ifølge Kabat og Chothia; og den andre referanseaminoesyresekvens
 omfatter sekvensen av et akseptorlettjkjedevariabelt område omfattende rammeverks-
 5 områder; b) syntetisering av a) en første populasjon av oligonukleotider, omfattende
 oligonukleotider som koder et modifisert lettjkjedevariabeltområderammeverksområde
 eller en del derav, der det lettjkjedevariable områderammeverksområde eller en del
 derav, inneholder et antall endrede aminosyrer i én eller flere posisjoner sammenlignet
 med akseptorrammeverksområdereferansesekvensen, der rammeverksposisjonen som er
 10 forandret, er valgt blant akseptorrammeverksposisjonene i den andre referansesekvens
 som skiller seg ved den tilsvarende posisjon sammenlignet med donorrammeverks-
 posisjonene i den første referansesekvens; og b) en andre populasjon av oligonukleotid-
 er som hver koder i) minst ett modifisert, komplementaritetsbestemmende område eller
 en del derav, der det modifiserte, komplementaritetsbestemmende område eller del
 15 derav, omfatter en annen aminosyre i én eller flere posisjoner sammenlignet med den
 tilsvarende donorkomplementaritetsbestemmende områdeaminoesyreferansesekvens og
 ii) én eller flere deler av naborammeverksområder som er i stand til hybridisering til den
 første populasjon av oligonukleotider; og c) å blande de første og andre populasjoner av
 oligonukleotider for å skape overlappende oligonukleotider; og d) å behandle de over-
 20 lappende oligonukleotider under betingelser slik at det konstrueres en populasjonen av
 endrede lettjkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer. I andre utførelsesformer er
 presentasjonen av de første og andre referansesekvenser i elektronisk form. I ytterligere
 utførelsesformer omfatter metoden videre trinnet (E) omfattende koekspressjon av
 populasjonen av endrede lettjkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer med en tung-
 25 kjedevariabeltområdekodende nukleinsyre for å gi en divers populasjon av endrede,
 heteromere, variable områder.

I visse utførelsesformer omfatter metodene: a) å tilveiebringe en presentasjon av første
 og andre referanseaminoesyresekvenser, der den første referanseaminoesyresekvens
 30 omfatter sekvensen av et donortungkjedevariabelt område, der det donorvariable
 området omfatter i) rammeverksområder og ii) tre komplementaritetsbestemmende
 områder som definert ved de kombinerte definisjoner ifølge Kabat og Chothia; og den
 andre referanseaminoesyresekvens omfatter sekvensen av et akseptortungkjedevariabelt
 område omfattende rammeverksområder; b) syntetisering av a) en første populasjon av
 35 oligonukleotider, omfattende oligonukleotider som koder et modifisert tungkjede-
 variabeltområderammeverksområde eller en del derav, der det tungkjedevariable

- områderammeverksområde eller en del derav, inneholder et antall endrede aminosyrer i én eller flere posisjoner sammenlignet med akseptorrammeverksområdereferansesekvensen, der rammeverksposisjonene som er forandret, er valgt blant akseptorrammeverksposisjonene i den andre referansesekvens som skiller seg ved den tilsvarende
- 5 posisjon sammenlignet med donorrammeverksposisjonene i den første referansesekvens; og b) en andre populasjon av oligonukleotider som hver koder i) minst ett modifisert, komplementaritetsbestemmende område eller en del derav, der det modifiserte, komplementaritetsbestemmende område eller del derav, omfatter en annen aminosyre på én eller flere posisjoner sammenlignet med den tilsvarende donorkomple-
- 10 mentaritetsbestemmende områdeaminosyrereferansesekvens og ii) én eller flere deler av naborammeverksområder som er i stand til hybridisering til den første populasjon av oligonukleotider; og c) å blande de første og andre populasjoner av oligonukleotider for å skape overlappende oligonukleotider; og d) å forlenge de overlappende oligonukleotider med DNA-polymerase under betingelser slik at populasjonen av endrede
- 15 tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer konstrueres.

- I ytterligere utførelsesformer tilveiebringes fremgangsmåter for å konstruere en populasjon av endrede lettkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer, omfattende: A) å tilveiebringe en presentasjon av første og andre referanseaminosyresekvenser, der den
- 20 første referanseaminosyresekvens omfatter sekvensen av et donorlettkjedevariabelt område, der det donorvariable området omfatter i) rammeverksområder og ii) tre komplementaritetsbestemmende områder som definert ved de kombinerte definisjoner ifølge Kabat og Chothia; idet den andre referanseaminosyresekvens omfatter sekvensen av et lettkjedevariabelt område omfattende rammeverksområder; b) syntetisering av a)
- 25 en første populasjon av oligonukleotider, omfattende oligonukleotider som koder et modifisert lettkjedevariabeltområderammeverksområde eller en del derav, der det lettkjedevariable områderammeverksområde eller en del derav, inneholder et antall endrede aminosyrer på én eller flere posisjoner sammenlignet med akseptorrammeverksområdereferansesekvensen, der rammeverksposisjonene som er forandret, er valgt
- 30 blant akseptorrammeverksposisjonene av den andre referansesekvens som skiller seg fra den tilsvarende posisjon sammenlignet med donorrammeverksposisjonene for den første referansesekvens; og b) en andre populasjon av oligonukleotider som hver koder i) minst ett modifisert, komplementaritetsbestemmende område eller en del derav, der det modifiserte, komplementaritetsbestemmende område eller del derav, omfatter en
- 35 forskjellig aminosyre på én eller flere posisjoner sammenlignet med den tilsvarende donorkomplementaritetsbestemmende områdeaminosyrereferansesekvens og ii) én eller

flere deler av naborammeverksområder som er i stand til hybridisering til den første populasjon av oligonukleotider; og c) å blande de første og andre populasjoner av oligonukleotider for å skape overlappende oligonukleotider; og d) å forlenge de overlappende oligonukleotider med en DNA-polymerase under betingelser slik at en populasjonen av
 5 endrede lettjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer konstrueres.

I noen utførelsesformer blir én eller flere modifikasjoner innført i rammeverket samtidig med innføringen av én eller flere modifiserte CDR'er. De modifiserte CDR'er kan omfatte én eller flere aminosyreendringer sammenlignet med den tilsvarende CDR i en
 10 referansesekvens. I visse utførelsesformer omfatter metodene for å konstruere en populasjon av endrede tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer: A) å tilveiebringe en presentasjon av første og andre referanseaminosyresekvenser, der den første referanseaminosyresekvens omfatter sekvensene til et donortungkjedevariabelt område, der det donorvariable området omfatter i) rammeverksområder og ii) tre komplementaritätsbestemmende områder som definert i de kombinerte definisjoner ifølge Kabat og
 15 Chothia; og den andre referanseaminosyresekvens omfatter sekvensen til et akseptortungkjedevariabelt område omfattende rammeverksområder; b) syntetisering av i) en første populasjon av oligonukleotider, hver som koder minst ett modifisert, komplementaritätsbestemmende område, der det modifiserte, komplementaritätsbestemmende
 20 området omfatter en forskjellig aminosyre på én eller flere posisjoner sammenlignet med den tilsvarende donorkomplementaritätsbestemmende områdeaminosyrereferansesekvens og ii) en andre populasjon av oligonukleotider omfattende oligonukleotider som koder modifiserte deler av et tungkjedevariabelt områderammeverk hvor den modifiserte del inneholder et antall forandrede aminosyrer på én eller flere posisjoner
 25 sammenlignet med akseptorrammeverksområdereferansesekvenser der rammeverksposisjonene som er forandret, er valgt blant akseptorrammeverksposisjonene for den andre referansesekvens som er forskjellig på de tilsvarende posisjoner sammenlignet med donorrammeverksposisjonene for den første referansesekvens; c) blanding av de første og andre populasjoner av oligonukleotider under betingelser slik at minst en del
 30 av oligonukleotidene hybridiserer for derved å skape overlappende oligonukleotider; og d) å behandle de overlappende oligonukleotider under betingelser slik at det konstrueres en populasjonen av endrede tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer. I visse utførelsesformer er presentasjonen av de første og andre referansesekvenser i elektronisk form. I ytterligere utførelsesformer omfatter metoden videre trinnet (E)
 35 omfattende koekspresjon av populasjonen av endrede tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer med en lettjedevariabeltområdekodende nukleinsyre for å gi en

divers populasjon av endrede, heteromere, variable områder. I andre utførelsesformer er akseptoren human.

- I andre utførelsesformer tilveiebringes metoder for å konstruere en populasjon av
- 5 endrede lettkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer, omfattende: A) å tilveiebringe en presentasjon av første og andre referanseaminoesyresekvens, der den første referanseaminoesyresekvens omfatter sekvensen av et donorlettkjedevariabelt område, der det donorvariable området omfatter i) rammeverksområder og ii) tre komplementaritetsbestemmende områder som definert av de kombinerte definisjoner ifølge Kabat
- 10 og Chothia; den andre referanseaminoesyresekvens omfatter sekvensen til et akseptorlettkjedevariabelt område omfattende rammeverksområder; b) syntetisering av i) en første populasjon av oligonukleotider, hver som koder minst ett modifisert, komplementaritetsbestemmende område, der det modifiserte, komplementaritetsbestemmende området omfatter en forskjellig aminosyre på én eller flere posisjoner sammenlignet
- 15 med den tilsvarende donorkomplementaritetsbestemmende områdeaminoesyreferansesekvens; og ii) en andre populasjon av oligonukleotider omfattende oligonukleotider som koder modifiserte deler av et lettkjedevariabelt områderammeverk hvor den modifiserte del inneholder et antall forandrede aminosyrer på én eller flere posisjoner sammenlignet med akseptorrammeverksområdereferansesekvenser der rammeverks-
- 20 posisjonene som er forandret, er valgt blant akseptorrammeverksposisjonene av den andre referansesekvens som er forskjellig på den tilsvarende posisjon sammenlignet med donorrammeverksposisjonen for den første referansesekvens; c) blanding av de første og andre populasjoner av oligonukleotider under betingelser slik at minst en del av oligonukleotidene hybridiserer for derved å skape overlappende oligonukleotider; og
- 25 d) å behandle de overlappende oligonukleotider under betingelser slik at det konstrueres en populasjonen av endrede lettkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer.

- I visse utførelsesformer kan det genereres antistoffer eller antistoff-fragmenter omfattende en Fc-variant og et endret tungkjedevariantområde. For eksempel tilveiebringer
- 30 oppfinnelsen i enkelte utførelsesformer fremgangsmåter for å konstruere en populasjon av endrede tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer, omfattende a) å tilveiebringe en representasjon av første og andre referanseaminoesyresekvenser der den første referansesekvens omfatter sekvensen av et donortungkjedevariabelt område der det donorvariable området omfatter i) rammeverksområder og ii) tre komplementaritets-
- 35 bestemmende områder som definert ved de kombinerte definisjoner ifølge Kabat og

Chothia; idet den andre referansesekvens omfatter sekvensen av et akseptortungkjede-variabelt område omfattende rammeverksområder; b) å syntetisere A) første oligonukleotider som koder deler av rammeverksområdet av det akseptortungkjedevariable området, der delene av rammeverksområdene, sammenlignet med den andre referansesekvens, er umodifisert; og B) en populasjon av andre oligonukleotider som hver koder i) minst en del av et første komplementaritetsbestemmende område som er modifisert idet det første komplementaritetsbestemmende området er valgt fra gruppen bestående av HCDR1, HCDR2 og HCDR3, der det modifiserte, første komplementaritetsbestemmende området omfatter en forskjellig aminosyre på én eller flere posisjoner sammenlignet med de tilsvarende donorkomplementaritetsbestemmende områder av den første referansesekvens, og ii) én eller flere deler av ikke-modifiserte rammeverksområder som er i stand til å hybridere til de første oligonukleotider; c) blanding av de første oligonukleotider med populasjonen av andre oligonukleotider for å skape overlappende oligonukleotider; og d) behandling av de overlappende oligonukleotider under betingelser slik at det konstrueres en populasjon av endrede tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer der rammeverksområdene som kodes av de endrede tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer, er umodifisert i forhold til den andre referansesekvens. I noen utførelsesformer omfatter metoden videre trinnet (E) omfattende koekspresjon av populasjonen av endrede tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer med en lett-kjedevariabeltområdekodende nukleinsyre for å gi en divers populasjon av endrede, heteromere, variable områder.

I andre utførelsesformer tilveiebringes metoder for å konstruere en populasjon av endrede lett-kjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer, omfattende: a) å tilveiebringe en presentasjon av første og andre referanseaminosyresekvens, der den første referanseaminosyresekvens omfatter sekvensen av et donorlett-kjedevariabelt område, der det donorvariable området omfatter i) rammeverksområder og ii) tre komplementaritetsbestemmende områder som definert ved de kombinerte definisjoner ifølge Kabat og Chothia; den andre referansesekvens omfatter sekvensen av et akseptorlett-kjedevariabelt område omfattende rammeverksområder; b) syntetisering av a) første oligonukleotider som koder deler av rammeverksområdene av det akseptorlett-kjedevariable området der deler av rammeverksområdene sammenlignet med en andre referansesekvens, er umodifisert; og b) en populasjon av andre oligonukleotider, hver som koder i) minst en del av et første komplementaritetsbestemmende område som er modifisert idet det første, komplementaritetsbestemmende område er valgt fra gruppen

bestående av LCDR1, LCDR2 og LCDR3, der det modifiserte, første komplementaritetsbestemmende området omfatter en forskjellig aminosyre på én eller flere posisjoner sammenlignet med de tilsvarende donorkomplementaritetsbestemmende områder av den første referansesekvens; og ii) én eller flere deler av ikke-modifiserte

5 rammeverksområder som er i stand til hybridisering til de første oligonukleotider; c) blanding av de første oligonukleotider med populasjonen av andre oligonukleotider for å skape overlappende oligonukleotider; og d) behandling av de overlappende oligonukleotider under betingelser slik at det konstrueres en populasjonen av endrede lett-

10 kjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer, der rammeverksområdene som kodes av de endrede lett-kjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer, er umodifiserte med henblikk på den andre referansesekvens.

I andre utførelsesformer tilveiebringes metoder for å konstruere en populasjon av endrede tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer, omfattende: a) å tilveiebringe

15 en presentasjon av første og andre referanseaminosyresekvenser der den første referansesekvens omfatter sekvensen av et donortungkjedevariabelt område der det donorvariable området omfatter i) rammeverksområder og ii) tre komplementaritetsbestemmende områder som definert ved de kombinerte definisjoner ifølge Kabat og Chothia; idet den andre referansesekvens omfatter sekvensen av et akseptortung-

20 kjedevariabelt område omfattende rammeverksområder; b) syntetisering av a) en populasjon av første oligonukleotider som hver koder minst en del av et første, komplementaritetsbestemmende område valgt fra gruppen bestående av HCDR1, HCDR2 og HCDR3, der det modifiserte, første komplementaritetsbestemmende området omfatter en forskjellig aminosyre på én eller flere posisjoner sammenlignet med de tilsvarende

25 donorkomplementaritetsbestemmende områder av den første referansesekvens, og b) andre oligonukleotider som koder i) deler av rammeverksområder av det akseptortungkjedevariable området, der delene av rammeverksområdene, sammenlignet med referansesekvensen, er ikke-modifisert; og ii) én eller flere deler av et komplementaritetsbestemmende område som er i stand til hybridisering til populasjonen av de første

30 oligonukleotider; C) blanding av første oligonukleotider med de andre oligonukleotider for å skape overlappende oligonukleotider; og D) å behandle de overlappende oligonukleotider under betingelser slik at det konstrueres en populasjonen av endrede lett-

35 kjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer, der rammeverksområdene som kodes av de endrede tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer, er umodifiserte med henblikk på den andre referansesekvens. I noen utførelsesformer omfatter metoden videre trinnet

(E) omfattende koekspresjon av populasjonen av endrede tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer med en lett kjedevariabeltområdekodende nukleinsyre for å gi en divers populasjon av endrede, heteromere, variable områder.

- 5 I andre utførelsesformer tilveiebringes metoder for å konstruere en populasjon av endrede lett kjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer, omfattende: A) å tilveiebringe en presentasjon av første og andre referanseaminoesyresekvenser der den første referansesekvens omfatter sekvensen av et donorlett kjedevariabelt område der det donorvariable området omfatter i) rammeverksområder og ii) tre komplementaritets-
- 10 bestemmende områder som definert ved de kombinerte definisjoner ifølge Kabat og Chothia; den andre referansesekvens omfatter sekvensen av et akseptorlett kjedevariabelt område omfattende rammeverksområder; B) syntetisering av a) en populasjon av første oligonukleotider som hver koder minst en del av et første, komplementaritetsbestem-
- 15 modifiserte, første komplementaritetsbestemmende området omfatter en forskjellig aminosyre på én eller flere posisjoner sammenlignet med de tilsvarende donorkomple-
- mentaritetsbestemmende områder for den første referansesekvens; og b) andre oligo-
- nukleotider som koder i) deler av rammeverksområder av det akseptorlett kjedevariable området, der delene av rammeverksområdene, sammenlignet med referansesekvensen,
- 20 er umodifisert; og ii) én eller flere deler av et komplementaritetsbestemmende område som er i stand til hybridisering til populasjonen av de første oligonukleotider; C) blanding av populasjonen av første oligonukleotider med de andre oligonukleotider for å skape overlappende oligonukleotider; og D) å behandle de overlappende oligonukleotider
- under betingelser slik at det konstrueres en populasjonen av endrede lett kjedevariabel-
- 25 områdekodende nukleinsyrer, der rammeverksområdene som kodes av de endrede lett kjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer, er umodifiserte med henblikk på den andre referansesekvens.

- I andre utførelsesformer tilveiebringes fremgangsmåter for å forbedre
- 30 bindingsaffiniteten for et mutert, humanisert antistoffvariabelt område, omfattende: a) å tilveiebringe en nukleinsyresekvens som koder et første, mutert, humanisert, antistoff-
 - variabelt område der det muterte, variable området omfatter (i) et villtypehuman-
 - antistofframmeverk; (ii) tre ikke-humane tungkjedekomplementaritetsbestemmende områder, og (iii) tre ikke-humane lett kjedekomplementaritetsbestemmende områder, der
 - 35 de komplementaritetsbestemmende områder er definert ved de kombinerte definisjoner ifølge Kabat og Chothia der minst ett av de lett kjedekomplementaritetsbestemmende

- områder er et mutasjonsholdig lett kjedekomplementaritetsbestemmende område omfattende minst én forskjellig aminosyre på minst én posisjon sammenlignet med det tilsvarende villtype ikke-humane komplementaritetsbestemmende område, og der det første, muterte antistoffvariable området har en høyere bindingsaffinitet en det tilsvarende, ikke-muterte antistoffvariable området; b) mutering av nukleinsyresekvensen som koder det første, muterte antistoffvariable området under betingelser slik at det andre, muterte, humaniserte antistoffvariable området kodes, idet det andre, muterte, humaniserte antistoffvariable området omfatter minst én ytterligere forskjellig aminosyre på minst én posisjon i det mutasjonsholdige lett kjedekomplementaritetsbestemmende område, idet den ytterligere mutasjon i kombinasjon med den første mutasjon, resulterer i høyere bindingsaffinitet. I noen utførelsesformer er det mutasjonsholdige lett kjedekomplementaritetsbestemmende område av det første, muterte, humaniserte antistoffvariable området komplementaritetsbestemmende område 3 (LCDR3). I andre utførelsesformer omfatter minst ett av de ikke-humane tungkjedekomplementaritetsbestemmende områder av det første muterte, humaniserte antistoffvariable området, en mutasjon slik at en forskjellig aminosyre kodes på minst én posisjon sammenlignet med det tilsvarende villtype-ikke-humane komplementaritetsbestemmende området. I ytterligere utførelsesformer er den tungkjedekomplementaritetsbestemmende område-mutasjon i HCDR3.
- I noen utførelsesformer tilveiebringes fremgangsmåter for samtidig å modifisere minst ett komplementaritetsbestemmende område (CDR) og minst ett rammeverksområde (FR), mens det konstrueres en populasjon av endrede tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer omfattende: a) å tilveiebringe en presentasjon av første og andre referanseaminoesyresekvenser der den første referanseaminoesyresekvens omfatter sekvensen av et donortungkjedevariabelt område der det donorvariable området omfatter i) fire rammeverksområder og ii) tre komplementaritetsbestemmende områder som definert ved de kombinerte definisjoner ifølge Kabat og Chothia; den andre referanseaminoesyresekvens omfatter sekvensen av et akseptortungkjedevariabelt område omfattende fire rammeverksområder som definert av de kombinerte definisjoner ifølge Kabat og Chothia; b) syntetisering av i) for vert rammeverksområde som skal modifiseres, en populasjon av oligonukleotider som hver koder et modifisert rammeverksområde eller en del derav der det modifiserte rammeverksområdet eller delen derav inneholder et antall forandrede aminosyrer ved én eller flere posisjoner sammenlignet med det tilsvarende rammeverksområde i akseptortungkjedevariabeltområdereferansesekvensen der rammeverksområdeposisjonene som er forandret, er

valgt blant akseptorrammeverksposisjonene av den andre referansesekvens som er forskjellig under tilsvarende posisjon sammenlignet med donorrammeverks-
 områdeposisjonene i den første referansesekvens; og ii) for hvert komplementaritets-
 bestemmende område som skal modifiseres, en populasjon av oligonukleotider som
 5 hver koder et modifisert, komplementaritetsbestemmende område, eller en del derav,
 der det modifiserte, komplementaritetsbestemmende området omfatter en forskjellig
 aminosyre på én eller flere posisjoner sammenlignet med den tilsvarende donor-
 komplementaritetsbestemmende områdeaminosyrereferansesekvens; og iii) for hvert av
 de gjenværende og ikke-modifiserte rammeverksområder, oligonukleotider som koder
 10 rammeverksområdet eller deler derav, med samme sekvens som det tilsvarende ramme-
 verksområdet av den andre referanseakseptorsekvens; og iv) for hvert av eventuelle
 gjenværende og ikke-modifiserte, komplementaritetsbestemmende områder, oligo-
 nukleotider som koder det komplementaritetsbestemmende område, eller deler derav,
 med samme sekvens som det tilsvarende komplementaritetsbestemmende området av
 15 den første referansedonorsekvens, der individuelle oligonukleotider fra (i) til (iv) som
 koder nabodeler av tungkjedevariabelt område, har overlappende sekvenser ved sine
 termini; og c) å blande oligonukleotidene og populasjonene av oligonukleotider som er
 syntetisert i trinn b) under betingelser slik at de overlappende sekvenser av individuelle
 oligonukleotider hybridiserer for å skape overlappende oligonukleotider; og d) å behandle
 20 de overlappende oligonukleotider under betingelser slik at en populasjon av endret tung-
 kjedevariabelt område som koder nukleotider, dannes. I visse utførelsesformer er pre-
 sentasjonen av første og andre referansesekvens i elektronisk form. I ytterligere ut-
 førelsesformer er rammeverksområdet som skal modifiseres, valgt fra gruppen be-
 stående av HFR1, HFR2 og HFR3. I andre utførelsesformer er det komplementaritets-
 25 bestemmende området som skal modifiseres, HCDR3. I ytterligere utførelsesformer
 omfatter metoden videre et trinn e) omfattende koekspresjon av populasjonen av tung-
 kjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer med en lett-kjedevariabeltområdekodende
 nukleinsyre for å gi en divers populasjon av endrede, heteromere, variable områder. I
 forskjellige utførelsesformer omfatter metoden videre trinnet e) omfattende ko-
 30 ekspresjon av populasjonen av tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer med en
 populasjon av lett-kjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer for å gi en divers
 populasjon av endrede, heteromere, variable områder.

I andre utførelsesformer benyttes det metoder for samtidig modifisering av minst ett
 35 komplementaritetsbestemmende område (CDR) og minst ett rammeverksområde (FR),
 mens det konstrueres en populasjon av endrede lett-kjedevariabeltområdekodende

nukleinsyrer der metoden omfatter: a) å tilveiebringe en presentasjon av første og andre referanseaminoesyresekvenser der den første referanseaminoesyresekvens omfatter sekvensen av et donorlettkjedevariabelt område der det donorvariable området omfatter i) fire rammeverksområder og ii) tre komplementaritetsbestemmende områder som

5 definert ved de kombinerte definisjoner ifølge Kabat og Chothia; idet den andre referanseaminoesyresekvens omfatter sekvensen av et akseptorlettkjedevariabelt område omfattende fire rammeverksområder som definert ved de kombinerte definisjoner av Kabat og Chothia; b) syntetisering av i) for vert rammeverksområde som skal

10 modifieres, en populasjon av oligonukleotider som hver koder et modifisert rammeverksområde eller en del derav der det modifiserte rammeverksområdet eller delen derav inneholder et antall forandrede aminosyrer på én eller flere posisjoner sammenlignet med det tilsvarende rammeverksområde i akseptorlettkjedevariabeltområde-referansesekvensen der rammeverksområdeposisjonene som er forandret, er valgt blant

15 akseptorrammeverksposisjonene i den andre referansesekvens som skiller seg ved den tilsvarende posisjon sammenlignet med donorammeverksområdeposisjonene for den første referansesekvens; og ii) for hvert komplementaritetsbestemmende område som skal modifieres, en populasjon av oligonukleotider som hver koder et modifisert, komplementaritetsbestemmende område, eller deler derav, der det modifiserte, komplementaritetsbestemmende området omfatter en forskjellig aminosyre på én eller flere

20 posisjoner sammenlignet med den tilsvarende donorkomplementaritetsbestemmende områdeaminoesyreferansesekvens; og iii) for hvert av eventuelle gjenværende og ikke-modifiserte rammeverksområder, oligonukleotidene som koder rammeverksområdet eller posisjoner derav, med samme sekvens som det tilsvarende rammeverksområdet i den andre referanseakseptorsekvens; og iv) for hvert av eventuelle gjenværende og

25 ikke-modifiserte, komplementaritetsbestemmende områder, oligonukleotider som koder det komplementaritetsbestemmende området, eller en del derav, med samme sekvens som det tilsvarende komplementaritetsbestemmende området for den første referanse-donorsekvens, der individuelle oligonukleotider fra (i) til (iv) som koder nabodeler av det lettkjedevariable området, har overlappende sekvenser ved sine termini; og c) å

30 blande oligonukleotidene og populasjonene av oligonukleotider som er syntetisert i trinn b), under betingelser slik at de overlappende sekvenser av individuelle oligonukleotider hybridiserer for å skape overlappende oligonukleotider; og d) å behandle de overlappende oligonukleotider under betingelser slik at det dannes en populasjon av endrede lettkjedevariabeltområdekodende nukleotider. I visse utførelsesformer omfatter

35 metodene videre e) å koeksprimere populasjonen av lettkjedevariabeltområdekodende

nukleinsyrer med en populasjon av tungkjedevariabeltområdekodende nukleinsyrer for å produsere en divers populasjon av endrede, heteromere, variable områder.

(v) Multispesifikke antistoffer

- 5 Det tilveiebringer multispesifikke antistoffer omfattende et Fc-område. Multispesifikke antistoffer har bindingsspesifisitet for minst to forskjellige antigener. Mens slike molekyler normalt kun vil binde to antigener (for eksempel bispesifikke antistoffer, BsAb'er), er antistoffer med ytterligere spesifisiteter som trispesifikke antistoffer, omfattet av dette uttrykk når det benyttes her. Eksempler på BsAb'er inkluderer, men er
- 10 ikke begrenset til, de med én arm rettet mot et tumorcelleantigen og den andre arm rettet mot et cytotoxisk triggermolekyl som anti-FcγRI/anti-CD15, anti-p185HER2/FcγRIII (CD16), anti-CD3/antimalignant B-celle (1D10), anti-CD3/anti-p185HER2, anti-CD3/anti-p97, anti-CD3/antirenal cellekarsinom, anti-CD3/anti-OVCAR-3, antiCD3/L-D1 (anti-kolonkarsinom), anti-CD3/anti-melanocytstimulerende hormonanalog, anti-
- 15 EGF-reseptor/anti-CD3, anti-CD3/anti-CAMA1, anti-CD3/anti-CD19, anti-CD3/MoV18, anti-neural celleadhesjonsmolekyl (NCAM)/anti-CD3, anti-folat bindingsprotein (FBP)/anti-CD3, anti-pan karsinomassosiert antigen (AMOC-31)/anti-CD3; BsAb'er med én arm som binder spesifikt til et tumorantigen og én arm som binder til et toksin som anti-saporin/anti-id-1, antiCD22/anti-saporin, anti-CD7/anti-
- 20 saporin, anti-CD38/anti-saporin, anti-CEA/anti-ricin A-kjede, anti-interferon-α (IFN-α)/anti-hybridoma idiotype, anti-CEA/anti-vinca alkaloid; BsAb'er for konvertering av enzymaktiverte prodrugs som anti-CD30/anti-alkalisk fosfatase (som katalyserer konvertering av mitomycinfosfatprodrug til mitomycinalkohol); BsAb'er som kan benyttes som fibrinolytiske midler som anti-fibrin/anti-vevplasminogenaktivator (tPA),
- 25 anti-fibrin/antiurokinasetype plasminogenaktivator (uPA); BsAb'er for å sikte på immunkomplekser til celleoverflatereseptorer som anti-lavdensitetslipoprotein (LDL)/anti-Fc-reseptor (for eksempel FcγRI, FcγRII eller FcγRIII); BsAb'er for anvendelse ved terapi av infeksjøs sykdommer som anti-CD3/anti-herpes simplex-virus (HSV), anti-T-cellereseptor: CD3 kompleks/antiinfluenza, anti-FcγR/anti-HIV; BsAb'er
- 30 for tumordetektering *in vitro* eller *in vivo* som anti-CEA/anti-EOTUBE, anti-CEA/anti-DPTA, anti-p185HER2/anti-hapten; BsAb'er som vaksineadjuvanter; og BsAb'er som diagnostiske verktøy som antikanin IgG/anti-ferritin, antipepperrotperoksidase (HRP)/antihormon, antisomatostatin/antisubstans P, anti-HRP/anti-FITC, anti-CEA/anti-p-galaktosidase. Eksempler på trispesifikke antistoffer inkluderer, men er ikke
- 35 begrenset til, anti-CD3/anti-CD4/anti-CD37, anti-CD3/anti-CD5/anti-CD37 og anti-

CD3/anti-CD8/anti-CD37. Bispesifikke antistoffer kan fremstilles som fullengde-antistoffer eller antistoffragmenter (for eksempel F(ab')₂-bispesifikke antistoffer).

Metoder for å fremstille bispesifikke antistoffer er velkjente i teknikken. Tradisjonell produksjon av fullengdebispesifikke antistoffer er basert på koekspresjonen av to immunoglobulintungkjedelettkjedepar, der de to kjeder har forskjellige spesifisiteter (se for eksempel Millstein et al., *Nature*, 305: 537-539 (1983)). På grunn av den tilfeldige assortering av immunoglobulin tunge og lette kjeder, gir disse hybridomer (kvadromer) en potensiell blanding av 10 forskjellige antistoffmolekyler av hvilke kun ett har den korrekte, bispesifikke struktur. Rensing av de korrekte molekyler kan gjennomføres ved affinitetskromatografiske trinn. Tilsvarende prosedyrer er beskrevet i WO 93/08829 og i Traunecker et al., *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991).

I en annen vei blir antistoffvariable domener med de ønskede bindingsspesifisiteter (antistoff-antigenkombinasjonsseter) fusert til immunoglobulinkonstante domensekvenser. Fusjonen er fortrinnsvis med et immunoglobulintungkjedekonstant domene omfattende minst en del av hengslen, CH₂- og CH₃-områdene. Det er foretrukket å ha det første tungkjedekonstante området (CH₁) inneholdende setet som er nødvendig for lett kjedebinding, til stede i minst én av fusjonene. DNA'er som koder immunoglobulintungkjedefusjonene og, hvis ønskelig, immunoglobulinlettkjede, skytes inn i separate ekspresjonsvektorer, og kotransfekteres inn i en egnet vertsorganisme. Dette gir høy fleksibilitet når det gjelder justering av gjensidige andeler av de tre polypeptidfragmenter i utførelsesformer der ulike forhold av de tre polypeptidkjeder benyttes ved konstruksjon for å gi optimale utbytter. Det er imidlertid mulig å skyte inn de kodende sekvenser for to eller alle tre polypeptidkjeder i én ekspresjonsvektor når ekspresjonen av minst to polypeptidkjeder i like forhold resulterer i høye utbytter eller når forholdene ikke er av spesiell betydning. I en foretrukket utførelsesform av denne vei består de bispesifikke antistoffer av en hybridimmunoglobulintung kjede med en første bindings-spesifisitet i én arm og et hybridimmunoglobulintungkjedelettkjedepar (som gir en andre bindingsspesifisitet) i den andre arm (se for eksempel WO 94/04690). I henhold til en annen vei som beskrevet i W096/27011), kan grenseflaten mellom et par av antistoffmolekyler konstrueres til å maksimalisere prosentandelen av heterodimerer som gjenvinnes fra rekombinant cellekultur. Bispesifikke antistoffer inkluderer også fornettede eller "heterokonjugat"-antistoffer. For eksempel kan ett av antistoffene i heterokonjugatet kobles til avidin, og det andre til biotin.

B Immunoadhesinmolekyler

Det tilveiebringes også immunoadhesinmolekyler omfattende et variant Fc-område. Én type immunoadhesinkonstruksjon kombinerer bindingsdomenet eller -domenene i adhesinet (for eksempel det ekstracellulære domenet (ECD) i en reseptor) med Fc-

5 området for en immunoglobulintungkjede (for eksempel et variant Fc-område).

Vanligvis og når man fremstiller immunoadhesinene, vil nukleinsyrer som koder bindingsdomenet for adhesin, være fusert C-terminalt til nukleinsyre som koder N-terminus av en immunoglobulinkonstant domenesekvens, imidlertid er N-terminale fusjoner også mulige.

10

Typisk vil i slike fusjoner det kodede, kimeriske polypeptid bibeholde minst funksjonelt aktivt hengsel-, CH2- og CH3-domener for det konstante området av en immunoglobulintungkjede. Fusjoner foretas også til C-terminus av Fc-delen av et konstant domene, eller umiddelbart N-terminalt til CH1 av den tunge kjede eller det tilsvarende

15 området av den lette kjede. Det eksakte setet der fusjonen foretas er ikke kritisk; spesielle seter er velkjente og kan velges for å optimalisere den biologiske aktivitet, sekresjon eller bindingskarakteristika for immunoadhesinet.

20

I noen utførelsesformer blir adhesinsekvensen fusert til N-terminus av variant Fc-området av immunoglobulin G₁. Det er mulig å fusere hele det tungkjedekonstante området til adhesinsekvensen. Imidlertid blir i foretrukne utførelsesformer en sekvens som begynner i hengselområdet akkurat oppstrøms papainspaltingssetet som definerer IgG Fc kjemisk (det vil si rest 216, idet den første rest av det tungkjedekonstante området er 114), eller analoge seter av immunoglobuliner, benyttet i fusjonen. I visse

25 foretrukne utførelsesformer blir adhesinaminosyresekvensen fusert til (a) hengselområdet og CH2- og CH3- eller (b) CH1-, hengsel-, CH2- og CH3-domene, av en IgG-tung kjede. I noen utførelsesformer er immunoadhesinene bispesifikke.

30

Alternativt kan adhesinsekvensen innføres mellom immunoglobulintungkjede- og -lett-kjedesekvensene, slik at det oppnås et immunoglobulin omfattende en kimerisk tung kjede. I slike utførelsesformer kan adhesinsekvensene fuseres til 3'-enden av immunoglobulintungkjeden i hver arm av et immunoglobulin, enten mellom hengsel- og CH2-domenet eller mellom CH2- og CH3-domene (se for eksempel Hoogenboom et al., Mol. Immunol. 28:1027-1037 (1991), ansett som del av beskrivelsen).

35

Selv om nærværet av en immunoglobulinlettkjede ikke er krevd i immunoaderesinene ifølge oppfinnelsen, kan en immunoglobulinlettkjede presenteres enten kovalent assosiert til et adhesinimmunoglobulintungkjedefusjonspolypeptid, eller fusert direkte til adhesinet. I det først nevnte tilfellet blir DNA som koder en immunoglobulinlett-

5 kjede, typisk koeksprimert med DNA som koder adhesinimmunoglobulintungkjedefusjonsproteinet. Ved sekresjon vil hybridtungkjeden og den lette kjede kovalent assosieres for å gi en immunoglobulinlignende struktur omfattende to disulfidlinkede, immunoglobulintungkjedelettkjedepar. Metoder som er egnet for fremstilling av slike konstruksjoner er for eksempel beskrevet i US 4 816 567.

10

I foretrukne utførelsesformer blir immunoaderesiner konstruert ved fusjon av cDNA-sekvensen som koder adhesindelen in-frame til en immunoglobulin cDNA-sekvens. Imidlertid kan det også benyttes fusjon til genomiske immunoglobulinfragmenter. Generelt krever den siste nevnte fusjonstype nærvær av Ig-regulatoriske sekvenser for

15 ekspresjon. cDNA'ene som koder IgG-tungkjedekonstante områder, kan isoleres basert på publiserte sekvenser fra cDNA-biblioteker avledet fra milt eller periferblodlymfocytter ved hybridisering eller polymerasekjedereaksjons(PCR)-teknikker. cDNA'ene som koder "adhesinet" og immunoglobulin-delene av immunoaderesinet, kan skytes inn i tandem i en plasmidvektor som styrer effektiv ekspresjon i den valgte vertscelle.

20

VI. Nukleinsyresekvenser som koder Fc-områdevarianter

Det tilveiebringes også nukleinsyresekvenser som koder Fc-områdevarianter, så vel som preparater, vektorer og vertsceller omfattende nukleinsyresekvenser som koder Fc-områdevarianter. Det tilveiebringes også rekombinante metoder for å fremstille Fc-

25 områdevarianter.

Generelt og for rekombinant produksjon av varianter, blir nukleinsyre som koder varianten, isolert og skutt inn i en vektor. Vertsceller kan transfekteres med vektoren og derved tillate at nukleinsyresekvensen forsterkes og/eller variantpeptidet produseres.

30 Nukleinsyresekvenser som koder peptidvariantene ifølge oppfinnelsen, kan isoleres og sekvenseres ved bruk av konvensjonelle prosedyrer (for eksempel ved bruk av oligonukleotidprober som er i stand til spesifikt å binde til en nukleinsyre som koder varianten). Generelt er nukleinsyresekvensen som koder varianten, operativt forbundet til andre elementer, for eksempel en signalsekvens (for eksempel en sekretorisk signalsekvens), en replikasjonsopprinnelse, minst ett markørgen, en enhancer, en promoter

35

eller en transkripsjonsterminator. I visse utførelsesformer blir vertscellene stabilt transfektert med nukleinsyre som koder en variant for å generere en cellelinje som uttrykker en spesiell variant. I foretrukne utførelsesformer blir variantene uttrykt i CHO-, NSO-, Sp2/0-, PER.C6- eller HEK293-celler. Rekombinante metoder er velkjente i teknikken.

5

Nukleinsyresekvenser kan muteres slik at variant Fc-områdene kan fremstilles. For eksempel kan en nukleinsyresekvens som koder et parentalt Fc-område (for eksempel SEKV.ID. NR. 32), muteres slik at det oppstår minst én aminosyreforandring når nukleinsyresekvensen uttrykkes. Videre kan nukleinsyresekvenser som koder minst en del av et parentalt Fc-område, muteres for å gi aminosyresekvenser omfattende minst en del av en Fc-områdevariant. For eksempel kan SEKV.ID. NR. 32 muteres, slik at det oppstår minst én aminosyresekvens (se for eksempel SEKV.ID. NR. 38, SEKV.ID. NR. 39, SEKV.ID. NR. 40, SEKV.ID. NR. 41, SEKV.ID. NR. 42, SEKV.ID. NR. 43, SEKV.ID. NR. 44, SEKV.ID. NR. 45, SEKV.ID. NR. 46, SEKV.ID. NR. 47, SEKV.ID. NR. 48, SEKV.ID. NR. 49, SEKV.ID. NR. 50, SEKV.ID. NR. 51, SEKV.ID. NR. 52, SEKV.ID. NR. 53, SEKV.ID. NR. 54, SEKV.ID. NR. 55 og SEKV.ID. NR. 56).

I visse utførelsesformer blir kodonbasert syntese benyttet for å generere muterte sekvenser. Eksempler på kodonbasert syntese inkluderer for eksempel de som er beskrevet i US 5 264 563, 5 523 388 og 5 808 022, alle ansett som del av beskrivelsen. Kort sagt kan kodonbasert syntese gjennomføres ved sekvensielt å koble monomerer på separate bærere for å danne minst to forskjellige tupletter. Koblingen kan gjennomføres i separate reaksjonsbeholdere og så å blande bærerne fra reaksjonsbeholderne og så å dele de blandede bærerne i to eller flere separate reaksjonsbeholdere og gjenta koblingen, blandingen og delingen én eller flere ganger i reaksjonsbeholderne for så å ende opp med et blande- eller deletrinn. I tillegg kan oligonukleotidene spaltes fra bærerne.

VII. Terapeutiske anvendelser og formuleringer

I noen utførelsesformer tilveiebringer foreliggende oppfinnelse terapeutiske formuleringer omfattende variantene som beskrevet her. Slike preparater kan også inkludere en polypeptidvariant (eller en del derav), tilveiebrakt sammen med fysiologisk aksepterbare væsker, geler, faste bærere, diluenter, adjuvanser og eksipienter og kombinasjoner derav (se for eksempel Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. utgave, Osol, A. Ed. (1980)).

I tillegg kan polypeptidvarianter benyttes sammen med andre terapeutiske midler inkludert, men ikke begrenset til, salisylater, steroider, immunosuppressanter, antistoffer eller antibiotika. Spesielle, terapeutiske midler som kan benyttes med variantene ifølge oppfinnelsen, inkluderer, men er ikke begrenset til, de følgende midler: azobenz-

5 forbindelser (US 4 312 806), benzylsubstituert rhodaminderivater (US 5 216 002) sink-L-karnosinsalter (US 5 238 931), 3-fenyl-5-karboksy-pyrazoler og -isotiazoler (US 5 294 630), IL-10 (US 5 368 854), kinolinleukotriensynteseinhibitorer (US 5 391 555), 2'-halo-2'-deoksyadenosin (US 5 506 213) fenol- og benzamid-

10 forbindelser (US 5 552 439) tributyrin (US 5 569 680), visse peptider (US 5 756 449), ω -3-polyumettete syrer (US 5 792 795), VLA-4-blokkere (US 5 932 214), prednisolon-metasulfobenzoat (US 5 834 021) cytokinbegrensende midler (US 5 888 969) og nikotin (US 5 889 028)).

Polypeptidvarianter kan benyttes sammen med midler som reduserer levedyktigheten

15 eller det proliferative potensialet for en celle. Midler som reduserer levedyktigheten eller det proliferative potensialet for en celle, kan virke på et antall måter inkludert for eksempel inhibering av DNA-syntesen, inhibering av celledeling, indusering av apoptose eller indusering av ikke-apoptotisk celleavlivning. Spesifikke eksempler på cytotoxiske og cytostatiske midler inkluderer, men er ikke begrenset til, kermesbær

20 (pokeweed) antiviralt protein, abrin, ricin og hver av disse A-kjeder, doksorubicin, cisplastin, jodin-131, yttrium-90, rhenium-188, bismut-212, taxol, 5-fluoruracil VP-16, bleomycin, metotreksat, vindesin, adriamycin, vincristin, vinblastin, BCNU, mitomycin og syklofosfamid og visse cytokiner som TNF- α og TNF- β . Således kan cytotoxiske eller cytostatiske midler for eksempel inkludere radionuklider, kjemoterapeutiske

25 medikamenter, proteiner og lektiner.

Terapeutiske preparater kan for eksempel inneholde slike som vanligvis benyttede additiver som bindere, fyllstoffer, bærere, conserveringsmidler, stabilisatorer, emulgatorer, buffere og eksipienter som for eksempel farmasøytiske kvaliteter av

30 mannitol, laktose, stivelse, magnesiumstearat, natriumsakkarin, cellulose, magnesiumkarbonat og lignende. Disse preparater inneholder typisk 1-95 % aktiv bestanddel og særlig 2-70 % aktiv bestanddel.

Polypeptidvariantene ifølge oppfinnelsen kan også blandes med diluenter eller eksipienter som er kompatible og fysiologisk godtagbare. Egnede diluenter og eksipienter er for eksempel vann, saltoppløsning, dekstrose, glyserol og lignende og kombinasjoner

35

derav. I tillegg kan, hvis ønskelig, preparatene inneholde mindre mengder hjelpestoffer som fuktere eller emulgatorer, stabilisatorer eller pH-buffere.

- I noen utførelsesformer kan det terapeutiske preparatet ifølge oppfinnelsen fremstilles enten som en flytende oppløsning eller suspensjon eller som spray eller i faste former. Orale formuleringer inkluderer vanligvis slike vanligvis benyttede additiver som bindemidler, fyllstoffer, bærere, conserveringsmidler, stabilisatorer, emulgatorer, buffere og eksipienter som for eksempel farmasøytiske kvaliteter av mannitol, laktose, stivelse, magnesiumstearat, natriumsakkarin, cellulose, magnesiumkarbonat og lignende.
- 10 Preparatene har form av oppløsninger, suspensjoner, tabletter, pillere, kapsler, formuleringer for vedvarende frigivning, eller pulvere, og inneholder typisk 1-95 % aktiv bestanddel, særlig 2-70 %. Ett eksempel på et oral preparat som er brukbart for å avlevere terapeutiske preparater ifølge oppfinnelsen, er beskrevet i US 5 643 602.
- 15 Ytterligere formuleringer som er egnet for andre administreringsveier slik som topisk administrering, inkluderer salver, tinkturer, kremer, lotions, transdermale puter og suppositorier. For salver og kremer kan tradisjonelle bindemidler, bærere og eksipienter for eksempel inkludere polyalkylenglykoler eller triglyserider. Ett eksempel på en topisk avleveringsmetode er beskrevet i US 5 834 016, ansett som del av beskrivelsen.
- 20 Andre liposomale avleveringsmetoder kan også benyttes, se for eksempel US 5 851 548 og 5 711 964.

- Formuleringene kan også inneholde mer enn én aktiv forbindelse etter behov for den spesielle indikasjon som behandles, fortrinnsvis de med komplementære aktiviteter som ikke ugunstig påvirker hverandre. Slike molekyler er hensiktsmessig til stede i kombinasjon i mengder som er effektive for det tilsiktede formål.
- 25

- Preparater for vedvarende frigivning kan også fremstilles. Egnede eksempler på preparater for vedvarende frigivning inkluderer semipermeable matrikser av faste, hydrofobe polymerer som inneholder polypeptidvarianten, hvilke matrikser foreligger i form av formgitte gjenstander som filmer eller mikrokapsler. Eksempler på matrikser for vedvarende frigivning inkluderer, men er ikke begrenset til, polyestere, hydrogeler (som poly(2-hydroksyetylmetakrylat) eller poly(vinylalkohol)), polylaktider, kopolymerer av L-glutaminsyre og (γ) etyl-L-glutamat, ikke-nedbrytbart etylenvinylacetat, nedbrytbar
- 30 melkesyre-glykolsyrekopolymerer som LUPRON DEPOT (injiserbare mikrosfærer bestående av melkesyre-glykolsyrekopolymer og leuprolidacetat) og poly-D-(-)-3-
- 35

hydroksysmørsyre. Mens polymerer som etylenvinylacetat og melkesyreglykolsyre muliggjør frigivning av molekyler i over 100 dager, frigir visse hydrogeler proteiner i løpet av kortere tidsrom.

- 5 Polypeptidvariantene ifølge oppfinnelsen kan benyttes for å behandle et individ. Slik behandling kan administreres til et individ med en sykdom eller kan administreres profylaktisk til et individ (for eksempel et individ som er predisponert for en sykdom). Eksempler på tilstander som kan behandles, inkluderer, men er ikke begrenset til, cancer (for eksempel der polypeptidvarianten binder HER2-reseptoren, CD20 eller vaskulær
10 endotelial vekstfaktor (VEGF)); allergiske tilstander som astma (med et anti-IgE-antistoff); og LFA-1-medierte forstyrrelser (der for eksempel polypeptidvarianten er et anti-LFA-1- eller anti-ICAM-1-antistoff) og så videre.

- I ytterligere utførelsesformer omfatter variantene som benyttes for å behandle individer,
15 antistoffer eller immunoadhesiner. Også i foretrukne utførelsesformer er sykdommen som behandles, antistoff- eller immunoadhesinresponsive sykdommer. Eksempler på antistoffresponsive sykdommer inkluderer sykdommer og medisinske tilstander som: lymfom (som kan behandles med RITUXAN eller anti-CD20-antistoff), infeksiose sykdommer (som kan behandles med SYNAGIS, et antistoff rettet mot F-proteinet av
20 respiratoriske syncytiske virus), nyretransplantat (ZENAPAX, et anti-IL-2-reseptor-antistoff som har vist seg å være nyttig), Crohns sykdom og reumatoid artritt (som kan behandles med REMICADE, et anti-TNF α -antistoff), brystkarsinom (som kan behandles med HERCEPTIN, et anti-HER2-antistoff) og koloncancer (som kan behandles med EDRECOLOMAB, et anti-17-1A-antistoff).

- 25 I noen utførelsesformer blir en polypeptidvariant med forbedret ADCC-aktivitet (for eksempel P247L- eller I332E-varianten) benyttet ved behandling av sykdommer eller forstyrrelser der destruering eller eliminering av vev eller fremmede mikroorganismer, ønskes. For eksempel kan varianten benyttes for å behandle cancer; inflammatoriske
30 forstyrrelser; infeksjoner (for eksempel bakterielle, virale, fungale eller gjær-infeksjoner); og andre tilstander (som struma) der fjerning av vevet er ønsket. I andre utførelsesformer har polypeptidvarianten sterkt redusert ADCC-aktivitet (for eksempel I332R- eller I332K-varianten). Slike varianter kan benyttes for å behandle sykdommer eller forstyrrelser der et Fc-områdeholdig polypeptid med lang halveringstid er ønskelig,
35 men der polypeptidet fortrinnsvis ikke har noen uønskede effektorfunksjoner. For eksempel kan det fc-områdeholdige polypeptid være et antivevsfaktor(TF)-antistoff;

anti-IgE-antistoff; og anti-integrinantistoff (for eksempel et anti- $\alpha 4\beta 7$ -antistoff). Den ønskede virkningsmekanisme for slike Fc-områdeholdige polypeptider kan være å blokkere ligandreseptorbindingspar. Videre kan det Fc-områdeholdige polypeptid med redusert ADCC-aktivitet være et agonistantistoff.

5

- Polypeptidvariantene ifølge oppfinnelsen kan administreres på en hvilken som helst egnet måte, inkludert parenteral, subkutan, topisk, intraperitoneal, intrapulmonær og intranasal og også intralesjonal administrering (for eksempel for lokal immuno-suppressiv behandling). Parenterale infusjoner inkluderer intramuskulær, intravenøs, 10 intraarteriell, intraperitoneal eller subkutan administrering. I tillegg blir polypeptid-varianten hensiktsmessig administrert ved pulsinfusjon, og særlig med synkende doser av polypeptidvarianten. Fortrinnsvis gis dosen ved injeksjon og spesielt ved intravenøs eller subkutan injeksjon, avhengig av hvorvidt administreringen er kort eller kronisk.
- 15 For prevensjon eller terapi av sykdommen vil de egnede doser av polypeptidvariant avhenge av typen av sykdom som behandles, alvoret og forløpet ved sykdommen, hvorvidt polypeptidvarianten administreres for preventive eller terapeutiske formål, tidligere terapi, pasientens kliniske historie og responsen på polypeptidvarianten, samt den ansvarlige leges bedømmelse. Polypeptidvarianten blir hensiktsmessig administrert 20 til pasienten på en gang eller over en serie behandlinger.

- For eksempel, avhengig av typen og alvoret av sykdommen, er rundt 1 $\mu\text{g/kg}$ til rundt 15 mg/kg (for eksempel 0,120 mg/kg) polypeptidvariant i en initialkandidatdosering for administrering til pasienten, velegnet, for eksempel ved én eller flere separate 25 administreringer, eller ved kontinuerlig infusjon. En typisk, daglig dose kan ligge fra rundt 1 $\mu\text{g/kg}$ til 100 mg/kg eller mer, avhengig av de faktorer som er kjent ovenfor. For repetert administrering over flere dager eller mer, avhengig av tilstanden, blir behandlingen opprettholdt inntil symptomene er tilstrekkelig redusert eller eliminert. Forløpet av denne terapi overvåkes lett ved konvensjonelle teknikker og analyser, og 30 kan benyttes for å justere doseringene for å oppnå en terapeutisk effekt.

- En terapeutisk effektiv mengde av en polypeptidvariant for administrering er det dose-nivå som kreves for en pasient slik at symptomene på sykdommen som behandles, reduseres. Polypeptidvarianten behøver ikke å være, men kan eventuelt formuleres med 35 ett eller flere midler som konvensjonelt benyttes for å forhindre eller behandle den angjeldende forstyrrelse. Den effektive mengde av slike andre midler avhenger av

mengden polypeptidvariant som er til stede i formuleringen, type forstyrrelse eller behandling, samt andre faktorer som diskutert ovenover.

VIII. Ytterligere variant Fc-områdeanvendelser

- 5 Variantene og nukleinsyresekvensene som koder variantene ifølge oppfinnelsen, kan benyttes på mange måter. For eksempel kan varianter ifølge oppfinnelsen benyttes i medikamentscreeningsanalyser. For eksempel kan kandidatforbindelser evalueres med henblikk på evnen til å endre eller interferere med Fc-effektorfunksjoner ved å bringe en variant i kontakt med kandidatforbindelsen og så å bestemme bindingen til kandidat-
- 10 forbindelsen til varianten. Varianten kan immobiliseres ved bruk av i og for seg kjente metoder som binding av et GST-variantfusjonsprotein til en polymerkule inneholdende glutation. Et kimerisk gen som koder et GST-fusjonsprotein, konstrueres ved fusering av DNA som koder varianten av interesse til DNA som koder karboksylterminus av GST (se for eksempel Smith et al., Gene 67:31 [1988]). Fusjonskonstruktet overføres så
- 15 til et egnet ekspresjonssystem (for eksempel E. coli XA90) der ekspresjonen av GST-fusjonsproteinet kan inkluderes med isopropyl- β -D-tiogalaktopyranosid (IPTG). Induksjonen med IPTG skal så gi fusjonsproteinet som hovedbestanddel av oppløselige, cellulære proteiner. Fusjonsproteinene kan renses på i og for seg kjent måte inkludert rensing ved glutationaffinitetskromatografi. Binding av kandidatforbindelsen til
- 20 varianten korreleres med evnen hos forbindelsen til å avbryte én eller flere effektorfunksjoner.

- I en annen screeningsmetode blir enten varianten eller en valgt FcR immobilisert ved bruk av i og for seg kjente metoder som adsorpsjon på plastmikrotiterplater eller
- 25 spesifikk binding av et GST-fusjonsprotein til en polymerkule inneholdende glutation. For eksempel blir GST-varianten bundet til glutationsefarsekuler. Den immobiliserte variant bringes så i kontakt med en Fc-reseptor og en kandidatforbindelse. Ikke-bundet peptid fjernes deretter og komplekset oppløseliggjøres og analyseres for å bestemme mengden av bundet, merket polypeptid. En reduksjon i binding er en indikasjon på at
 - 30 kandidatforbindelsen inhiberer interaksjonen av varianten med Fc-reseptoren. Denne screeningsmetode er spesielt nyttig med varianter ifølge oppfinnelsen som viser et økt nivå av Fc-reseptorbinding (for eksempel fordi mange parentale Fc-reseptorer er lav-affinitetsreseptorer, som Fc γ RIII, Fc γ RIIb og Fc γ RIIa). En variasjon av denne metode tillater screening av forbindelser som er i stand til å disruptere et tidligere dannet
 - 35 variant/Fc-reseptorkompleks. For eksempel blir i noen utførelsesformer et kompleks omfattende en variant bundet til en Fc-reseptor immobilisert som beskrevet ovenfor, og

brakt i kontakt med en kandidatforbindelse. Oppløsning av komplekset med kandidatforbindelsen korrelerer med evnen hos forbindelsen til å disruptere eller inhibere interaksjonen mellom varianten som testes, og Fc-reseptoren som blir. I denne forbindelse kan forbindelser med terapeutisk potensiale (for eksempel i mennesker)

- 5 identifiseres (forbindelser som er brukbare ved behandling av human sykdom som autoimmune sykdommer).

En annen teknikk for medikamentscreening tilveiebringer et høygjennomløpsscreening for forbindelser med egnet bindingsaffinitet til variantpeptider og er beskrevet i detalj i

10 WO 84/03564, ansett som del av beskrivelsen. Kort sagt blir et stort antall forskjellige småpeptidtestforbindelser syntetisert på et fast substrat, som plastpinner eller en annen overflate. Peptidtestforbindelsene blir så omsatt med variantpeptider og vasket. Budne variantpeptider blir så detektert på i og for seg kjent måte.

- 15 En annen teknikk bruker antistoffer rettet mot variantpeptider. Slike antistoffer som er i stand til spesifikt å binde til variantpeptider, konkurrerer med en testforbindelse for binding til en gitt variant. På denne måte kan antistoffer benyttes for å detektere nærværet av et hvilket som helst peptid som deler én eller flere antigeniske determinanter av variantpeptidet.

20

Særlig tar foreliggende oppfinnelse sikte på bruken av cellelinjer som er transfektert med nukleinsyre som koder minst én Fc-områdevariant for screeningsforbindelser for aktivitet, og særlig høygjennomløpsscreening av forbindelser fra kombinatoriske

25 biblioteker (for eksempel biblioteker inneholdende mer enn 10^4 -forbindelser). Cellelinjene kan benyttes i et antall screeningsmetoder.

Variantene ifølge oppfinnelsen kan benyttes som affinitetsrengjørende midler. For eksempel kan varianten immobiliseres på en fast fase som Sephadex-harpiks eller filter-

30 papir ved bruk av i og for seg kjente metoder. Den immobiliserte variant bringes så i kontakt med en prøve inneholdende antigenet som skal renses, og deretter vaskes bæreren med et egnet oppløsningsmiddel som fjerner i det vesentlige alt materialet i prøven bortsett fra antigenet som skal renses, som bindes til den immobiliserte polypeptidvariant. Til slutt blir bæreren vasket med et annet, egnet oppløsningsmiddel

35 som glysinbuffer, pH 5,0, som frigir antigenet fra polypeptidvarianten.

- Polypeptidvarianten kan også være brukbar i diagnostiske analyser (for eksempel for å detektere ekspresjonen av et antigen av interesse i spesifikke celler, vev eller serum). For diagnostiske anvendelser vil varianten typisk merkes med en detekterbar del (slike merkelapper er også brukbare ved de ovenfor beskrevne Fc-områdeanalyser). Tallrike
- 5 merkelapper er tilgjengelige og inkluderer, men er ikke begrenset til, radioisotoper (for eksempel ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H og ^{131}I), fluorescente merkelapper (for eksempel sjeldne jordchelater (europiumchelater) eller fluorescein og derivater derav, rhodamin og derivater derav, dansyl, Lissamin, fykoerytrin og Texas-rødt) og forskjellige enzym-
- 10 substratmerkelapper (se for eksempel US 4 275 149, ansett som del av beskrivelsen) og luciferase, luciferin, 2,3-dihydroftalazindioner, malatdehydrogenase, urease, peroksidase som pepperrotperoksidase (HRPO), alkalisk fosfatase, β -galaktosidase, glukamylase, lysozym, saccaridoksidaser (for eksempel glukoseoksidase, galaktoseoksidase og glukose-6-fosfatdehydrogenase), heterosykliske oksidaser (som urikase og xantinoxidase), laktoperoksidase, mikroperoksidase og lignende). Eksempler på enzym-
- 15 substratkombinasjoner inkluderer for eksempel: (i) pepperrotperoksidase (HRPO) med hydrogenperoksidase som et substrat, der hydrogenperoksidasen oksiderer en fargestoffforløper (for eksempel ortofenylendiamin (OPD) eller 3,3',5,5'-tetrametylbenzidinhydroklorid (TMB)); (ii) alkalisk fosfatase (AP) med para-nitrofenylfosfat som kromogenisk substrat; og (iii) -D-galaktosidase (R-D-Gal) med et kromogenisk substrat eller
- 20 fluorogenisk substrat.

- Varianten ifølge oppfinnelsen kan også benyttes for *in vivo*-diagnostiske analyser. For eksempel blir en polypeptidvariant merket med et radionuklid slik at antigenet eller celler som uttrykker dette kan lokaliseres ved bruk av immunoscintigrafi.
- 25

EKSPERIMENTELT

- De følgende eksempler skal gis for å demonstrere og videre illustrere visse foretrukne utførelsesformer og aspekter ved oppfinnelsen.
- 30 I den eksperimentelle beskrivelsen som følger benyttes følgende forkortelser: N (normal); M (molar); mM (millimolar); μM (mikromolar); mol (mol); mmol (millimol); μmol (mikromol); nmol (nanomol); pmol (pikomol); g (gram); mg (milligram); μg (mikrogram); ng (nanogram); l eller L (liter); ml (milliliter); μl (mikroliter); cm (centimeter); mm (millimeter); μm (mikrometer); nm (nanometer); DS (dekstransulfat);
- 35 og $^{\circ}\text{C}$ (grader celsius).

Eksempel 1

Screeningsvarianter i ADCC-analyse

Dette eksempel beskriver hvordan varianter ble screenet i en ADCC-analyse. Alle screenede varianter var anti-CD20-antistoffer (basert på variabelt områdespesifisitet).

5

i. PBMC(perifere, blodmononukleære celler)-isolering

- Rundt 50 ml perifert blod oppnås fra en frisk donor og fortynnes 1:2 med fosfatbufret saltoppløsning (PBS), pH 7,0. Oppløsningene blandes ved forsiktig slynging av røret. Rundt 12 mL Histopaque-1077 (Sigma katalog nr. 1077-1) sjiktes forsiktig under den
- 10 fortynnete blodprøve fulgt av sentrifugering i en Sorvall RT6000B-sentrifuge med en svingkurvrotor ved 1 000 omdr./min i 10 min med bremsene slått av. Den øvre fase av gradienten kasseres ved avsuging og den hvitfargede, PBMC-holdige interfase samles og vaskes 3 ganger med Hanks balanserte saltoppløsning (Gibco katalog nr. 14025-092). Den vaskede cellepellet suspenderes i rundt 20 ml RPMI 1640 medium inne-
- 15 holdende 10 % føtalt, bovint serum (FBS) (Omega sertifikatkatalog nr. FB-01). De resuspenderte PBMC'er splittes i to T-175 kulturkolber og 30 ml RPMI inneholdende 10 % FBS, settes til hver av disse, fulgt av inkubering over natten i en 37 °C 5 % CO₂-inkubator. Den følgende dag ble ikke-adherente PBMC'er samlet i 50 ml Falcon-rør, sentrifugert som ovenfor og resuspendert i RPMI inneholdende 1 % FBS uten fenolrødt.
- 20 En liten del av de resuspenderte celler fortynnes 10 ganger og telles ved bruk av et hemocytometer. De gjenværende PBMC'er anbringes i inkubatoren inntil de trengs.

ii. Målcellelinje (disse er spesifikke for anti-CD20-ADCC-analyser)

- Wil.2 og SKW6.4 CD20-uttrykkende B-cellelinjer ble oppnådd fra ATCC og dyrket
- 25 som anbefalt. Én dag før bruk splittes cellene 2 ganger. Den neste dag justeres celletallet til 4×10^5 celler/ml og 50 µl aliquoter (20 000 celler/brønn) settes til en 96-brønners vevkulturplate.

iii. IgG-fortynninger

- 30 Før screening uttrykkes IgG-varianter og kvantiteres ved bruk av en standard enzym-linket immunosorbentanalyse (ELISA). For primær enkelpunkts ADCC-screening blir IgG-varianter fortynnet til 40 ng/ml i RPMI-medium inneholdende 1 % FBS uten fenolrødt. Slutt-IgG-konsentrasjonen i analysen fortynnes med en faktor 4 ((det vil si 10 ng/ml sluttkonsentrasjon). 50 mikroliters aliquoter av IgG settes til målculturene og
- 35 inkuberes i rundt 15 min ved 37 °C før tilsetting av effektorcellene til de opsonizerte målceller.

Etter at IgG-titreringer er gjennomført varieres IgG-konsentrasjonen i området fra 0,0001 til 1 µg/ml. IgG-fortynninger prepareres ved bruk av en 96-brønners mikrotiterplate ved fortynning av prøvene i RPMI inneholdende 1 % FBS uten fenolrødt. De
5 fortynnete IgG-prøver settes så til analyseplaten inneholdende målcellene.

iv. Effektorceller

Konsentrasjonen av PBMC'ene justeres slik at effektor:målforholdet ligger i området 10-20:1 (det vil si $2-4 \times 10^6$ celler/ml). 100 mikroliter av de resuspenderte PBMC'er
10 settes til hver brønn av de opsonizerte målceller. Platene inkuberes ved 37 °C i nærvær av 5 % CO₂ i 3-4 timer.

v. Laktatdehydrogenase(LDH)-frigivningsdetektering

Målcellelysering måles ved detektering av frigivning av laktatdehydrogenaseenzym fra
15 cytoplasmaet til skadede celler inn i kultursupernatanten. Etter inkubering av de opsonizerte målceller med effektorceller, sentrifugeres analyseplatene ved 2 000 omdr./min i 5 min. Rundt 75 µl av cellekultursupernatanten fjernes forsiktig, mens de pelleterte celler og debris unngås. Denne supernatant settes direkte til en mikrotiterplate og dertil settes 75 µl LDH-detekteringsreagens (Roche katalog nr. 1 644 793). Platen inkuberes
20 deretter i rundt 15-30 min og absorbansen avledes ved 490 nm ved bruk av en Molecular Devices Vmax Kinetic Mikroplate Reader.

vi. Dataanalyse

Alle enkeltpunkts ADCC-screeningsanalyser gjennomføres i duplikat. Hver analyseplate inneholder kontroller for spontan mållysering, spontan effektor- pluss mållysering
25 i fravær av IgG, samt målcelletotalysering. Målcelletotalysering oppnås ved å sette 1 % Triton X-100 til målcellene. Tre villtypekontroller inkluderes på hver analyseplate og gjennomsnittet av ADCC-analysesignalet beregnes. Bakgrunnsverdien, oppnådd fra de spontane lyseringskontroller, trekkes fra hver prøve. Bakgrunnsverdiene, oppnådd fra
30 fortynnet IgG, trekkes fra hver prøve. Data konverteres fra absorbansverdier til prosent spesifikk-lyseringsbaserte slike etter spontane og totale lyseringskontroller. Prosentandelen spesifikk lysering beregnes fra den følgende ligning:

prosentandel spesifikk lysering = $(\text{forsøks A}_{490} - \text{bakgrunns A}_{490}) / (\text{maksimal A}_{490} - \text{bakgrunns A}_{490}) \times 100$
35

- der bakgrunn A490 er summen av den A490 som oppnås fra effektor- og målcellene i fravær av IgG og IgG-bakgrunnen som skyldes kontaminerende LDH som er til stede i rå-IgG-supernatantene. Prosentandelen Fc-variantaktivitet normaliseres i forhold til gjennomsnittsvilltypekontroller. Gjennomsnittet ble beregnet for prosentandelen av den normaliserte aktivitet for duplikatanalyseplater og standardavvik mellom individuelle analyseplater beregnes for hver prøve.

vii. Resultater

- Den relativ ADCC-spesifikke aktivitet er vist i tabell 2. CDC-verdiene som rapporteres i denne tabell, ble generert som beskrevet i eksempel 4 og FcRn-bindingsanalyseverdien som er rapportert i denne tabell, ble generert som beskrevet i eksempel 5.

TABELL 2

Variant	ADCC	FcRn 6.0	FcRn 7.0	CDC
Parental	100	100	100	100
P247H	161	79	73	81
P247I	163	89	74	42
P247L	166	92	78	49
L251F	123	102	100	138
T256M	126	72	82	167
T256P	115	132	121	315
H268D	127	87	84	137
H268E	129	90	81	108
D280A	144	91	84	141
D280K	140	103	93	144
A330K	129	104	99	43
A330R	123	77	101	31
I332D	145	91	102	146
I332E	161	99	97	150
I332K	12	109	97	67
I332R	12	97	92	88
A339T	130	115	109	189
A378D	101	122	93	28
S440Y	116	106	102	199

Figur 7A viser representative ADCC-data oppnådd etter titrering av IgG-varianter. I dette forsøk ble SKW6.4-celler opsonisert ved bruk av både enkelt- og dobbelt-aminosyre-Fc-område-IgG-varianter, fulgt av tilsetning av PBMC'er i et forhold på 15:1. Analyseplaten ble inkubert ved 37 °C i nærvær av 5 % CO₂ i 3 timer, fulgt av sentrifugering. En del av supernatanten ble samlet og overført til en mikrotiterplate og LDH-aktiviteten for supernatanten detektert ved tilsetning av et likt volum LDH-substrat. Etter fargeutvikling ble absorbansen avlest ved 490 nm. Bakgrunnen som skyldes kontaminerende LDH i rå-IgG-supernatantene, ble målt og disse bakgrunnsverdier ble trukket fra rå A490 og ga data som vist i figur 7A. Disse data viser at sammenlignet med villtype-anti-CD20-antistoffet er ADCC-aktiviteten for A330K-, A330R- og I332E-enkelt-aminosyrevarianter forsterket. Kombinasjonen av enten A330K eller A330R med I332E-varianten forsterker videre ADCC-aktiviteten. En ikke-spesifikk IgG viser ingen aktivitet under disse analysebetingelser. Resultatene for en tilsvarende analyse der glykosylering endres, er vist i figur 7B. Spesielt viser 7B (prøve merket GnTIII) at aktiviteten for I332-varianten kan forsterkes ytterligere med endret glykosylering (ved for eksempel å øke innholdet av bisekterende GlcNAc).

Figur 8 viser representative ADCC-data oppnådd ved bruk av rensset IgG. Plottet viser prosentandel cytotoxissitet versus IgG-konsentrasjon for en ikke-spesifikk IgG, villtype-anti-CD20 og Fc-områdevariantene I332D og I332E. Prosentandel cytotoxissitet ble beregnet, basert på den følgende ligning:

$$\% \text{ cytotoxissitet} = (\text{forsøks A490} - \text{bakgrunns A490}) / (\text{maksimal A490} - \text{bakgrunns A490}) \times 100$$

der bakgrunns A490 oppnås oppnås fra effektor- og målceller i fravær av IgG. Disse data viser at ADCC-aktiviteten for I332D- og I332E-variantene forsterkes sammenlignet med villtypen. Målcellene som benyttes i dette forsøk, var SKW6.4 og det ble benyttet et effektor:målforhold på 15:1 i en standard 3 timers ADCC-analyse.

Figur 9 viser den samme type ADCC-aktivitet bortsett fra at et lavere affinitetsvariabelt område benyttes (AME 6F1 istedenfor AME 33). Denne figur vier at ADCC-aktiviteten med den spesielle anti-CD20-spesifisitet og Wil-2- og SKW6.4-cellelinjene er uavhengig av variabelt områdeaffinitet.

Figur 10 viser Fc- γ -RI-reseptorbinding. Den ekstracellulære del av human Fc- γ -RI-reseptoren (CD64) med en C-terminal 6-his-tag addert i stedet for det putative, transmembrane domenet, ble uttrykt i HEK-293A-celler og rensset ved bruk av en Ni-kolonne. Reseptoren ble belagt over natten ved 4 °C på en ELISA-plate og platen ble
 5 deretter blokkert ved bruk av Superblock. Etter blokkering og vasking ble IgG-fortynninger preparert og satt til den reseptorbelagte plate, fulgt av inkubering ved 37 °C i 2 timer. Ikke-bundet IgG ble fjernet ved vasking og bundet antistoff detektert ved bruk av et 1:1000 av et anti-human- γ -alkalisk-fosfatasekonjugert, sekundært antistoff. Etter vasking ble bundet IgG detektert ved tilsetting av fosfatasesubstrat
 10 (fenoltaleinmonofosfat) (PPMP) (JBL Scientific) med absorbans bestemt kolorimetrisk ved 560 nm med en VMAX-mikroplateleser (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Data plottes som logg-IgG-konsentrasjon versus absorbans.

Eksempel 2

15 Screening av varianter for B-celledepleksjon i fullblodanalyse

Dette eksempel beskriver screeningsvarianter for B-celledepleksjon i en fullblodanalyse.

i. Fc γ RIIA-genotyping

Genomisk DNA ble isolert fra perifere blodprøver ved bruk av et QiaAmp-sett (Qiagen, katalog nr. 51104). Fc γ RIIA ble forsterket ved PCR ved bruk av primerne (5'
 20 GGAAATCCCAGAAATTCTCGC 3' - SEKV.ID. NR. 61) og (5' CAACAGCCTGAC TACCTATTACGCGGG 3' - SEKV.ID. NR. 62). PCR-produktene ble rensset ved bruk av et MinElute PCR-rensesett (Qiagen, katalog nr. 28006) og digestert med restriksjonsenzymet, BstUI, ved 60 °C i 12 timer. Digesterte prøver ble analysert på 3 % agarosegel. Alle PCR-produkter kuttet ved et indre BstUI-sete uavhengig av H- eller R-genotypen. Produkter som hadde R-allelen, kuttet ved et ytterligere BstUI-sete. Dette resulterte i at H/H-genotypen ble identifisert ved ett fragment på 337bp, H/R ble identifisert ved to fragmenter på 337 bp og 316 bp, og R/R identifisert ved ett fragment på 316 bp.

30

ii. Fc γ RIIIA-genotyping

Genomisk DNA ble isolert fra perifere blodprøver ved bruk av QiaAmp-settet (Qiagen, katalog nr. 51104). Fc γ RIIIA ble forsterket fra genomisk DNA ved PCR ved bruk av primerne (5' ATATTTACAGAATGGCA 3' - SEKV.ID. NR. 63) og (5' GGTGATGT
 35 TCACAGTCTCTGAAGACACATTTTACTGTCAA 3' - SEKV.ID. NR. 64). PCR-produkter ble rensset ved bruk av et MinElute PCR-rensesett (Qiagen, katalog nr. 28006)

og digestert med restriksjonsenzymet, HincII, ved 37 °C i 16 timer. Digesterte prøver ble analysert på 3 % NuSieve-agarosegeler. HincII kuttet V-allelen, men ikke F-allelen. Derfor gir F/F ett fragment på 148 bp, F/V gir tre fragmenter på 148, 109 henholdsvis 39 bp og V/V gir to fragmenter på 109 henholdsvis 39 bp.

5

iii. B-celledepleksjonsanalyse (ved bruk av fullblod)

- Heparinisert periferblod ble trukket fra friske frivillige. Blodet ble blandet med variant, Rituxan eller en ikke-spesifikk IgG (negativ kontroll) fortynnet i FACS-buffer (fosfatbufret saltoppløsning +2 % føtalt bovinserum). Rør ble inkubert i fire timer ved 37 °C
- 10 og så farget med fluorescein-anti-CD45 (for å identifisere leukocytter) (BD, katalog nr. 555482) og fycoerytrin-anti-CD19 (for å identifisere B-celler) (BD, katalog nr. 555413) i 30 min ved romtemperatur. Røde celler ble lysert ved tilsetning av BD PharmLyse, (BD, katalog nr. 555899), prøvene ble vasket og resuspendert i FACS-buffer for analyse på et Becton Dickinson FACSort-strømningscytometer. Umiddelbart før analyse ble
- 15 propidiumjodid (PI), med 0,1 µg/ml sluttkonsentrasjon, satt til prøven for å skille mellom levende og døde celler. Kontroller inkluderte celler som var inkubert med FACS-buffer alene, ufargede og enkeltfargede prøver. Hver prøve ble satt opp i triplikat og 10 000 PI-negative evenementer som faller innenfor lymfocytt-forover/side-sprednings(FSCSSC)-portene ble samlet. Data ble analysert ved bruk av WinMDI-
- 20 program. For analyse ble levende lymfocytter identifisert på basis av positiv farging med CD45, PI-negativitet og FSC/SSC-karakteristika. I hver prøve ble prosentandelen av CD19+celler med disse karakteristika, identifisert. Data ble uttrykt som midlere % CD19+celler pluss/minus 1 standardavvik. Alternativt og for å lette sammenligningen mellom donorer, ble data uttrykt som % av initial CD19+celler som var tilbake, det vil
- 25 si:

$$(\% \text{ CD19+lymfocytter som er tilbake etter behandling})/(\% \text{ CD19+lymfocytter i FACS bufferbehandlet prøve}) \times 100 \%$$

- 30 Figur 12 viser representative B-celledepleksjonsdata som viser at I332E-varianten depleterer B-celler mer potent og i større grad enn Rituxan i en fullblodprøve inneholdende VV(høy affinitet)-genotypen av FcγRIIIa-reseptoren.

- Figur 13 viser representative B-celledepleksjonsdata som viser at I332E-varianten depleterer B-celler mer potent og i større grad enn Rituxan i en fullblodprøve inneholdende FF(lav affinitets)-genotypen av FcγRIIIa-reseptoren. Tilsvarende resultater oppnås når
- 35

analysen gjennomføres med fullblod som viser den VF (heterozygøse) genotype for FcγRIIIa-reseptoren eller med HH-, HR- eller RR-genotypene av FcγRIIa-reseptoren (tabell 3).

Tabell 3

5 Prosent gjenværende B-celler ved maksimal deplesjon

Reseptor	Genotype	I332E	RITUXAN	Ike-spesifikk IgG	n
FcγRIIIa	VV	40	60	98	5
	VF	51	70	94	6
	FF	52	73	95	6
FcγRIIa	RR	53	77	96	5
	RH	49	69	95	9
	HH	38	53	95	3

Figur 14 viser representative B-celledeplesjonsdata som viser at varianten A378D uventet depleterer B-celler mer potent og i større grad enn varianter med lik eller større aktivitet i *in vitro*-ADCC- og CDC-analyser.

Eksempel 3

Affinitetsbestemmelse av variant

Dette eksempel beskriver hvordan affiniteten (Kd) for interaksjonen mellom FcγRIIIa (FF-genotypen) og villtype- eller parental Fc og variant I332E, ble bestemt.

i. FcγRIIIa/IgG-Kd-analyse

Human FcγRIIIa(158F) oppløselig, ekstracellulært domene ble uttrykt i 293 celler og rensset ved Ni-NTA-harpiksbinding til sin konstruerte 6-histidin-tag.

20

Ett rør av Azlacton-kuler (Sapidyne) ble koblet med 1 mg FcγRIII(158F) i natriumbikarbonatbuffer ved pH 9,3. Oppslemmingen ble tumlet over natten ved 4 °C, vasket to ganger med PBS og blokkert med blokkeringsbuffer (1M Tris pH 7,4 + 1 % BSA) i 1 time ved romtemperatur. Kulene ble så vasket tre ganger med PBS og resuspendert i 25 50 ml PBS med 0,01 % azid. Tolv ekvilibreringsrør som alle inneholdt 7,5 nM IgG og FcγRIII titrert fra 4 μM til 1,95 nM ble preparert i løpende buffer (PBS pH 7,4, 0,1 % BSA 0,01 % azid) og tillatt ekvilibreringsrør i 16 timer ved romtemperatur. Alle forsøk ble kjørt i løpende buffer ved romtemperatur med strømningshastigheter på 0,5 ml/min.

Etterpakking av Fc γ RIII-kulene i de strømmende celler i instrumentet, ble fri IgG fanget fra den første ekvibrering. Kulene ble så vasket og bundet IgG detektert ved bruk av geite-antihuman Fc (Fab')₂-FITC-konjugat (Jackson Immunochemicals). Prosessen ble så gjentatt for de gjenværende 11 ekvibreringer og K_d bestemt etter analyse med

5 Kinexa Pro-gromgrammet. Ved bruk av denne vei ble affiniteten (K_d) for interaksjonen mellom Fc γ RIIIa (FF-genotype) og villtype eller parentale, Fc, bestemt til å være 387 nM, mens affiniteten for variant I332E var 52 nM. Glykokonstruert antistoff (GnTIII) viste en K_d på 83 nM, mens en kombinatorisk variant (L256P, I332E) viste en K_d på 21 nM.

10

Eksempel 4

Karakterisering av CDC-aktivitet av varianter

Dette eksempel beskriver hvordan CDC-aktiviteten for forskjellige Fc-områdevarianter ble bestemt.

15

i. Analyse

Denne analyse ble gjennomført ved bruk av human komplement (Quidel Corp., katalog nr. A113) på Ramos(RA #1)-celler (ATCC katalog nr. CRL-1596). Ramosceller ble dyrket i Gibco RPMI1640-medium inneholdende 10 % FBS ved 37 °C og 5 % CO₂.

20 Dagen før analysene ble cellene sådd ut med 1 x 10⁶ celler i en T175-kolbe. Den følgende dag ble cellene resuspendert til 3,57 x 10⁵ celler/ml i RPMI1640 uten fenolrødt inneholdende 1 % FBS. 70 µl celler pr. brønn ble fordelt til en Costar 3917-flatbunnet plate. For titreringskurven ble variant-IgG preparert i en faktor 3-seriefortynning i RPMI1640-medium. For enkeltpunkts bibliotekscreeningsanalyse ble transientuttrykte

25 IgG-varianter i kultursupernatant normalisert til 1 µg/ml i mock-medium. 30 mikroliter variant IgG (det vil si 200 ng/ml sluttkonsentrasjon) og 50 µl humankomplement (Quidel Corp., katalog nr. A113) 1:5 fortynnet i RPMI1640 + 1 % FBS ble satt til målcellen og blandet ved forsiktig pipettering. Platene ble inkubert ved 37 °C i nærvær av 5 % CO₂ i 1,5 timer. Etter tilsetting av 15 µl/brønn av Alamar Blue (Serotec, katalog

30 nr. BUF012B) fortsatte inkuberingen over natten. Den følgende morgen ble fluorescens-signalet målt med en PerkinElmer's EnVision 2100 multimerkelappleser med eksitering ved 560 nm og emisjon ved 590 nm.

ii. Dataanalyse

35 Alle enkeltpunktsanalyser ble gjennomført i duplikat. Hver analyseplate inneholdt kontroller for spontan målcellelysering ved humankomplementet i fravær av IgG og

målcellemaksimal lysering i nærvær av 1 % Triton X-100. Tre villtypekontroller ble inkludert i hver analyseplate og gjennomsnittet av CDC-analysesignalet ble beregnet. Bakgrunnsverdien, oppnådd fra den spontane lyseringskontroll, ble trukket fra hver prøve. Data ble konvertert fra fluorescenssignaler til prosent spesifikk lysering basert på

5 spontane og maksimale lyseringskontroller. Prosentandelen spesifikk lysering ble beregnet fra den følgende ligning:

$$\text{prosentandel spesifikk lysering} = (\text{eksperimentelt fluorescenssignal} - \text{spontant signal}) / (\text{maksimalt lyseringssignal} - \text{spontant signal}) \times 100$$

10

Prosentandelen av Fc-variantaktivitet over gjennomsnittet av tre villtypekontroller ble så beregnet. Gjennomsnittet av prosentandelen aktivitet over villtype for duplikat-analyser ble så beregnet og standardavvik mellom individuelle analyseplater ble kalkulert.

15

I332E-varianten viser representative CDC-data oppnådd etter titrering av IgG-varianter. I dette forsøk ble Ramos-celler lysert ved bruk av både enkelt- og dobbelt-aminosyre-Fc-område-IgG-varianter og humankomplement. Analyseplaten ble inkubert ved 37 °C i nærvær av 5 % CO₂ i 1,5 timer, fulgt av tilsetning av 15 µl Alamar-blå og inkubering

20 over natten. Fluorescenssignalet ble målt og plottet mot IgG-konsentrasjonene. Disse data viser at sammenlignet med villtype-anti-CD20-antistoff er CDC-aktivitetene noe forsterket når det gjelder enkeltaminosyrevarianter I332D, I332E (figur 11A) og signifikant forsterket når det gjelder T256P og S440Y (figur 11B) og kombinasjonen av T256P med I332E (figur 11C). Når det gjelder variant A378D, er CDC-aktiviteten

25 redusert (figur 11C og tabell 2).

Eksempel 5

Karakterisering av binding til FcRn

Dette eksempel beskriver analyser for Fc-neonatal reseptor(FcRn)-binding til variant

30 IgG. En U-bunn 96-brønners ELISA-plate ble belagt (Costar) med 50 µl/brønn 2 µg/ml Neutravidin (Pierce Biotechnology, katalog nr. 31000) i 50 mM karbonatbuffer (pH 9,3) ved 4 °C over natten. Ikke-bundet NeutraAvidin ble fjernet og platen vasket tre ganger med PBST (PBS inneholdende 0,1 % Tween 20). 50 µl/brønn biotinmerket, oppløselig FcRn ved 2,5 µg/ml i PBS ble lagt på og inkubert ved romtemperatur i 1 time. 75 µl

35 caseinblokkerende buffer (Pierce Biotechnology, katalog nr. 37528) ble så satt til platen i 1 time. ELISA-platen ble så vasket med PBST og inkubert med 50 µl/brønn variant

IgG. For titreringskurven ble variant IgG preparert ved en faktor 3-seriefortynning i FcRn-bindingsbuffer (100 mM NaPO₄, 0,05 % Tween-20 ved forskjellige pH-verdier (fra 6,0 til 7,4)). For enkeltpunktsscreening ble transientuttrykt variant IgG i kultur-supernatant normalisert til en sluttkonsentrasjon på 50 ng/ml (200 ng/ml for pH 7,4-binding) og pH-verdien justert med FcRn-bindingsbuffer til 6,0. I de følgende trinn ble FcRn-bindingsbufferen ved tilsvarende pH-verdi benyttet for å vaske platen og for å fortynne reagenser. Bindingsreaksjonen ble gjennomført ved romtemperatur i 1 time. Etter tre vaskinger ble bundet IgG detektert ved geit(Fab')₂ anti-human-Fab-HRP-konjugat i 1 time. HRP-aktiviteten ble utviklet i Pierces HRP-substrat (Turbo TMB-ELISA, katalog nr. 34022) i 5-30 min. Reaksjonen ble stanset ved tilsetning av 50 µl 2 M H₂SO₄ og absorbansen ved 450 nm ble avlest med en VMAX-mikroplateleser (Molecular Devices).

Eksempel 6

15 Anti-CD20-I332E-Fc-variant humanterapi

In vitro-studier og murine tumormodeller (Clynes RA, et al. Nat Med. 6:443 (2000)) viser at ADCC spiller en rolle i antitumoreffektene av anti-CD20-antistoffer som RITUXAN. Humanpasienter kan behandles med anti-CD20-I332E-Fc-variantantistoffer (fig. 15 og 16) eller RITUXAN, på en måte tilsvarende det som er beskrevet av Cartron et al. i Blood 99:754 (2002), ansett som del av beskrivelsen. For eksempel kan pasienter som viser trinn II- til IV-sykdom i henhold til Ann-Arbor-klassifiseringen, og med minst ett målbart sykdomssete og lav tumorbyrde i henhold til GELF-kriteriene, kunne behandles med til sammen fire doser på omtrent 375 mg/m² av en anti-CD20-I332E-Fc-variant eller med RITUXAN, administrert ved intravenøs infusjon (dagene 1, 8, 15 og 22). Primæreffektivitetssluttpunktet er den objektive responsgrad, det vil si andelen av pasienter som oppnår fullstendig remisjon (CR), ikke-begrenset CR (Cru) eller partialrespons (PR) i henhold til kriterier som i den senere tid er foreslått av en internasjonal ekspertkomité. Kliniske responser kan evalueres på måned to (M2). Pasienter kan også evalueres for progresjon ved år 1 (M12).

30

De objektive responsgrader ved M2 og M12 for pasienter behandlet med RITUXAN eller anti-CD20-I332E kan sammenlignes slik at de forbedrede ADCC-aktiviteter som gis av I332E-variantene kan kvantiteres. Det samme eksempel kan gjentas med andre anti-CD20-varianter (for eksempel I332D, P247L A330K, A339T, A378D eller kombinasjoner som vist i tabell 1).

35

I tillegg tillater den forsterkede potens av variantene forskjellige veier for administrering, mindre hyppige injeksjoner og/eller administrering av mindre doser.

Patentkrav

1. Antistoff, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en variant av et opphavshuman-Fc-område eller en del derav, der varianten omfatter minst
5 én aminosyresubstitusjon sammenlignet med opphavs-Fc-området, der aminosyre-substitusjonen er i posisjonen 247L, 247H og 247I av human-Fc-sekvensen.
2. Antistoff ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at minst
10 én aminosyresubstitusjon i variant-Fc-området er 247L.
3. Antistoff ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at minst
15 én aminosyresubstitusjon i variant-Fc-området er 247H.
4. Antistoff ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at minst
15 én aminosyresubstitusjon i variant-Fc-området er 247I.
5. Antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1-3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter varianten av et opphavs-Fc-område som medierer antistoffavhengig, cellemediert cytotoksisitet
20 (ADCC) i nærvær av effektorceller mer effektivt enn antistoffet omfattende opphavs-Fc-området.
6. Antistoff ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at antistoffet omfattende variant-Fc-området, viser relative, ADCC-spesifikke
25 aktivitetsverdier større enn 100 når antistoffet som omfatter opphavs-Fc-området, viser relativ ADCC-spesifikk aktivitet på 100 målt med samme analyse.
7. Antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1-6,
k a r a k t e r i s e r t v e d at antistoffet omfattende varianten av
30 et opphavs-Fc-område, medierer komplementavhengig (CDC) mer effektivt enn antistoffet omfattende opphavs-Fc-området.
8. Antistoff ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at
35 antistoffet omfattende varianten av et opphavs-Fc-område, viser relative, CDC-

spesifikke aktivitetsverdier mindre enn 100 når antistoffet omfattende opphavs-Fc-området, viser relative, CDC-spesifikke aktiviteter på 100 målt med samme analyse.

9. Antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1-8,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at opphavs-Fc-området er en klasse valgt fra gruppen bestående av IgG, IgM, IgA, IgD og IgE.
10. Antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1-9,
k a r a k t e r i s e r t v e d at opphavs-Fc-området er en
10 underklasse valgt fra gruppen bestående av IgG1, IgG2, IgG3 og IgG4.
11. Antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1-10,
k a r a k t e r i s e r t v e d at antistoffet er et monoklonalt
antistoff.
15
12. Monoklonalt antistoff ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t
v e d at det omfatter to identiske tungkjedepolypeptider og to identiske
lettkjedepolypeptider.
- 20 13. Antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1-12,
k a r a k t e r i s e r t v e d at antistoffet spesifikt binder human
CD20.
14. Farmasøytisk preparat, k a r a k t e r i s e r t v e d at det
25 omfatter et antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1-13.