



(12) PATENT

(19) NO

(11) 338685

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

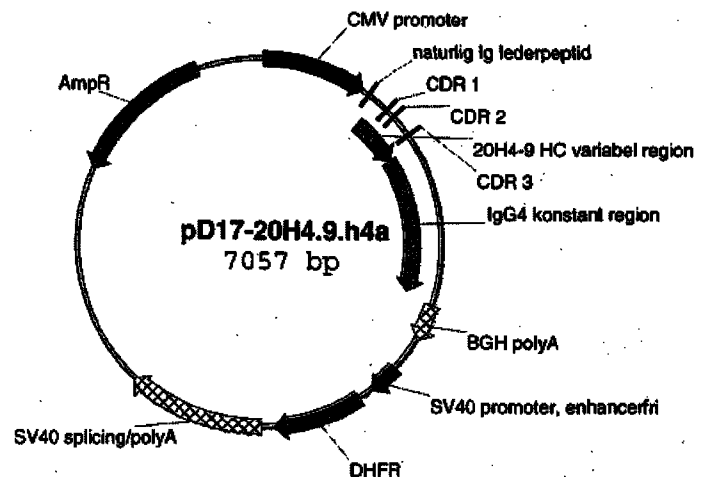
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20061394	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2004.10.12 PCT/US2004/33587
(22)	Inng.dag	2006.03.27	(85)	Videreføringssdag	2006.03.27
(24)	Løpedag	2004.10.12	(30)	Prioritet	2003.10.10, US, 60/510,193 2004.10.08, US, 10/961,567
(41)	Alm.tilgj	2006.05.09			
(45)	Meddelt	2016.09.26			
(73)	Innehaver	Bristol-Myers Squibb Co, P O Box 4000, US-NJ08543-4000 PRINCETON, USA			
(72)	Oppfinner	Subinay Ganguly, 7 Thornbury Lane, US-PA18940 NEWTOWN, USA Maria Jure-Kunkel, 31 Silvers Lane, US-NJ08536 PLAINSBORO, USA Laura J Hefta, 18 Park Avenue, US-NJ08534 PENNINGTON, USA Marc Santoro, 149 North Main Street, US-PA19067 YARDLEY, USA Edward L Hank, 1004 Edmonds Court, US-CA94087 SUNNYVALE, USA			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Fullstendig humane antistoffer mot human 4-1BB (CD137), farmasøytisk preparatomfattende samme samt anvendelse for behandling av sykdom
(56)	Anførte publikasjoner	WO 9816249 A LOO D. ET AL. Analysis of 4-1BBL and laminin binding to murine 4-1BB, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, and comparison with human 4-1BB. The journal of biological chemistry. 1997, vol. 272, no. 10, side 6448-6456.
(57)	Sammendrag	

Fullstendig humane antistoffer og antigenbindende deler derav som binder til human 4-1BB og som tillater binding av human 4-1BB til en human 4-1BB-ligand. I ett aspekt er antistoffet et IgG4-antistoff. Det tilveiebringes også en fremgangsmåte for behandling av en sykdom hos et subjekt omfattende å administrere en terapeutisk effektiv mengde av antistoffet til nevnte subjekt.



Oppfinnelsen område

Foreliggende oppfinnelse angår fullstendig humane antistoffer og, nærmere
5 bestemt, fullstendig humane antistoffer mot human 4-1BB (CD137).

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

Et omfattende bevismateriale har utvetydig vist at det eksisterer en viss grad av
immunrespons mot kreft hos mennesker og dyr. Hos kreftpasienter kan cellulære
10 komponenter av immunsystemet gjenkjenne antigener uttrykt ved tumorceller, slik som
differensiering av onkoføtale antigener eller muterte genprodukter (S. Rosenberg, Nature,
411:380-4 (2001); P. van der Bruggen et al., Immunological Rev., 188:51-64 (2002)).
Flere kliniske undersøkelser har vist at tumorinfiltrerende lymfocytter har fordelaktig
prognostisk betydning (E. Halapi, Med. Oncol., 15(4):203-11 (1998); Y. Naito et al.,
15 Cancer Res., 58(16):3491-4 (1998); L. Zhang et al., N.E. J. Med., 348(3):203-13 (2003)).
Videre har behandling med immunmodulatorer, slik som cytokiner eller bakterielle
produkter, kreftvaksiner eller adoptiv immunterapi ført til tumorregresjon hos flere
pasienter (S. Rosenberg, Cancer J. Sci. Am. 6(S):2 (2000); P. Bassi, Surg. Oncol., 11(1-
2):77-83 (2002); S. Antonia et al., Current Opinion in Immunol., 16:130-6 (2004)). Til
20 tross for disse responsene mislykkes immunitet mot kreft ofte i å effektivt fjerne
tumorceller. Årsakene til denne svikten kan grupperes inn i tre hovedkategorier: (i) svekket
tumorgjenkjennelse ved immunceller, enten ved variabel ekspresjon av tumorantigener
eller redusert ekspresjon av klasse I major histocompatibility komplekset (MHC); (ii)
immunosuppressivt tumor mikromiljø, som et resultat av sekresjon av hemmende
25 cytokiner ved tumorceller (f.eks. TGF- β); og (iii) dårlig tumorimmunogenisitet på grunn
av mangel på ekspresjon av kostimulerende molekyler ved tumorceller, hvilket fører til
manglende evne for tumorcellene til å effektivt stimulere T-celler. Forbedring av vår
forståelse av kravene for gjenkjennelse av tumorantigen og immun effektorfunksjon
indikerer at en potensiell strategi for å forbedre en anti-tumor immunrespons er å gi
30 kostimulering gjennom et hjelpemolekyl. Tumorantigen spesifikke T-celler krever
kostimulering for å initiere og opprettholde effektorfunksjoner. Følgelig kan behandlinger
som målretter kostimulerende molekyler anvendes for å modulere og forsterke
immunresponsen til tumorer.

Den rådende modellen for T-celleaktivering postulerer at naive T-celler krever to signaler for full aktivering: (i) et signal gitt gjennom binding av prosesserte antigener presentert for T-cellereseptoren av major histocompatibility kompleks (MHC) klasse I-molekyler; og (ii) et ytterligere signal gitt ved interaksjon av kostimulerende molekyler på overflaten av T-celler og deres ligander på antigenpresenterende celler. Gjenkjennelse av et antigen ved en naiv T-celle er ikke tilstrekkelig i seg selv til å utløse T-celleaktivering. Uten et kostimulerende signal, kan T-celler elimineres ved død eller ved induksjon av anergi. Signalering gjennom det kostimulerende molekylet CD28 synes å være nøkkelen for initieringen av T-celleresponser. Imidlertid er CD137 (4-1BB)-signalering vist å være primordial for opprettholdelse og ekspansjon av immunresponsen til antigener, så vel som, for dannelse av memory T-celler.

CD137 (4-1BB) er et medlem av tumornekrose reseptor (TNF-R)-genfamilien, som omfatter proteiner involvert i regulering av celleproliferasjon, differensiering og programmert celledød. CD137 er et 30 kDa type I membran glykoprotein uttrykt som en 55 kDa homodimer. Reseptoren ble initielt beskrevet hos mus (B. Kwon et al., P.N.A.S. USA, 86:1963-7 (1989)) og senere identifisert hos mennesker (M. Alderson et al., Eur. J. Immunol., 24: 2219-27 (1994); Z. Zhou et al., Immunol. Lett., 45:67 (1995)) (Se også publiserte PCT-søknader WO95/07984 og WO96/29348 og U.S. Patent nr. 6,569,997, (se SEKV ID NR:2.)). De humane og murine formene av CD137 er 60% identiske på aminosyrenivå. Konserverte sekvenser forekommer i det cytoplasmatiske domenet, så vel som i 5 andre regioner av molekylet, hvilket indikerer at disse restene kan være viktige for funksjon av CD137-molekylet (Z. Zhou et al., Immunol. Lett., 45:67 (1995)). Ekspresjon av CD137 er vist å være overveiende i celler av lymfoid linje slik som aktiverte T-celler, aktiverte Natural Killer (NK) celler, NKT-celler, CD4CD25 regulatoriske T-celler og også i aktiverte tymocytter og intraepiteliale lymfocytter. I tillegg har CD137 også blitt vist å uttrykkes i celler av myeloid opprinnelse slik som dendrittiske celler, monocytter, nøytrofiler og eosinofiler. Selv om ekspresjon av CD137 hovedsakelig er begrenset til immun/inflammatoriske celler, finnes det rapporter som beskriver dets ekspresjon i endotelceller forbundet med et lite antall vev fra inflammatoriske seter og tumorer.

Funksjonelle aktiviteter av CD137 på T-celler er utførlig karakterisert. Signalering gjennom CD137 i nærvær av suboptimale doser av anti-CD3 har blitt vist å indusere T-celleproliferasjon og cytokinsyntese (hovedsakelig IFN- γ) og å hemme aktivert celledød. Disse effektene har blitt observert med både murine og humane T-celler (W. Shuford et al., J. Exp. Med., 186(1):47-55 (1997); D. Vinay et al., Semin. Immunol., 10(6):481-9 (1998);

D. Laderach et al., *Int. Immunol.*, 14(10):1155-67 (2002)). Hos både mennesker og mus, øker kostimulering effektorfunksjoner, slik som produksjon av IFN- γ og cytotoxicitet, ved å forøke antallet av antigenspesifikke og effektor CD8⁺ T-celler. I fravær av anti-CD3-signalering, endrer ikke stimulering gjennom CD137 T-celle funksjon, hvilket indikerer at

5 CD137 er et kostimulerende molekyl.

De fysiologiske hendelsene observert etter CD137-stimulering på T-celler medieres av NF- κ B og PI3K/ERK1/2-signaler med atskilte fysiologisk funksjoner. NF- κ B-signaler utløser ekspresjon av Bcl-XL, et antiapoptisk molekyl, og resulterer følgelig i øket overlevelse, mens PI3K og ERK1/2-signaler er spesifikt ansvarlige for CD137-mediert

10 cellecyklusprogresjon (H. Lee et al., *J. Immunol.*, 169(9):4882-8 (2002)). Effekten av CD137-aktivering på hemming av aktiveringsindusert celledød ble vist *in vitro* av Hurtado et al. (J. Hurtado et al., *J. Immunol.*, 158(6):2600-9 (1997)) og i et *in vivo*-system hvor anti-CD137 monoklonale antistoffer (mabs) ble vist å frembringe langvarig overlevelse av superantigen-aktiverede CD8⁺ T-celler ved å forhindre klonal delesjon (C. Takahashi et al.,

15 *J. Immunol.*, 162:5037 (1999)). Senere viste to rapporter, under ulike forsøksbetingelser, at CD137-signalet regulerte både klonal ekspansjon og overlevelse av CD8⁺ T-celler (D. Cooper et al., *Eur. J. Immunol.*, 32(2):521-9 (2002); M. Maus et al., *Nat. Biotechnol.*, 20:143 (2002)). Redusert apoptose observert etter kostimulering samsvarer med økede nivåer av Bcl-XL i CD8⁺ T-celler, mens Bcl-2-ekspresjon forble uendret. Oppregulering av

20 de anti-apoptotiske genene Bcl-XL og bfl-1 via 4-1BB ble vist å være mediert av NF- κ B-aktivering, siden PDTC, en NF- κ B-spesifikk blokker, hemmet 4-1BB-mediert oppregulering av Bcl-XL (H. Lee et al., *J. Immunol.*, 169(9):4882-8 (2002)). På den annen side synes klonal ekspansjon av aktiverte T-celler å være mediert av øket ekspresjon av cyklinene D2, D3 og E og nedregulering av p27^{kip1}-proteinet. Denne effekten forekommer

25 både på en IL-2-avhengig og uavhengig måte (H. Lee et al., *J. Immunol.*, 169(9):4882-8 (2002)).

Alt i alt fører CD137-stimulering til forbedret ekspansjon, overlevelse og effektorfunksjoner av nylig "primet" CD8⁺ T-celler, som virker, delvis, direkte på disse cellene. Både CD4⁺ og CD8⁺ T-celler er vist å respondere til CD137-stimulering,

30 imidlertid synes det som om forbedring av T-celle funksjon er større i CD8⁺ celler (W. Shuford et al., *J. Exp. Med.*, 186(1):47-55 (1997); I. Gramaglia et al., *Eur. J. Immunol.*, 30(2):392-402 (2000); C. Takahashi et al., *J. Immunol.*, 162:5037 (1999)). Basert på den kritiske rollen av CD137-stimulering i CD8⁺ T-cellefunksjon og overlevelse, gir

manipulering av CD137/CD137L-systemet en rimelig tilnæringsmåte for behandling av tumorer og virale patogener.

Nylig ble konstitutiv ekspresjon av CD137 på nyisolerte dendrittske celler (DC'er) vist hos mus (R. Wilcox et al., *J. Immunol.*, 169(8):4230-6 (2002); T. Futagawa et al., *Int. Immunol.*, 14(3):275-86 (2002)) og mennesker (S. Pauly et al., *J. Leukoc. Biol.* 72(1):35-42 (2002)). Disse rapportene viste at stimulering av CD137 på dendrittske celler førte til sekresjon av IL-6 og IL-12 og, viktigere, det forbedret de dendrittske cellenes evne til å stimulere T-celleresponser til alloantigener. Videre viste Pan et al. at CD137-signalering i dendrittske celler resulterte i oppregulering av MHC Klasse I og kostimulerende molekyler og produserte en øket evne for dendrittske celler til å infiltrere tumorer (P. Pan et al., *J. Immunol.*, 172(8):4779-89 (2004)). Derfor synes CD137 kostimulering av dendrittske celler å være en ny overføringsbane ("pathway") for proliferasjon, modning og migrering av dendrittske celler.

Aktivert Natural Killer (NK) celler uttrykker CD137 etter stimulering med cytokiner (I. Melero et al., *Cell Immunol.*, 190(2):167-72 (1998); R. Wilcox et al., *J. Immunol.*, 169(8):4230-6 (2002)). Mange rapporter viste at NK-celler synes å være kritisk for moduleringen av antitumor immunresponsen induert av agonistiske CD137-antistoffer ((I. Melero et al., *Cell Immunol.*, 190(2):167-72 (1998); R. Miller et al., *J. Immunol.*, 169(4):1792-800 (2002); R. Wilcox et al., *J. Immunol.*, 169(8):4230-6 (2002)). Deplesjon av NK-celler reduserer antitumoraktiviteten til anti-CD137 mabs i betydelig grad. Ligering av CD137 til NK-celler induserer proliferasjon og sekresjon av IFN- γ , men påvirker ikke deres cytolytiske aktivitet. Særlig, *in vitro*, fremviste CD137-stimulerte NK-celler en immunregulerende eller "hjelper"-aktivitet for CD8+ cytolytiske T-celler hvilket resulterer i ekspansjon av aktiverte T-celler. Derfor kan CD137-signalering på NK-celler modulere innate immunitet til tumorer.

En paradoksal effekt har blitt beskrevet for CD137-stimulering i at agonistiske CD137-antistoffer kan indusere suppresjon av de humorale responsene til T-celleantigener i primat og musemodeller (H. Hong et al., *J. Immunother.*, 23(6):613-21 (2000); R. Mittler et al., *J. Exp. Med.*, 190(10):1535-40 (1999)). Særlig ble CD137 agonistiske antistoffer vist å frembringe betydelig forbedring av symptomene forbundet med antistoffavhengige autoimmune sykdommer slik som lupus erythematosus disseminatus og eksperimentell autoimmun encefalomyelitt (J. Foell et al., *N.Y. Acad. Sci.*, 987:230-5 (2003); Y. Sun et al., *Nat. Med.*, 8(12):1405-13 (2002)). Nylig viste Seo et al. at, i en musemodell av revmatoid artritt, forhindret behandling med et agonistisk anti-CD137 antistoff utviklingen

av sykdommen og bemerkelsesverdig, blokkerte sykdomsprogresjon (S. K. Seo et al., *Nat. Med.* 10:1099-94 (2004)). Mekanismen ansvarlig for denne effekten er ikke veldefinert, men i modellen av revmatoid artritt ble det vist at behandling med et CD137 agonistisk antistoff resulterte i ekspansjon av IFN- γ -produserende CD11C-CD8+ T-celler. IFN- γ stimulerte i sin tur dendritiske celler til å produsere indolamin-2,3-dioksygenase (IDO), som utøver immunosuppressive aktiviteter. Det har også vært postulert at CD137-signalering av antigenaktiverte CD4 + T-celler fører til induksjon av IFN- γ -sekresjon hvilket aktiverer makrofager. Aktiverte makrofager kan på sin side produsere dødssignaler for B-celler. Kontinuerlig signalering gjennom CD137 på CD4+ T-celler kan deretter inducere aktiveringsindusert celledød (AICD) for disse CD4+-aktiverte T-cellene. Derfor, ved å fjerne antigenaktiverte T-celler og B-celler, observeres en redusert antistoffrespons og, følgelig observeres en dramatisk reduksjon av Th2-medierte inflammatoriske sykdommer (B. Kwon et al., *J. Immunol.*, 168(11):5483-90 (2002)). Disse undersøkelsene angir en funksjon for anvendelse av agonistiske CD137-antistoffer for behandling av inflammatoriske eller autoimmune sykdommer, uten å inducere en generell suppresjon av immunsystemet.

Den naturlige liganden for CD137, CD137-ligand (CD137L), et 34kDa glykoproteinmedlem av TNF-superfamilien, detekteres hovedsakelig på aktiverte antigenpresenterende celler (APC), slik som B-celler, makrofager, dendritiske celler og også på murine B-cellelymfomer, aktiverte T-celler og humane karsinomlinjer av epitelial opprinnelse (R. Goodwin et al., *Eur. J. Immunol.*, 23(10):2631-41 (1993); Z. Zhou et al., *Immunol. Lett.*, 45:67 (1995); H. Salih et al., *J. Immunol.*, 165(5):2903-10 (2000)). Human CD137L har 36% homologi med dens murine motstykke (M. Alderson et al., *Eur. J. Immunol.*, 24: 2219-27 (1994)).

I tillegg til å overlevere signaler til CD137-uttrykkende celler, initierer binding av CD137 til CD137L et bidireksjonalt signal som resulterer i funksjonelle effekter på CD137L-uttrykkende celler. Langstein et al. viste at binding av CD137-Ig fusjonsprotein til CD137L på aktiverte monocytter induerte produksjon av IL-6, IL-8 og TNF- α , oppregulerte ICAM og inhiberte IL-10, hvilket fører til øket adherens (J. Langstein et al., *J. Immunol.*, 160(5):2488-94 (1998)). I tillegg ble proliferasjon av monocytter vist sammen med en høyere rate av apoptose (J. Langstein et al., *J. Leukoc. Biol.*, 65(6):829-33 (1999)). Disse observasjonene ble bekreftet ved studiene ifølge Ju et al. (S. Ju et al., *Hybrid Hybridomics*, 22(5):333-8 (2003)), som viste at et funksjonelt anti-CD137L antistoff induerte en høy rate av proliferasjon av perifere blodmonocytter. Blokkering av liganden

resulterte i hemming av T-celleaktivering. I tillegg ble oppløselig CD137L funnet i serum hos pasienter med revmatoid artritt og hematologiske maligniteter (H. Salih et al., *J. Immunol.*, 167(7):4059-66 (2001)). Følgelig, interaksjonen av CD137 med CD137L påvirker og gir funksjonelle effekter for T-celler og APC.

5 I et annen viktig aspekt av T-cellefunksjon, har det blitt vist at agonistiske anti-CD137-antistoffer reddet T-celleresponser til proteinantigener hos eldre mus. Det har blitt godt dokumentert at det forekommer en aldersrelatert tilbakegang i immunresponsen til antigener, en prosess kjent som immunosenescens (R. Miller, *Science*, 273:70-4 (1996); R. Miller, *Vaccine*, 18:1654-60 (2000); F. Hakim et al., *Curr. Opinion Immunol.*, 16:151-156
10 (2004)). Dette fenomenet synes å skyldes endringer i likevekt mellom graden av cellulær ekspansjon og cellulær overlevelse eller død. Bansal-Pakala et al. testet hypotesen om at sekundær kostimulering gjennom CD137 kan anvendes for å forbedre T-celleresponser i tilfeller hvor T-celler ikke mottar tilstrekkelig stimulering, på grunn av enten redusert ekspresjon av CD3 eller CD28 eller redusert kvalitet av signaler. Deres studier viste at
15 eldre mus hadde en manglende *in vitro* "recall respons" sammenlignet med unge mus (P. Bansal-Pakala et al., *J. Immunol.*, 169(9):5005-9 (2002)). Når eldre mus ble behandlet med anti-CD137 mabs, var imidlertid de proliferative og cytokinresponsene av T-celler identisk med responsene observert hos unge mus. Selv om den spesifikke mekanismen ansvarlig for denne effekten ikke ble klarlagt, ble det spekulert på at forøkning av både ekspresjon av
20 antiapoptotiske molekyler som Bcl-XL og fremming av IL-2-sekresjon *in vivo* kan spille en rolle med hensyn til å redde ("rescue") defekte T-celleresponser. Disse undersøkelsene viste potensialet for agonistiske anti-CD137-antistoffer til å redde svake T-celleresponser hos eldre immunkompromitterte individer og har inngående implikasjoner for anvendelse av anti-CD137 antistoffer for kreftpasienter. En rolle for CD137-måltrettet behandling ved
25 behandling av kreft ble antydnet ved *in vivo* effektivitetsundersøkelser i mus som anvendte agonistiske anti-murine CD137 monoklonale antistoffer. I en avhandling ved Melero et al., frembrakte agonistisk anti-mus CD137-antistoff helbredelser av P815 mastocytom tumorer og i den lave immunogene tumormodellen Ag104 (I. Melero et al., *Nat. Med.*, 3(6):682-5 (1997)). Anti-tumoreffekten krevde både CD4+ og CD8+ T-celler og NK-celler, siden
30 selektiv *in vivo* deplesjon av hver subpopulasjon resulterte i reduksjon eller fullstendig tap av anti-tumoreffekten. Det ble også vist at en minimal induksjon av en immunrespons var nødvendig for at anti-CD137-behandling skulle være effektiv. Mange forskere har anvendt anti-CD137 antistoffer for å demonstrere levedyktigheten av denne metoden for kreftterapi (J. Kim et al., *Cancer Res.*, 61(5):2031-7 (2001); O. Martinet et al., *Gene Ther.*, 9(12):786-

92 (2002); R. Miller et al., *J. Immunol.*, 169(4):1792-800 (2002); R. Wilcox et al., *Cancer Res.*, 62(15):4413-8 (2002)).

Til støtte for anti-tumor effektivitetsdataene med agonistiske CD137-antistoffer, har signaler gitt av CD137L vist å fremkalle CTL-aktivitet og anti-tumorresponser (M. DeBenedette et al., *J. Immunol.*, 163(9):4833-41 (1999); B. Guinn et al., *J. Immunol.*, 162(8):5003-10 (1999)). Mange rapporter viste at genoverføring av CD137-ligand inn i murine karsinomer resulterte i tumor avvising, hvilket beviser kravet om kostimulering ved frembringelse av en effektiv immunrespons (S. Mogi et al., *Immunology*, 101(4):541-7 (2000); I. Melero et al., *Cell Immunol.*, 190(2):167-72 (1998); B. Guinn et al., *J. Immunol.*, 162(8):5003-10 (1999)). Salih et al. har angitt ekspresjon av CD137L i humane karsinomer og human karsinomcellelinjer (H. Salih et al., *J. Immunol.*, 165(5):2903-10 (2000)) og viste at tumorcellene som uttrykker liganden var i stand til å levere et kostimulerende signal til T-celler hvilket førte til frigjøring av IFN- γ og IL-2 og at denne effekten samsvarte med nivåene av CD137L ved tumorer. Hvorvidt ekspresjon av CD137L i humane tumorer kunne gjøre disse tumorene mer mottagelige for agonistiske CD137-antistoffer er ikke kjent.

CD137L $-/-$ mus har understreket betydningen av CD137/CD137L-systemet i T-celleresponser til både virus og tumorer (M. DeBenedette et al., *J. Immunol.*, 163(9):4833-41 (1999); J. Tan et al., *J. Immunol.*, 164(5):2320-5 (2000); B. Kwon et al., *J. Immunol.*, 168(11):5483-90 (2002)). Undersøkelser ved anvendelse av CD137- og CD137L-defisitte mus har vist betydningen av CD137 kostimulering i graft-versus-host sykdom og anti-virale cytolytiske T-celleresponser. CD137-defisitte mus hadde en forbedret proliferasjon av T-celler, men en reduksjon i cytokinproduksjon og cytotoxisk T-celle aktivitet (B. Kwon et al., *J. Immunol.*, 168(11):5483-90 (2002); D. Vinay et al., *Immunol. Cell Biol.*, 81(3):176-84 (2003)). Senere ble det vist at knockout-mus (CD137 $-/-$) hadde en høyere hyppighet av tumormetastaser (4 ganger) sammenlignet med kontrollmus. Disse dataene indikerer at gjenopprettelse av CD137-signalering ved anvendelse av agonistiske anti-CD137-antistoffer er en anvendbar metode for å øke cellulære immunresponser til virale patogener og kreft.

I tillegg til dataene i mus *in vivo*-modeller som støtter involvering av CD137-signalering i antitumor immunresponser, har undersøkelser utført i primær human tumorprøver bekreftet rollen til CD137 med hensyn til frembringelse av effektor T-celler. Hos pasienter med Ewing sarkom, viste Zhang et al. at intratumorale effektor T-celler fremviste CD3 $+$ /CD8 $+$ /CD28 $-$ /CD137 $+$ -fenotypen. Uventet ble sameksistens av progressiv

tumorvekst og anti-tumor-immunitet (effektor T-celler) observert. *Ex vivo* stimuleringsstudier med pasienters celler viste at tumorindusert T-celleproliferasjon og aktivering krevde kostimulering med CD137L. Stimulering av PBL med anti-CD3/CD137L, men ikke anti-CD3/anti-CD28, induserte tumor lytiske effektorer. Disse undersøkelser ga ytterligere bevis for at CD137-mediert kostimulering kunne resultere i ekspansjon av tumorreaktive CTL'er (H. Zhang et al., *Cancer Biol. Ther.*, 2(5):579-86 (2003)). Videre ble ekspresjon av CD137 vist i i tumorinfiltrerende lymfocytter i hepatocellulære karsinomer (HCC) (Y. Wan et al., *World J. Gastroenterol*, 10(2):195-9 (2004)). CD137-ekspresjon ble detektert i 19 av 19 HCC ved RT-PCR og i 13/19 ved immunfluorescensfarging. Omvendt ble ikke CD137 detektert i de perifere mononukleære cellene fra de samme pasientene. Analyser utført i levervev fra frisk donor mislyktes i å demonstrere ekspresjon av CD137. Disse undersøkelser forsøkte ikke å korrelere klinisk sykdom med CD137-ekspresjon. Undersøkelser utført i Ewing sarkom og hepatocellulært karsinom avslørte følgelig tilstedeværelse av TIL som uttrykker CD137, med ledsagende sykdomsprogresjon. I Ewing sarkom ble det vist at CD137+TIL var i stand til drepe tumorceller *ex vivo* hvilket indikerer at CD137-overføringsbanen var intakt hos disse pasientene og at kanskje suppressive faktorer i mikromiljøet i tumor hemmet deres funksjon. Følgelig kan det postuleres at systemisk administrering av agonistiske CD137-antistoffer kan gi signalet nødvendig for ekspansjon av disse effektor T-cellene.

I tillegg til dens funksjon ved utviklingen av immunitet til kreft, støtter eksperimentelle data anvendelse av CD137 agonistiske antistoffer for behandling av autoimmune og virale sykdommer (B. Kwon et al., *Exp. Mol. Med.*, 35(1):8-16 (2003); H. Salih et al., *J. Immunol.*, 167(7):4059-66 (2001); E. Kwon et al., *P.N.A.S. USA*, 96:15074-79 (1999); J. Foell et al., *N.Y. Acad. Sci.*, 987:230-5 (2003); Y. Sun et al., *Nat. Med.*, 8(12):1405-13 (2002) S. K. Seo et al, *Nat. Med.* 10;1099-94 (2004)).

W09816249 beskriver en fremgangsmåte for å forsterke lymfocytisk dreping av tumorceller i en vert som innbefatter administrering til verten av en effektiv dose av en anti-4-1 BB- (CD137) Ab. For human administrering er Ab fortrinnsvis og i hovedsak en human Ab (E.F. p 5, I 30? 35). Murint mAb 1D8, generert ved immunisering med murin 4-1 BB, er rapportert å være unikt ved at det binder til det membran proksimale området av det ekstracellulære doment av 4-1 BB som ikke er involvert i 4-1 BBL binding (E.F. p 14, jeg 28? 31).

W02004010947 tilveiebringer et humanisert anti-human 4-1 BB antistoff, Le. Hu39E3.G4,

som ikke hemmer bindingen av humant 4-1 BB til en human 4-1 BB ligand. Også tilveiebrakt er en metode for behandling av kreft i et individ omfattende administrering av en terapeutisk effektiv mengde av antistoffet til nevnte individ.

- 5 LOO D T et al. (The Journal of Biological Chemistry, 7 mars 1997, 272 (10): 6448-6456) rapporterer at binding av 4-1 BBL til 4-1 BB.LN kompleks ikke fortrenger laminin (LN). Dvs. de to ligander bindes til proksimale, men distinkte områder på 4-1 BB. 6/8 anti-4-1 BB monoklonale antistoffer blokkere interaksjonen mellom 4-1 BB og 4-1 BBL, mens 7 blokkerer LN binding. Antistoff 1D8 er vist å blokkere LN men ikke murin 4-1 BB binding og gjenkjenner 4-1 BBL-bindingsmangel trunkert 4-1 BB protein som mangler det N-terminale LN-homologe domenet (sammendraget; s 6452).

- Følgelig, basert på funksjonene for 4-1BB i å modulere immunrespons, ville det være ønskelig å produsere anti-human 4-1BB-antistoffer med agonistiske aktiviteter som kunne anvendes for behandling eller forebygging av humane sykdommer slik som kreft, 15 infeksjose sykdommer og autoimmune sykdommer.

KORT OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN:

Omfanget av foreliggende oppfinnelse er definert gjennom kravene.

- Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer fullstendig humane antistoffer som binder 20 til human 4-1BB (H4-1BB) og som tillater binding av H4-1BB til en human 4-1BB-ligand (H4-1BBL). Oppfinnelsen angår følgelig antistoffer som binder til H4-1BB og som ikke blokkerer bindingen av H4-1BB til H4-1BBL, hvilket derved tillater binding av både et antistoff ifølge oppfinnelsen og H4-1BBL til H4-1BB. Oppfinnelsen tilveiebringer også antistoffer med agonistiske aktiviteter ved at binding av antistoffene til H4-1BB resulterer i 25 en forsterking og stimulering av H4-1BB-medierte immunresponser. Disse antistoffene kan anvendes som immun-enhancere av en anti-tumor eller anti-viral immunrespons eller som immunmodulatorer av T-cellemedierte autoimmune sykdommer. Antistoffene kan også anvendes som diagnostisk verktøy for deteksjon av H4-1BB i blod eller vev fra pasienter med kreft, autoimmune eller andre sykdommer.

- 30 I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et monoklonalt antistoff eller antigenbindende del derav som spesifikt binder til H4-1BB, omfattende en lett kjede variabel region og en tung kjede variabel region, hvor lett kjede variabel region omfatter en CDR1 (komplementaritetsbestemmende region 1), en CDR2 (komplementaritetsbestemmende region 2) og en CDR3 (komplementaritetsbestemmende

region 3) som vist i FIG. 4 og tung kjede variabel region omfatter en CDR1 (komplementaritetsbestemmende region 1), en CDR2 (komplementaritetsbestemmende region 2) og en CDR3 (komplementaritetsbestemmende region 3) som vist i FIG. 3 eller FIG. 7. Det monoklonale antistoffet (mab) kan for eksempel være et IgG4 antistoff eller
5 IgG1 antistoff.

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et fullstendig humant monoklonalt antistoff eller antigen-bindende del derav, hvor den lette kjeden omfatter en variabel region som vist i FIG. 4 og tung kjede omfatter en variabel region som vist i FIG. 3 eller FIG. 7.

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et fullstendig humant monoklonalt antistoff omfattende en lett kjede og en tung kjede, hvor den lette kjeden omfatter aminosyrerestene 21-236 ifølge SEKV ID NR:6 og den tunge kjeden omfatter aminosyrerestene 20-467 ifølge SEKV ID NR:3. I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et fullstendig humant monoklonalt antistoff omfattende en lett kjede og en tung kjede, hvor lett kjede omfatter aminosyrerestene 21-236 ifølge SEKV ID NR:6 og
10 tung kjede omfatter aminosyrerestene 20-470 ifølge SEKV ID NR:9.

Antistoffene ifølge oppfinnelsen har bred terapeutisk anvendelse som immunmodulatorer av sykdommer slik som kreft, autoimmune sykdommer, inflammatoriske sykdommer og infeksjose sykdommer.

Oppfinnelsen tilveiebringer videre fullstendig humant monoklonalt antistoff for
20 behandling av kreft hos et individ omfattende å administrere en terapeutisk effektiv mengde av et antistoff ifølge oppfinnelsen til subjektet. I ett aspekt omfatter denne anvendelsen videre administrering av en vaksine. Egnede vaksiner omfatter for eksempel en tumorcelle vaksine, en DNA-vaksine, en GM-CSF-modifisert tumorcelle vaksine eller en antigen-ladet dendrittisk celle vaksine. Kreften kan for eksempel være prostatakreft,
25 melanom eller epitelial kreft.

Fullstendig humant monoklonalt antistoff kan anvendes for å forbedre immunresponsen, omfattende å administrere et antistoff ifølge oppfinnelsen og en SIV gag-vaksine. Fullstendig humant monoklonalt antistoff kan anvendes for å forbedre immunresponsen, omfattende å administrere et antistoff ifølge oppfinnelsen og en PSA-
30 vaksine Fullstendig humant monoklonalt antistoff kan anvendes for å forbedre immunresponsen til en SIV gag-vaksine, omfattende å administrere et antistoff ifølge oppfinnelsen. Fullstendig humant monoklonalt antistoff kan anvendes for å forbedre immunresponsen til en PSA-vaksine, omfattende å administrere et antistoff ifølge oppfinnelsen.

Oppfinnelsen tilveiebringer også farmasøytiske blandinger omfattende et antistoff ifølge oppfinnelsen eller en antigenbindende del derav og en farmasøytisk akseptabel bærer. Den farmasøytiske blandingen kan administreres alene eller i kombinasjon med et middel, f.eks. et middel for behandling av kreft slik som et kjemoterapeutisk middel eller
5 en vaksine eller annet immunmodulerende middel.

Oppfinnelsen tilveiebringer også isolerte polynukleotider omfattende en nukleotidsekvens valgt fra: (a) nukleotider som koder for aminosyresekvensen av aminosyrerestene 20-467 ifølge SEKV ID NR:3; (b) nukleotider som koder for aminosyresekvensen i SEKV ID NR:3; (c) nukleotider som koder for aminosyresekvensen
10 av aminosyrerestene 21-236 ifølge SEKV ID NR:6; (d) nukleotider som koder for aminosyresekvensen i SEKV ID NR:6; (e) nukleotider som koder for aminosyresekvensen av aminosyrerestene 20-470 ifølge SEKV ID NR:9; (f) nukleotider som koder for aminosyresekvensen i SEKV ID NR:9; og (g) nukleotider som koder for et fragment av en aminosyresekvens av (a) til (f), slik som en variabel region, konstant region eller én eller
15 flere CDR'er. De isolerte polynukleotidene ifølge oppfinnelsen omfatter videre nukleotidsekvenser som koder for minst én CDR ifølge FIG. 3, minst én CDR ifølge FIG. 4 eller minst én CDR ifølge FIG. 7. Oppfinnelsen tilveiebringer videre isolerte polynukleotider som omfatter nukleotidsekvensen ifølge SEKV ID NR:1, SEKV ID NR:4 eller SEKV ID NR:7.

Oppfinnelsen tilveiebringer også isolerte polypeptider omfattende en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEKV ID NR:3, SEKV ID NR:6 og SEKV ID NR:9. I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen isolerte polypeptider omfattende aminosyresekvensen av aminosyrerestene 20-467 ifølge SEKV ID NR:3, isolerte polypeptider omfattende aminosyresekvensen av aminosyrerestene 21-236 ifølge
25 SEKV ID NR:6 og isolerte polypeptider omfattende aminosyresekvensen av aminosyrerestene 20-470 ifølge SEKV ID NR:9. I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen isolerte polypeptider omfattende aminosyresekvensen av minst én CDR ifølge FIG. 3, FIG. 4 eller FIG. 7 eller i det minste den variable eller konstante regionen ifølge FIG. 3, FIG. 4 eller FIG. 7.

Oppfinnelsen omfatter videre et immunglobulin som har bindingsspesifisitet for H4-1BB, hvor nevnte immunglobulin omfatter en antigenbindende region. I ett aspekt er immunglobulinet en Fab eller F(ab')₂ av et antistoff ifølge oppfinnelsen.

Oppfinnelsen omfatter også en cellelinje som produserer et antistoff eller antigenbindende del derav ifølge oppfinnelsen, rekombinante ekspresjonsvektorer som

omfatter nukleotidene ifølge oppfinnelsen og fremgangsmåter for fremstilling av antistoffene ifølge oppfinnelsen ved dyrking av en antistoffproduserende cellelinje.

KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE:

5 FIG. 1 viser et plasmidkart av pD17-20H4,9.h4a.

FIG. 2 viser et plasmidkart av pD16 gat-20H4,9.LC.

FIG. 3 (FIG. 3A-3H) viser nukleotidsekvensen av plasmidet pD17-20H4,9.h4a, omfattende den kodende tråden (SEKV ID NR:1), den komplementære tråden (SEKV ID NR:2) og aminosyresekvensen (lederpeptid er aminosyrerestene 1-19 ifølge SEKV ID NR:3; tung kjede er aminosyrerestene 20-467 ifølge SEKV ID NR:3) kodet for av den kodende tråden.

FIG. 4 (FIG. 4A-4F) viser nukleotidsekvensen av plasmidet pD16 gate-20H4,9.LC, omfattende den kodende tråden (SEKV ID NR:4), den komplementære tråden (SEKV ID NR:5) og aminosyresekvensen (lederpeptid er aminosyrerestene 1-20 ifølge SEKV ID NR:6; lett kjede er aminosyrerestene 21-236 ifølge SEKV ID NR:6) kodet for av den kodende tråden.

FIG. 5 viser en skjematisk skisse av 20H4,9-IgG1 tung kjede sekvens-konstruksjon.

FIG. 6 viser en skjematisk skisse av 20H4,9 lett kjede sekvens-konstruksjonen.

FIG. 7 (FIG. 7A-7D) viser nukleotid og aminosyresekvensene av 20H4,9-IgG1 tung kjede-konstruksjon, omfattende den kodende tråden (SEKV ID NR:7), den komplementære tråden (SEKV ID NR:8) og aminosyresekvensen (lederpeptid er aminosyrerestene 1-19 ifølge SEKV ID NR:9; tung kjede er aminosyrerestene 20-470 ifølge SEKV ID NR:9) kodet for av den kodende tråden.

FIG. 8 (FIG. 8A-8B) illustrerer resultatene oppnådd fra bindingen av mab 20H4,9-IgG1 til human CD137 ved ELISA (FIG. 8A) og effekten av mab 20H4,9-IgG1 på CD137-CD137L-interaksjon (FIG. 8B).

FIG. 9 (FIG. 9A-9B) illustrerer resultatene oppnådd fra bindingen av mab 20H4,9-IgG1 til PMA-ionomycinstimulerte humane eller cynomolgus-ape-celler. Human CEM (FIG. 9A) eller ape PBMC (FIG. 9B) ble inkubert med 20H4,9-IgG1 eller human CD137L fusjonsprotein.

FIG. 10 (FIG. 10A-10B) illustrerer resultatene oppnådd ved induksjon av IFN- γ i kostimulerende studier med anti-CD137-antistoffer, som er uttrykt som ganger økning i pg/ml over kontroller. På grunn av den variable bakgrunnsresponsen blant donorer, ble data normalisert relativt til kontrollbehandlinger (=1). Median IFN- γ baselinenivå for

humane T-celler (FIG. 10A) eller ape PBMC (FIG. 10B) stimulert med anti-CD3 alene var 592 pg/ml og 505 pg/ml henholdsvis.

FIG. 11 tilveiebringer plasmonresonans-plot av binding av mab 20H4,9-IgG4 og mab 20H4,9-IgG1 til human CD137.

5 FIG. 12 illustrerer den konsentrasjonsavhengige bindingen av 20H4,9-IgG4 til PMA ionomycin-stimulerte humane CEM-celler, men ingen binding til ustimulerte CEM-celler.

FIG. 13 (FIG. 13A-B) illustrerer induksjonen av IFN- γ i kostimulerende undersøkelser med anti-CD137-antistoffer. Resultatene er uttrykt som ganger økning i 10 pg/ml over kontroller. På grunn av den variable bakgrunnsresponsen blant donorer, ble data normalisert relativt til kontrollbehandlinger (=1). Median IFN- γ baselinenivå for humane T-celler (FIG. 13A) eller ape PBMC (FIG. 13B) stimulert med anti-CD3 alene var 592 pg/ml og 505 pg/ml henholdsvis.

FIG. 14 (FIG. 14A-14B) illustrerer resultatene oppnådd ved doseavhengig 15 forbedring av IFN- γ -syntese ved mab 20H4,9-IgG4 (FIG. 14A) og effekt av kryssbinding av antistoff ved tilsetning av kryssbindende anti-humant IgG antistoff (7 μ g/ml) (FIG. 14B).

FIG. 15 illustrerer effekten av mab 20H4,9-IgG4 på T-celle overlevelse og cellecyklusprogresjon. Humane T-celler ble kostimulert med anti-CD3 (1 μ g/ml) \pm mab 20 20H4,9-IgG4 ved konsentrasjonene listet opp. Seks dager etter initiering av forsøkene, ble celler oppsamlet og merket med Annexin-V og propidiumjodid for å bestemme antall levende celler (Annexin V/PI negativ) eller PE-konjugert cyclin D2 for å detektere cycling celler. Resultater representerer gjennomsnittet (\pm SD) av 4 lots av mab 20H4,9-IgG4 testet parallelt.

25 FIG. 16 (FIG. 16A-16D) viser i cynomolgus-aper den antigenspesifikke IFN- γ -responsen som målt ved ELISPOT etter behandling med en DNA-vaksine \pm anti-human 4-1BB-antistoffer. Dyr ble behandlet med en SIV gag-vaksine (dag 0, 28, 56; FIG. 16A), SIV gag-vaksine (dag 0, 28, 56) og mab 20H4,9-IgG4 (dag 12, 15 og 19; FIG. 16B) eller SIV gag-vaksine (dag 0, 28, 56) og hu39E3.G4 (dag 12, 15 og 19; FIG. 16C). En gruppe 30 dyr ble latt være ubehandlet (FIG. 16D). Ved forskjellige tidspunkter etter behandling, ble blod oppsamlet og PBMC ble separert og evaluert for deres evne til å utskille IFN- γ i nærvær av antigenstimulering.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN:

Omfanget av foreliggende oppfinnelse er definert gjennom kravene.

Oppfinnelsen angår fremstilling og karakterisering av antistoffer og antigenbindende fragmenter derav (omfattende fusjonsproteiner som omfatter et
5 antigenbindende fragment av et antistoff ifølge oppfinnelsen), for anvendelse ved behandling av en sykdom, slik som kreft, infeksjøs sykdom, inflammatorisk sykdom eller autoimmun sykdom. Kreften kan for eksempel være prostatakreft, melanom eller epitelial kreft.

Antistoffene er i stand til å binde til H4-1BB og kan fremvise høy affinitet for H4-
10 1BB og effektivt forsterke T-celleresponser. I ett aspekt induserer antistoffet IFN- γ -produksjon i kostimulerende analyser, men påvirker ikke bindingen av H4-1BB til dens korresponderende ligand, H4-1BBL og binder ikke komplement.

Antistoffene ifølge oppfinnelsen kan produseres ved fremgangsmåter velkjente på området. I ett aspekt kan antistoffene fremstilles ved ekspresjon i transfekterte celler, slik
15 som immortaliserte eukaryote celler, slik som myelom eller hybridomceller.

Antistoffene ifølge oppfinnelsen kan anvendes alene eller sammen med andre terapeutiske midler slik som radioterapi (omfattende stråling), hormonbehandling, cytotoksiske midler, vaksiner og andre immunmodulerende midler, slik som cytokiner og biologiske responsmodifikatorer. Disse midlene er spesielt anvendelige for behandling av
20 kreft og immunproliferative lidelser.

I ett aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse det monoklonale antistoffet (mab) 20H4,9-IgG4. FIG. 1 og 2 tilveiebringer plasmidkart av pD17-20H4,9.h4a og pD16 gate-20H4,9.LC, henholdsvis, som kan anvendes for å produsere mab 20H4,9-IgG4. FIG. 3 (FIG. 3A-3H) tilveiebringer nukleotidsekvensen av plasmidet pD17-20H4,9.h4a,
25 omfattende den kodende tråden (SEKV ID NR:1), den komplementære tråden (SEKV ID NR:2) og aminosyresekvensen (lederpeptid er aminosyrerestene 1-19 ifølge SEKV ID NR:3; tung kjede er aminosyrerestene 20-467 ifølge SEKV ID NR:3) kodet for av den kodende tråden. FIG. 4 (FIG. 4A-4F) viser nukleotidsekvensen av plasmidet pD16gate-20H4,9.LC, omfattende den kodende tråden (SEKV ID NR:4), den komplementære tråden
30 (SEKV ID NR:5) og aminosyresekvensen (lederpeptid er aminosyrerestene 1-20 ifølge SEKV ID NR:6; lett kjede er aminosyrerestene 21-236 ifølge SEKV ID NR:6) kodet for av den kodende tråden.

Oppfinnelsen tilveiebringer det monoklonale antistoffet (mab) 20H4,9-IgG1. FIG. 5 viser skjematisk en tung kjede sekvens-konstruksjon av mab 20H4,9-IgG1. FIG. 6 viser

skjematisk en lett kjede sekvens-konstruksjon av mab 20H4,9, for både mab 20H4,9-IgG4 og 20 H4,9-IgG1. FIG. 7 tilveiebringer nukleotidsekvensen (kodende tråd (SEKV ID NR:7) og den komplementære tråden (SEKV ID NR:8)) av tung kjede sekvens-konstruksjonen ifølge FIG. 5 og aminosyresekvensen (lederpeptid er aminosyrerestene 1-19 ifølge SEKV ID NR:9; tung kjede er aminosyrerestene 20-470 ifølge SEKV ID NR:9) kodet for av den kodende tråden. Den lette kjeden av mab 20H4,9-IgG1 er den samme som den lette kjeden av mab 20H4,9-IgG4.

Oppfinnelsen omfatter også antistoffer med konservative aminosyresubstitusjoner av aminosyresekvensene av tung og lett kjede vist i SEKV ID NR: 3, 6 og 9 som hovedsakelig ikke har noen effekt på H4-1BB-binding. Konservative substitusjoner omfatter typisk substitusjon av én aminosyre med en annen med lignende egenskaper, f.eks. substitusjoner innen de følgende gruppene: valin, glysin; glysin, alanin; valin, isoleucin, leucin; asparaginsyre, glutaminsyre; asparagin, glutamin; serin, treonin; lysin, arginin; og fenylalanin, tyrosin.

Polynukleotidene som koder for polypeptidene ifølge oppfinnelsen omfatter typisk ytterligere en ekspresjonskontrollsekvens operabelt bundet til de polypeptidkodende sekvensene, omfattende naturlig assosierte eller heterologe promoterregioner. Fortrinnsvis vil ekspresjonskontrollsekvensene være eukaryote promotersystemer i vektorer som er i stand til å transformere eller transfektere eukaryote vertsceller, men kontrollsekvenser for prokaryote verter kan også anvendes. Når vektoren først er innført i en passende vert, opprettholdes verten under betingelser egnet for høynivå-ekspresjon av nukleotidsekvensene og, som ønsket, kan oppsamling og rensning av lett kjede, tung kjede, dimerer av lett/tung kjede eller intakt antistoff, bindende fragmenter eller andre immunglobulinform følge. (se S. Beychok, Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, N.Y. (1979)). Enkeltkjede antistoffer eller minibodies (enkeltkjede antistoffer fusjonert til ett eller flere CH-domener) kan også fremstilles ved sammenføring av nukleinsyresekvenser som koder for VL og VH-regionene beskrevet heri med DNA som koder for en polypeptidlinker.

Prokaryote verter, slik som E. coli og andre mikrober, slik som gjær, kan anvendes for å uttrykke et antistoff ifølge oppfinnelsen. I tillegg til mikroorganismer, kan cellekultur fra mammalsk vev også anvendes for å uttrykke og produsere antistoffene ifølge oppfinnelsen. Eukaryote celler kan være foretrukket, fordi flere egnede vertscellelinjer som er i stand til å utskille intakte immunglobuliner er utviklet omfattende for eksempel CHO (kinesisk hamster ovarie)-cellelinjer, COS (fibroblastcellelinje fra African greene monkey)

cellelinjer, HeLa-celler, myelom-cellelinjer og hybridomer. Ekspresjonsvektorer for disse cellene kan omfatte ekspresjonskontrollsekvenser, slik som en promoter eller enhancer og nødvendige prosesseringsinformasjons seter, slik som ribosombindings seter, RNA splicings seter, polyadenylerings seter og transkripsjonsterminatorsekvenser, alle velkjente på området.

Vektorene inneholdende DNA-segmentene av interesse (f.eks. tung og/eller lett kjede som koder for sekvenser og ekspresjonskontrollsekvenser) kan overføres inn i vertscellen ved velkjente metoder, som varierer avhengig av type cellulær vert. For eksempel er kalsiumklorid-transfeksjon vanlig anvendt for prokaryote celler, mens kalsiumfosfatbehandling, lipofeksjon eller elektroporering kan anvendes for andre cellulære verter. (se f.eks. T. Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1982)).

Når de først er uttrykt kan antistoffene, deres dimerer, individuelle lette og tunge kjeder eller andre immunglobulinformer, renses i henhold til standardprosedyrer på området, slik som ammoniumsulfat prespitering, affinitetskolonner, kolonnekromatografi og gelelektroforese. Hovedsakelig rene immunglobuliner med minst 90 til 95% homogenitet er ønskelig og 98 til 99% eller mer homogenitet er mer ønskelig.

Antistoffene ifølge oppfinnelsen er anvendelige for å modulere T-celle og antistoffmedierte immunresponser. Typiske sykdomstilstander egnet for behandling omfatter kreft, infeksjøs sykdommer, inflammatoriske sykdommer og autoimmune sykdommer slik som multipel sklerose, revmatoid artritt, lupus erythematosus disseminatus og myaesthesia gravis.

Oppfinnelsen tilveiebringer også farmasøytiske blandinger omfattende minst ett antistoff ifølge oppfinnelsen og en farmasøytisk akseptabel bærer. De farmasøytiske blandningene kan steriliseres ved konvensjonelle velkjente steriliseringsteknikker. De farmasøytiske blandningene kan også inneholde farmasøytisk akseptable hjelpestoffer som nødvendig for tilnærmet fysiologiske betingelser slik som pH-regulerende og buffermidler, midler som øker stabiliteten slik som mannitol eller tween 80 og toksisitetsregulerende midler, for eksempel natriumacetat, natriumklorid, kaliumklorid, kalsiumklorid, natriumlaktat eller humant albumin.

Antistoffene og de farmasøytiske blandningene ifølge oppfinnelsen er spesielt anvendelige for parenteral administrering, omfattende subkutan, intramuskulær og intravenøs administrering. De farmasøytiske blandningene for parenteral administrering kan omfatte en løsning av antistoffet oppløst i en akseptabel bærer, fortrinnsvis en vandig

bærer. En rekke vandige bærere kan anvendes, alle velkjente på området, f.eks. vann, bufret vann, saltoppløsning og glysin. Disse løsningene er sterile og generelt fri for partikulært materiale. Det er spesielt fordelaktig å formulere parenterale blandinger i doseringsenhetsform for å lette administrering og ensartethet av dosene.

5 Den farmasøytiske blandingen kan videre omfatte et ytterligere middel for behandling av en sykdom. I ett aspekt omfatter den farmasøytiske sammensetningen et middel for behandling av kreft, en infeksjøs sykdom, inflammatorisk sykdom eller autoimmun sykdom. Antistoffet ifølge oppfinnelsen kan også koadministreres eller administreres adskilt med et ytterligere middel for behandling av en sykdom.

10 Antistoffene ifølge oppfinnelsen kan anvendes med andre midler for å forbedre immunresponsen til kankrøse celler hos en pasient. I ett aspekt anvendes antistoffet i kombinasjon med et immunogent middel, slik som kankrøse celler, rensede tumorantigener (omfattende rekombinante proteiner, peptider og karbohydratmolekyler) eller celler transfektert med gener som koder for immunstimulerende cytokiner og
15 celleoverflateantigener. I et annet aspekt anvendes antistoffet i kombinasjon med en vaksine slik som for eksempel en tumorcelle vaksine, en DNA-vaksine, en genmodifisert tumorcelle vaksine, slik som GM-CSF-modifisert tumorcelle vaksine, en peptidvaksine eller en antigen-ladet dendrittisk celle vaksine.

Mange eksperimentelle strategier for vaksinasjon mot tumorer er overveid. I én av
20 disse strategiene, fremstilles en vaksine ved anvendelse av autologe eller allogene tumorceller. Disse cellulære vaksinene er vist å være mest effektive når tumorcellene er transdusert til å uttrykke GM-CSF. GM-CSF har blitt vist å være en potent aktivator av antigenpresentasjon for tumorvaksinasjon (Dranoff et al., P.N.A.S., 90:3539-43 (1993); E. Jafee et al., J. Clin. Oncol., 19:145-56 (2001); R. Salgia et al., J. Clin. Oncol., 21:624-30
25 (2003)).

Studiet av genekspressjon og storskala genekspressjonsmønstre i forskjellige tumorer har ført til definisjonen av såkalt tumorspesifikke antigener (S. Rosenberg, Immunity 10:281-7 (1999)). I mange tilfeller er disse tumorspesifikke antigenene
30 differensieringsantigener uttrykt i tumorene og i cellen fra hvilken tumoren oppsto for eksempel melanocyt antigen gp 100, MAGE-antigener, Trp-2. Mange av disse antigenene kan vises å være målene for tumorspesifikke T-celler funnet i verten.

Antistoffene ifølge oppfinnelsen kan anvendes i konjunksjon med en samling av rekombinante proteiner og/eller peptider uttrykt i en tumor for å amplifisere og dirigere

immunresponsen til disse antigenene mot en Th1-respons. Disse proteinene betraktes vanligvis av immunsystemet som selvantigener og er derfor tolerante i forhold til dem.

I ett aspekt kombineres antistoffet ifølge oppfinnelsen med et immunmodulatorisk middel omfattende SIV gag-antigenet (som en modell for HIV DNA-vaksine) eller prostata spesifikt antigen (PSA) eller en DNA-vaksine omfattende en nukleotidsekvens som koder for SIV gag-antigenet eller prostata spesifikt antigen (PSA). PSA-vaksiner er beskrevet i, for eksempel M. Pavlenko et al., *Br. J. Cancer*, 91(4):688-94 (2004); J. Wolchok et al., *Semin. Oncol.*, 30(5):659-66 (2003); J. Kim et al., *Clin. Cancer Res.*, 7(3 Suppl.):882s-889s (2001). SIV gag vaksiner er beskrevet i, for eksempel B. Makitalo et al., *J. Gen. Virol.*, 85(Pt 8):2407-19 (2004); N. Letvin et al., *J. Virol.*, 78(14):7490-7 (2004); S. Mossman et al., *AIDS Res. Hum. Retrovirus.*, 20(4):425-34 (2004); F. Bertley et al., *J. Immunol.*, 172(6):3745-57 (2004); L. Patterson et al., *J. Virol.*, 78(5):2212-21 (2004); E. O'Neill et al., *AIDS Res. Hum. Retrovirus*, 19(10):883-90 (2003); Z. Bu et al., *Virology*, 309(2):272-81 (2003).

Tumorantigenet kan også omfatte, for eksempel proteinet telomerase, som er nødvendig for syntese av telomerer av kromosomer og som uttrykkes ved mer enn 85% av human kreft og i kun et begrenset antall somatiske vev (N. Kim et al., *Science*, 266, 2011-2013 (1994)). Tumorantigen kan også være "neo-antigener" uttrykt i kreftceller på grunn av somatiske mutasjoner som endrer proteinsekvensen eller danner fusjonsproteiner mellom to ubeslektede sekvenser eller idiotype fra B celle-tumorer. Andre tumorvaksiner kan omfatte proteinene fra virus implisert i human kreft slik et humant papillomavirus (HPV), hepatittvirus (HBV og HCV) og Kaposi's herpes sarkom virus (KHSV). En annen form av tumorspesifikt antigen som kan anvendes med et antistoff ifølge oppfinnelsen er rensede varmesjokkproteiner (HSP) isolert fra tumorvevet i seg selv. Disse varmesjokkproteinene inneholder fragmenter av proteiner fra tumorcellene og disse HSPs er svært effektive ved levering til antigenpresenterende celler for å frembringe tumorimmunitet (R. Suot et al., *Science* 269: 1585-1588 (1995); Y. Tamura et al., *Science* 278: 117-120 (1997)).

Antistoffene ifølge oppfinnelsen kan også anvendes for å forbedre immunresponsen til vaksiner til virale antigener, slik som HIV eller HCV. Antistoffene ifølge oppfinnelsen kan også anvendes for å forbedre immunresponsen til andre immunmodulerende midler og å indusere en hukommelse immunrespons. Eksempler på disse midlene er cytokiner slik som GM-CSF, IL-2, IL-15, IL-12, Fl3-ligand, CD40-ligand, adjuvans slik som CpG-oligodeoksynukleotid (bakterielt DNA) eller antistoffer mot OX-40 eller CTLA-4.

De farmasøytiske blandingene ifølge oppfinnelsen kan administreres for profylaktiske og/eller terapeutiske behandlinger. Ved terapeutisk anvendelse administreres den farmasøytiske blandingen til en pasient som allerede lider av en sykdom, i en mengde tilstrekkelig til å kurere eller i det minste delvis stanse eller behandle sykdommen. En

5 mengde tilstrekkelig til å oppnå dette defineres som en “terapeutisk effektiv dose.” Mengder effektive for denne anvendelsen vil avhenge av alvorlighetsgraden av sykdomstilstanden og pasienten (omfattende for eksempel den generelle tilstanden til pasientens eget immunsystem) og kan bestemmes av fagfolk på området. Ved profylaktiske anvendelser administreres den farmasøytiske blandingen til en pasient som

10 ikke allerede i sykdomstilstanden, for å forbedre pasientens resistens mot sykdomstilstanden. En slik mengde er definert som en “profylaktisk effektiv dose”. Ved denne anvendelsen avhenger de nøyaktige mengdene av pasientens helsetilstand (omfattende for eksempel den generelle tilstanden til pasientens eget immunsystem) og kan bestemmes av fagfolk på området. I ett aspekt er den profylaktiske anvendelsen

15 forebygging av tilbakekomst av tumor.

Eksempler:

Eksempel 1: Fremstilling av antistoffer

Materialer og metoder

20 Fullstendig humane monoklonale antistoffer mot den humane CD137 (4-1BB)-reseptoren ble fremstilt i HuMAb-Mouse® (Medarex, Inc., Princeton, New Jersey). HuMAb-mus ble immunisert fem ganger intraperitonealt (i.p.) og subkutant (s.c.) med 25 µg av det ekstracellulære domenet av human CD137 i RIBI-adjuvans (Ribi Immunochemical). Før fusjon, ble mus boostet intravenøst (i.v.) med samme mengde

25 antigen. Miltceller fra immuniserte mus med tilstrekkelig titere av antistoffer mot huCD137 ble fusjonert med myelomceller fra mus etter standardmetoder.

Anti-human CD3 mab (klon:HIT3a), ELISA kit for human og ape IFN-γ, cytometric bead array (CBA)-kit og alle konjugerte antistoffer for flowcytometri ble anskaffet fra BD Pharmingen (San Diego, California). Human IgG₁ λ og Human IgG₁ κ

30 ble anskaffet fra Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri). CEM-celler (ATCC-CRL 2265) ble anskaffet fra ATCC. Dyrkningsmedier (RPMI), og føtalt bovint serum (FBS) ble anskaffet fra Mediatech Inc. (Herndon, Virginia). Sheep Reed Blood Alsevers ble anskaffet fra Colorado Serum Co. (Denver, Colorado).

Screening av hybridom: Deteksjon av binding til huCD137 ved ELISA: For å identifisere hybridomer som skiller ut anti-human CD137-antistoffer, ble ELISA-plater (Nunc MaxiSorp) belagt med human CD137-mus IgG_{2b} fusjonsprotein ved 1 µg/ml i PBS over natten ved 4°C. Plater ble deretter vasket 3 ganger med PBS med 0,01% Tween-80 (PBS-T) og deretter blokkert med PBS-T samt 1% bovint serumalbumin (BSA), i 20 min ved romtemperatur. Femti mikroliter supernatanter fortynnet 1:3 i PBS-T ble tilsatt til platene og inkubert i 1-2 timer ved omgivelsestemperatur. Deretter ble plater vasket som før og binding av antistoffer ble detektert ved en inkubering med alkalisk fosfatase-konjugert geit F(ab')₂ anti-humant IgG antistoff (Jackson Laboratories, West Grove, Pennsylvania). Plater ble utviklet med pNPP og avlest ved 405 nm.

Blokkeringsanalyse: Tjueseks hybridomer som sekreterte antistoffer som gjenkjente huCD137 ved ELISA ble evaluert for deres evne til å tillate CD137-CD137L-interaksjoner. Disse analysene ble utført initielt i et ELISA-format. Plater ble belagt med human CD137-muIgG_{2b} ved 0,2 µg/ml, 100 µl/brønn. Seriefortynninger av mab 20H4,9-IgG1 eller kontrollantistoffer, fortynnet i PBS-T og 1% bovint serumalbumin, ble tilsatt til platen. Fusjonsprotein CD137L-CD8 ble tilsatt til brønnene i en konsentrasjon på 0,2 µg/ml. Binding av antistoffer ble detektert med et biotinyllert anti-CD8-antistoff (0,2 µg/ml, Ancell Corporation, Bayport, Minnesota). Etter mange vaskinger ble streptavidin-alkalisk fosfatase (1:2000) og pNPP for deteksjon av bundne antistoffer tilsatt og platene ble avlest ved 405 nm.

For å bekrefte at de selekterte antistoffene ikke endret CD137-CD137L-binding, ble rensede antistoffer ytterligere karakterisert ved BIAcore-analyser. Alle eksperimenter ble utført i et BIAcore 3000 instrument (BIAcore Inc., Piscataway, New Jersey). Human CD137 ble immobilisert kovalent ved en høy tetthet på en karboksymetyllert dekstranoverflate på en BIAcore sensorchip (BIAcore Inc., Piscataway, New Jersey). Injeksjoner ble utført ved 2 µg/ml i 10 mM acetatbuffer, pH 5,0. Ikke opptatte aktive estere ble deretter blokkert ved injeksjon av et overskudd av etanolamin. Regenerering av overflaten ble utført med 10 mM glysin, pH 2,0.

Rensede prøver av anti-CD137 antistoffer ble fortynnet til konsentrasjoner mellom 200 og 1000 nM ved anvendelse av HEPES bufret saltopløsning, pH 7,4, supplert med 0,15 M NaCl og 0,005% surfaktant P20 (HBS-EP). Humane CD137L-CD8 fusjonsproteiner (huCD137L) ble anvendt som kilde for CD137-ligand. Det ble gjennomført eksperimenter hvor huCD137L ble injisert før anti-CD137-antistoffer eller

omvendt. Injeksjoner ble utført ved en strømningshastighet på 5 µl/min. Bundet ligand og antistoffer ble fjernet ved regenerering med 10 mM glysinbuffer, pH 2,0.

Rensing av human T-celle: T-celler eller PBMC'er ble oppnådd fra friske humane donorer. Blod ble oppsamlet i EDTA, oppslemmet i slemmingsbuffer (RPMI inneholdende
5 2,5 mM EDTA, 10 µg/ml polymyxin B), støttet med Lymphocyte Separation Medium (LSM, Mediatech Inc., Herndon, Virginia) og sentrifugert ved 1800 rpm i 25 minutter. Cellulære grenseflater ble oppsamlet og sentrifugert ved 1500 rpm i 10 minutter. Deretter ble cellepellet resuspendert i slemming buffer og vaskede Sheep Red Blood Cells (SRBC, 1:10 fortykning) og inkubert på is i 1 time. Celler ble deretter støttet med LSM og
10 sentrifugert ved 2500 rpm i 25 minutter. Grenseflater ble fjernet og SRBC ble lysert med SRBC Lysisbuffer. Isolerte T-celler ble vasket og resuspendert i 10% FBS/RPMI.

Flowcytometriske analyser: Binding av anti-humane CD137 antistoffer til CD137 uttrykt på celler ble bestemt ved flowcytometri. En human T-celleleukemi-cellelinje (CEM) eller cynomolgus-ape perifert blod monocytiske celler (PBMC) ble anvendt i disse
15 undersøkelsene. Disse cellene uttrykker ikke CD137 konstitutivt, men reseptoren kan induseres ved stimulering med forbol myristat (PMA, 10 ng/ml) og ionomycin (1 µM) i 18 timer. Celler ble deretter vasket og inkubert med forskjellige konsentrasjoner av antistoffene i merkingsbuffer (fosfatbuffer saltoppløsning, PBS, samt 1 % FCS og 0,01 % natriumazid). Binding av antistoffene til stimulerte eller ikke-stimulerte celler ble detektert
20 ved et fluorescein (FITC) eller phycoerithrin (PE) konjugert geit anti-humant IgG (Jackson Immunoresearch, West Grove, Pennsylvania). For å bekrefte ekspresjon av CD137 ble det anvendt et fusjonsprotein bestående av det ekstracellulære domenet av CD137-ligand og mus CD8 (Ansell Corporation, Bayport, Minnesota), etterfulgt av inkubering med PE-konjugert anti-mus CD8 (BD Pharmingen, San Diego, California). Prøver ble fiksert i 1%
25 formalin, oppbevart ved 4 °C og avlest ved flowcytometri.

Funksjonell analyse: Primære humane T-celler eller ape PBMC oppnådd fra friske donorer ble stimulert med immobilisert anti-CD3 antistoff for å gi det første signalet for T-celleaktivering, og kostimulert med humane anti-human CD137-antistoffer. Som en uspesifikk kontroll, ble et humanisert anti-karsinom antistoff (BR96) anvendt ved samme
30 antistoffkonsentrasjon. Plater ble belagt med anti-CD3 antistoff (0,5-1 µg/ml) ved 4 °C over natten. Neste dag ble T-celler eller PBMC platet ut ved konsentrasjoner på $1-1,5 \times 10^5$ /brønn. Syntese av IFN-γ ble målt etter 72 timers dyrking ved 37 °C enten ved cytometric bead array (CBA) eller ved ELISA.

Cytokinanalyser

ELISA: Etter stimulering av T-celler ved forskjellige tidspunkter, ble plater sentrifugert og media ble fjernet. Cytokinnivåer ble detektert ved en ELISA i henhold til produsentens instruksjoner (BD Pharmingen, San Diego, California). I korthet ble test-
 5 prøver og standarder tilsatt til anti-cytokin-belagte 96-brønners plater. Etter inkubering i 2 timer ved omgivelsestemperatur, ble plater vasket 3 ganger i PBS-T og deretter inkubert først med et anvendelig detektor antistoff, etterfulgt av tilsetning av substrat. Absorbans ble avlest ved 405 nm og konsentrasjoner ble beregnet basert på standardkurven.

Cytometric Bead Array: En annen metode anvendt for å bestemme
 10 cytokinproduksjon *in vitro* var flowcytometri som anvender Cytometric Bead array (CBA) utviklet av BD Pharmingen. Nivåer av IFN- γ , IL-2, IL-5, IL-4, IL-10 og TNF- α ble målt i kultursupernatanter etter produsenters instruksjoner. Resultater ble analysert ved strømningscytometri med CBA analyse-programvaren.

Resultater

15 Hybridomer som sekreterer antistoffer som oppviste binding til human CD137 ble videre ekspandert og subklonet. Utskilte antistoffer ble rensert og testet for deres evne til å binde til huCD137 og til å muliggjøre interaksjonen av CD137-CD137L. Fra panelet av anti-humane CD137 antistoffer evaluert, ble mab 20H4,9-IgG1 valgt for videre evaluering basert på dets bindingsprofil og ikke-blokkerende egenskaper. Antistoffet 20H4,9-IgG1 er
 20 IgG1 kappa som bestemt ved ELISA ved anvendelse av alkalisk fosfatase anti-human IgG1, 2, 3, 4 og anti-kappa og lambda-reagenser (Southern Biotech, Birmingham, Alabama). FIG. 8 (FIG. 8A - binding til human CD137 ved ELISA; FIG. 8B - effekt av mab 20H4,9-IgG1 på CD137-CD137L-interaksjon) tilveiebringer den innledende karakteriseringen av mab 20H4,9-IgG1. Seriefortynninger av mab 20H4,9-IgG1, 26 G6 (et
 25 blokkerende anti-CD137 antistoff) eller tetanustoksoid (TT, negativ kontroll) ble evaluert for deres evne til å endre binding av CD137 til CD137L. Mab 20H4,9-IgG1 i konsentrasjoner opptil 10 $\mu\text{g/ml}$ blokkerte ikke CD137L-binding, mens mab 26 G6 hemmet binding i konsentrasjoner $> 0,37 \mu\text{g/ml}$.

30 Mab 20H4,9-IgG1 ble også testet for reaktivitet mot CD137 uttrykt på humane T-celler (CEM) og i perifert blod monocytiske celler fra cynomolgus-ape (PBMC) stimulert med PMA og ionomycin. Tidligere undersøkelser bestemte at CD137 oppreguleres på T-celler etter aktivering med PMA og ionomycin. Kontrollmolekyler besto av et irrelevant human IgG antistoff (negativ kontroll) eller CD137L-CD8 fusjonsprotein (positiv kontroll, BD Pharmingen, San Diego, California). Resultater fra disse undersøkelsene indikerte at

mab 20H4,9-IgG1 bandt til aktiverte humane CEM og PBMC'er fra cynomolgus-aper, med minimum binding til ustimulerte celler. Lignende prosentdel av positive celler ble detektert med enten mab 20H4,9-IgG1 eller CD137L. FIG. 9 gir resultatene oppnådd som viser bindingen av mab 20H4,9-IgG1 til PMA-ionomycin-stimulerte humane eller

5 cynomolgus-ape-celler. Human CEM (FIG. 9A) eller ape PBMC (FIG. 9B) ble inkubert med 20H4,9-IgG1 eller humant CD137L fusjonsprotein. Sekundære antistoffer ble tilsatt og prøver ble avlest ved flowcytometri.

Deretter ble det bestemt hvorvidt mab 20H4,9-IgG1 kunne indusere forbedring av IFN- γ i kostimulerende analyser i nærvær av anti-CD3-stimulering, den viktigste

10 funksjonelle effekten ønsket for et agonistisk CD137-antistoff. Mab 20H4,9-IgG1 ble evaluert for dets kostimulerende aktivitet i funksjonelle studier i humane og ape-lymfocytter. Basert på initielle data, ble en konsentrasjon på 20 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD137-antistoff (overskudd av antistoff) anvendt i disse undersøkelsene. Nivåer av anti-CD3 antistoff på mellom 0,2-1 $\mu\text{g/ml}$ ble testet, hvilket resulterte i 10-20% CD137-positive lymfocytter.

15 Nivåer av IFN- γ i supernatanter ble målt etter 72 timers dyrking. Som vist i FIG. 10, forbedret mab 20H4,9-IgG1 IFN- γ -syntese både i humane og ape kostimulerende analyser til nivåer betydelig høyere enn kontroller. Resultater av undersøkelser utført med T-celler isolert fra 8 friske humane donorer viste at i seks av dem, økte mab 20H4,9-IgG1 syntese av IFN- γ mellom 2,2 - 4,3 ganger sammenlignet med kontroller. En av de andre to

20 donorene oppviste en 1,6 gangers økning. Nivået av forsterkning var bedre enn det observert med hu39E3.G4, et humanisert anti-CD137-antistoff gitt i publisert PCT-søknad WO04/010947 som viste økning av IFN- γ i 5 av 8 donorer og ved nivåer lavere enn mab 20H4,9-IgG1 (1,5 - 2-gangers økning) (FIG. 10A). I ape kostimulerende studier, viste også mab 20H4,9-IgG1 forbedret funksjonell aktivitet hvilket resulterer i betydelig økning av

25 IFN- γ over kontroller (FIG. 10B). Som i de humane studiene, var forøkning av IFN- γ gjennomført høyere enn med hu39E3.G4.

Induksjon av TNF- α -syntese over kontrollnivåer ble også observert i humane kulturer, om enn ved mye lavere nivåer enn IFN- γ . TNF- α nivåer indusert ved anti-CD3 antistoff alene (baseline) var ca. 20-50 ganger lavere enn baselinenivåer for IFN- γ . Mab

30 20H4,9-IgG1 induserte en økning på ~2 til 4,7-ganger i 3 av 8 donorer. Igjen induserte hu39E3.G4 (testet parallelt) ~2-ganger økning i de samme donorene men ved lavere nivåer. Andre cytokiner testet, IL-2, IL-5, IL-10 og IL-4 ble ikke betydelig endret ved noen av behandlingene.

Samlet viste disse undersøkelsene at mab 20H4,9-IgG1 oppviste den funksjonelle aktiviteten ønsket hos både mennesker og aper ved å indusere en Th1-type respons. Siden *in vivo* anti-tumoraktivitet er forbundet med evnen av anti-CD137-antistoffer til å indusere IFN- γ -syntese, støttet disse resultatene, betegnende nok, valget av mab 20H4,9-IgG1 for isotypeswitching.

Eksempel 2: *In vitro*-karakterisering av mab 20H4,9-IgG4

Basert på dets bindingskinetikk, manglende evne til å blokkere CD137-CD137L-interaksjon og funksjonelle effekter på humane T-celler, ble mab 20H4,9-IgG1 valgt for switching til en IgG4-form. IgG4-formen av mab 20H4,9-IgG1 er 20H4,9-IgG4 (vist i FIG. 3 og 4).

Den andre fasen av disse studiene omfattet sammenligning av *in vitro*-egenskapene til mab 20H4,9-IgG4 og mab 20H4,9-IgG1. I dette avsnittet er bindingskinetiske egenskaper og funksjonelle effekter av begge antistoffene i humane og ape-lymfocytter beskrevet.

15 Bindingskinetikk

Kinetiske egenskaper av anti-human CD137-antistoffer ble evaluert ved overflate plasmonresonans ved anvendelse av et BIAcore 3000-instrument. Antigenet, humant CD137-murin IgG_{2a}, ble immobilisert kovalent ved lav tetthet på overflaten av en CM5 sensorchip. Mab 20H4,9-IgG4 og mab 20H4,9-IgG1 ble injisert i konsentrasjoner på mellom 25 og 200 nM. FIG. 11 viser injeksjoner ved 100 nM for både mab 20H4,9-IgG1 og mab 20H4,9-IgG4. Data beregnet ved anvendelse av BIAevaluation programvare (bivalent modell, global kurvetilpasning analyse) resulterte i kinetiske parametere som var lik for begge antistoffene (se Tabell 1). Dissosiasjonskonstanter K_D for mab 20H4,9-IgG1 og mab 20H4,9-IgG4 ble bestemt som 11,2 og 16,6 nM, henholdsvis. Under lignende eksperimentelle betingelser, bandt ikke mab 20H4,9-IgG4 til murin 4-1BB.

Tabell 1 - Sammenligning av bindingskinetikk for mab 20H4,9-IgG4 og mab 20H4,9-IgG1

antistoff	k_{a1} (1/MS)	k_{d1} (1/s)	k_{a2} (1/RUs)	k_{d2} (1/s)	Rmaks (RU)	K_{A1}	K_{D1} (nM)
20H4,9-IgG1	3,43E+0 4	3,85E- 04	2,30E- 05	1,51E- 03	262	8,91E+ 07	11,22
20H4,9-IgG4	3,92E+0 4	6,51E- 04	0,0755	0,105	409	6,02E+ 07	16,61

Flowcytometriske analyser

Biotinylert mab 20H4,9-IgG4 ved konsentrasjoner i området fra 0,32 ng/ml til 5 µg/ml ble testet for binding til CEM-celler ± PMA-ionomycin. Mab 20H4,9-IgG4 bundet til PMA-ionomycin stimulerte CEM-celler på en konsentrasjonsavhengig måte. Metning ble oppnådd ved 0,2 µg/ml. På den annen side, som vist for dets parentale molekyl mab 20H4,9-IgG1, bandt ikke mab 20H4,9-IgG4 til CEM-celler som ikke var stimulert med PMA-ionomycin (FIG. 12). Konsentrasjonsavhengig binding av mab 20H4,9-IgG4 ble vist i PMA-ionomycin-stimulerte CEM-celler (FIG. 12). Prøver ble avlest ved flowcytometri.

10 Cellulære/Funksjonelle analyser

For å bekrefte at fremgangsmåten med switching av isotypen av mab 20H4,9-IgG1 ikke endret aktiviteten av antistoffet, ble *in vitro*-undersøkelser utført for å sammenligne aktiviteten av mab 20H4,9-IgG4 med den parentale mab 20H4,9-IgG1 i ape PBMC og humane T-celler. De funksjonelle effektene av mab 20H4,9-IgG4 på humane og ape T-celler eller PBMC ble bestemt og sammenlignet med dets parentale molekyl, mab 20H4,9-IgG1. Primære humane T-celler eller ape PBMC oppnådd fra friske donorer ble stimulert med anti-CD3-antistoff (0,5 µg/ml-1 µg/ml) +/- anti-human CD137-antistoffer. Syntese av IFN-γ ble målt etter 72 timers dyrking ved 37 °C ved cytometric bead array (CBA) for humane prøver eller ved ELISA for ape-prøver. Antistoffer ble testet i kostimulerende analyser i nærvær av suboptimale konsentrasjoner av anti-CD3-antistoff (1 µg/ml) eller Concavalin A (1 µg/ml) (donorer M5170 og 81 kun). Resultater er uttrykt som ganger økning i pg/ml over kontroller. På grunn av den variable bakgrunnsresponsen blant donorer, ble data normalisert relativt til kontrollbehandlinger (=1). FIG. 13A tilveiebringer de humane T-cellerresultatene og FIG. 13B gir resultatene fra ape-PBMC. Som vist i FIG. 13A-13B, viste mab 20H4,9-IgG4 kostimulerende egenskaper hvilket gir høyere nivåer av IFN-γ i humane og ape-celler sammenlignet med kontroller. Nivået av forbedring av IFN-γ-syntese var komparabel med dets parentale molekyl i humane og ape-prøver.

Deretter ble effekten av kryssbinding av antistoff på den funksjonelle effekten av mab 20H4,9-IgG4 evaluert. Det har blitt vist at kryssbinding av antistoffer kan resultere i potensiering av deres evne til signalering. Følgelig ble det utført en undersøkelse for å bestemme den funksjonelle aktiviteten til mange batcher av mab 20H4,9-IgG4 ± et anti-humant IgG-antistoff. Som vist i FIG. 14A, ble det observert betydelig forbedring av IFN-γ-syntese for alle lots testet i fravær av kryssbindende antistoffer, med et platå ved

konsentrasjoner på 400 ng/ml. Økningen av IFN γ -syntese ved mab 20H4,9-IgG4 ble ytterligere forbedret ved tilsetning av anti-human IgG kryssbindende antistoff som vist i FIG. 14B. Forskjellige batcher av mab 20H4,9-IgG4 hadde komparable cellulære aktiviteter.

5 Følgelig førte kryssbinding av mab 20H4,9-IgG4 til en forbedring av antistoffets evne til å inducere IFN- γ -syntese. Kryssbinding av antistoff *in vivo* kan forekomme ved cellulære reseptorer for Fc-delen av immunglobuliner eller ved dimerisering av antistoff. Mab 20H4,9-IgG4 er av IgG4-isotypen, som, sammenlignet med andre IgG-isotyper, har lav affinitet for Fc-reseptorer. Imidlertid kan IgG4 binde til Fc γ RI (CD64) uttrykt på
10 monocytter og nøytrofiler.

To andre metoder ble anvendt for å ytterligere karakterisere mab 20H4,9-IgG4: (i) effekt på T-celleoverlevelse og (ii) effekt på cyclin D2-ekspressjon. For å bestemme hvorvidt mab 20H4,9-IgG4 kunne frembringe signalering gjennom CD137 på humane T-celler og gi kostimulerende signaler til T-celler som fører til celleoverlevelse og
15 ekspansjon, ble humane T-celler stimulert med anti-CD3 antistoffer +/- mab 20H4,9-IgG4 i konsentrasjoner kjent å inducere IFN- γ -syntese merket med annexin-V og propidiumjodid for å bestemme antall levende celler (Annexin V/Propidiumjodid negativ) og med Cyclin D2 for å bestemme dens effekt på celleprogresjon. FIG. 15 viser de gjennomsnittlige resultatene for 4 forskjellig lots av mab 20H4,9-IgG4 på cyclin D2-ekspressjon og
20 overlevelse av T-celler. Konsentrasjoner av mab 20H4,9-IgG4 på 0,4-10 μ g/ml resulterte i en økning i antallet levende celler ved omtrent 1,8 - 2 ganger og ga en betydelig økning i antallet cyclin D2-uttrykkende T-celler (2,5 - 3 ganger).

Eksempel 3: *In vivo*-evaluering av 4-1BB-antistoffer i en farmakodynamisk modell i cynomolgus-aper.

25 Dette eksemplet illustrerer evnen til mab 20H4,9-IgG4 og mab hu39E3.G4 til å forbedre den antigenspesifikke immunresponsen fremkalt ved DNA-vaksiner.

Materialer og Metoder

Eksperimentelle dyregrupper: Hunn og hann cynomolgus-aper (2,5 til 5,0 kg) ble anskaffet fra Charles River BRF (Houston, Texas) for dette studiet og ble oppstallet i par.
30 Hver eksperimentell gruppe besto av 4 hanner og 2 hunner som ble randomisert inn i grupper med hensyn til kroppsvekt. Eksperimentelle grupper var som følger:

Gruppe 1 - SIV gag og PSA DNA-vaksine (2 mg hver), dag 0, 28, 56, i.m., samt kontroll med saltoppløsning, i.v., ved dagene 12, 15 og 19;

Gruppe 2 - SIV gag og PSA DNA-vaksine (2 mg hver), dag 0, 28, 56, i.m., samt mab hu39E3.G4, i.v., ved dagene 12, 15 og 19;

Gruppe 3 - SIV gag og PSA DNA-vaksine (2 mg hver), dag 0, 28, 56, i.m., samt mab 20H4,9-IgG4, i.v., ved dagene 12, 15 og 19;

5 Gruppe 4 - ubehandlet kontrollgruppe.

Immuniseringer og antistoffbehandlinger: PSA og SIV gag DNA-vaksineer ble oppnådd fra David B. Weiner, Department of Pathology and Laboratory of Medicine, University of Pennsylvania. (se Kim et al., *Oncogene* 20, 4497-4506 (2001); Muthumani et al., *Vaccine* 21, 629-637 (2003).)

10 Aper ble immunisert ved den intramuskulære ruten med både PSA og SIV gag DNA-konstruksjoner (2 mg/konstruksjon/immunisering) samtidig, fulgt av to booster med 4 ukers mellomrom (dagene 0, 28 og 56). Tolv dager etter den initielle immuniseringen, ble behandling med mab 20H4,9-IgG4 eller mab hu39E3.G4 initiert. Antistoffer ble administrert i.v, ved 50 mg/kg, ved dagene 12, 15 og 19 etter den første immuniseringen.

15 Denne planen ble valgt fordi den ble vist å undertrykke antistoffresponsen til mab hu39E3.G4.

Klinisk og klinisk patologi

Gjennom hele varigheten av studiet, ble det foretatt fysiske undersøkelser av alle apene ved de ansvarlige veterinærene. Blodprøver for hematologi og serumkjemi-analyser
20 ble oppsamlet før vaksinasjoner og deretter 12, 42, 70, 97, 134 og 168 dager etter immuniseringer.

Immunologiske analyser

For å bestemme effekten på immunresponsene induert ved disse terapeutiske regimene, ble en enzyme-linked immunospot-analyse (ELISPOT) anvendt for deteksjon av
25 IFN- γ -produksjon ved antigen-spesifikk stimulerte lymfocytter. Blodprøver for ELISPOT-analyser ble oppsamlet før vaksinasjoner og deretter 12, 42, 70, 97, 134 og 168 dager etter immuniseringer. Syntetiske peptider svarende til de fullstendige sekvensene av SIV gag og PSA-antigenet ble anvendt for ex vivo stimulering av PBMC.

Resultater

30 Antigen-spesifikk IFN- γ -sekreterende celler i respons til PSA eller SIV gag-peptider ble kvantifisert ved ELISPOT. FIG. 16 (FIG. 16A-16D) viser resultatene oppnådd fra Gruppene 1-4, henholdsvis. Nivået av respons til PSA var svært lavt i alle grupper, hvilket indikerer at vaksinen alene ikke induerte en målbar og konsistent immunrespons sammenlignet med ikke-vaksinerte dyr. På den annen side førte SIV gag-vaksinasjon alene

til et betydelig antall antigenspesifikke IFN- γ -utskillende celler som økte over tid (FIG. 16A). Ubehandlede dyr (ikke vaksinert) viste 100-1,000 spots/10⁶ PBMC gjennom hele forløpet av undersøkelsen (FIG. 16D). Disse resultatene etablerte startresponsen til vaksinen; dyr som fremviste < 1,000 spots/10⁶ PBMC ble betraktet som ikke-respondere. I

5 gruppen dyr som mottok vaksine, viste 5 av 6 aper en øket respons over tid, med et gjennomsnittlig antall spots etter den tredje immuniseringen (dag 70) på 1,727 spots/10⁶ PBMC (SD=242, område=1,403-1,968 spots/10⁶ PBMC). En ape ble betraktet som en ikke-responder (620 spots/million PBMC). Siden MHC typebestemmelse ikke ble utført i

10 aper kan skyldes MHC-mismatch. Bemerkelsesverdig nok fremviste, ved dag 70, 4 av 6 dyr behandlet med SIV gag samt mab 20H4,9-IgG4 et betydelig høyere antall IFN- γ spots (FIG. 16C) sammenlignet med kontrolldyr (FIG. 16D) og med makaker som var immunisert med DNA-vaksine alene (FIG. 16A). Gjennomsnittlig antall spots etter den tredje immuniseringen for den mab 20H4,9-IgG4-behandlede gruppen var 3,465 spots/10⁶

15 PBMC (SD=1,236, område=2,070-4,780 spots/10⁶ PBMC). To aper i den gruppen responderte ikke til vaksinen (< 800 spots/million PBMC). Etter den tredje immuniseringen (dag 70), førte behandling med mab hu39E3.G4 samt DNA-vaksine til at 6 av 6 dyr ble ansett som respondere med et gjennomsnittlig antall spots/10⁶ PBMC på 2,348 (SD=588, område=1,738-3,283) (FIG. 16B). For denne gruppen var området av

20 antall spots mindre sammenlignet med de makakene som ble behandlet med mab 20H4,9-IgG4.

Behandling med både mab 20H4,9-IgG4 og mab hu9E3.G4 var veltolerert og førte ikke til noen betydelige endringer i kliniske tegn, klinisk kjemi eller hematologiske parametere relativt til kontroll-aper.

25 Disse dataene viser at mab 20H4,9-IgG4-behandling i kombinasjon med en DNA-vaksine fremkalte en *in vivo*-forbedring av størrelsen av den spesifikke cellulære responsen til det testede antigenet relativt til kontroller eller til behandling med mab hu39E3.G4, som målt ved antigenspesifikke IFN- γ -utskillende celler. Siden kun ett dosenivå av antistoffene og ett doseringsregime ble anvendt i disse preliminare undersøkelsene, er det ikke

30 sannsynlig at maksimale responser ble induisert og det er nødvendig med videre arbeid for å optimalisere betingelser. Det er imidlertid klart at selv med denne ikke-optimaliserte fremgangsmåten ble det oppnådd en forbedring av den cellulære responsen til test-

antigener med mab 20H4,9-IgG4, hvilket indikerer at modulering av CD137-funksjon kan være en attraktiv metode for å øke effektiviteten av DNA-vaksiner.

- Selv om oppfinnelsen er beskrevet i noen detaljer for å illustrere og eksemplifisere med det formål å oppnå klarhet og forståelse, vil det være klart at visse endringer og modifikasjoner kan utføres innenfor omfanget av de vedlagte kravene.
- 5

PATENTKRAV:

1. Fullstendig humant monoklonalt antistoff eller antigenbindende del derav, karakterisert ved at det binder spesifikt til 4-1BB, og omfatter en lett kjede
 5 variabel region og en tung kjede variabel region, hvor:
 nevnte lett kjede variabel region omfatter en CDR1 bestående av aminosyrerestene 44-54 av SEKV ID NR:6, en CDR2 bestående av aminosyrerestene 70-76 av SEKV ID NR:6 og en CDR3 bestående av aminosyrerestene 109-119 av SEKV ID NR:6; og
 nevnte tung kjede variabel region omfatter en CDR1 bestående av aminosyrerestene 50-54
 10 av SEKV ID NR:3, en CDR2 bestående av aminosyrerestene 69-84 av SEKV ID NR:3 og en CDR3 bestående av aminosyrerestene 117-129 av SEKV ID NR:3.
2. Fullstendig humant monoklonalt antistoff eller antigenbindende del derav ifølge krav 1, karakterisert ved at:
 15 nevnte lett kjede omfatter en variabel region bestående av aminosyrerestene 21-129 av SEKV ID NR:6; og nevnte tung kjede omfatter en variabel region bestående av aminosyrerestene 20-140 av SEKV ID NR:3.
3. Fullstendig humant monoklonalt antistoff omfattende en lett kjede og en tung kjede,
 20 hvor nevnte lette kjede omfatter aminosyrerestene 21-236 av SEKV ID NR:6 og nevnte tunge kjede omfatter aminosyrerestene 20-467 av SEKV ID NR:3.
4. Farmasøytisk preparat karakterisert ved at det omfatter:
 fullstendig humant monoklonalt antistoff eller antigenbindende del derav ifølge krav 1
 25 eller 2; og en farmasøytisk akseptabel bærer.
5. Farmasøytisk preparat karakterisert ved at det omfatter:
 fullstendig humant monoklonalt antistoff ifølge krav 3; og
 en farmasøytisk akseptabel bærer.
- 30
6. Fullstendig humant monoklonalt antistoff eller antigenbindende del derav ifølge hvilket som helst ett av kravene 1 til 3 for anvendelse i behandling av kreft.

7. Anvendelse av et isolert polynukleotid omfattende en nukleotidsekvens som koder for aminosyresekvensen av aminosyrerestene 20-467 av SEKV ID NR:3 og et isolert polynukleotid omfattende en nukleotidsekvens som koder for aminosyresekvensen av aminosyrerestene 21-236 av SEKV ID NR:6 for å produsere et fullstendig humant
- 5 monoklonalt antistoff eller antigenbindende del derav omfattende en lett kjede variabel region og en tung kjede variabel region som definert i hvilket som helst av kravene 1 til 3.
8. Anvendelse av et polynukleotid omfattende nukleotidsekvensen i SEKV ID NR:1 og et polynukleotid omfattende nukleotidsekvensen i SEKV ID NR:4 for å produsere et
- 10 fullstendig humant monoklonalt antistoff eller antigenbindende del derav omfattende en lett kjede variabel region kodet for av nukleotidsekvensen i SEKV ID NR:4 og en tung kjede variabel region kodet for av nukleotidsekvensen i SEKV ID NR:1.

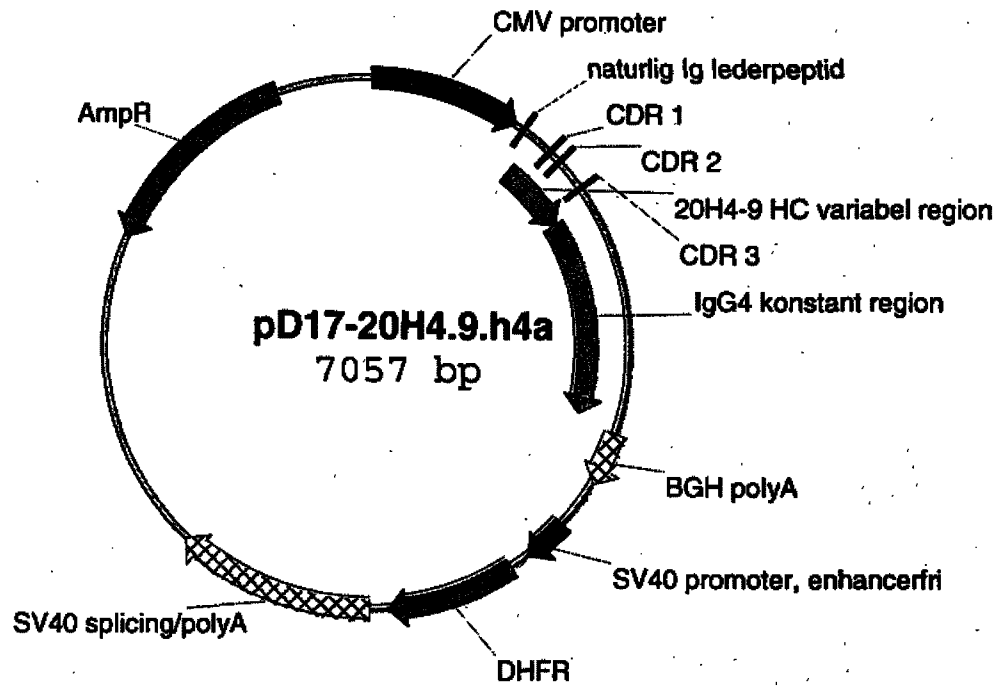


FIG. 1

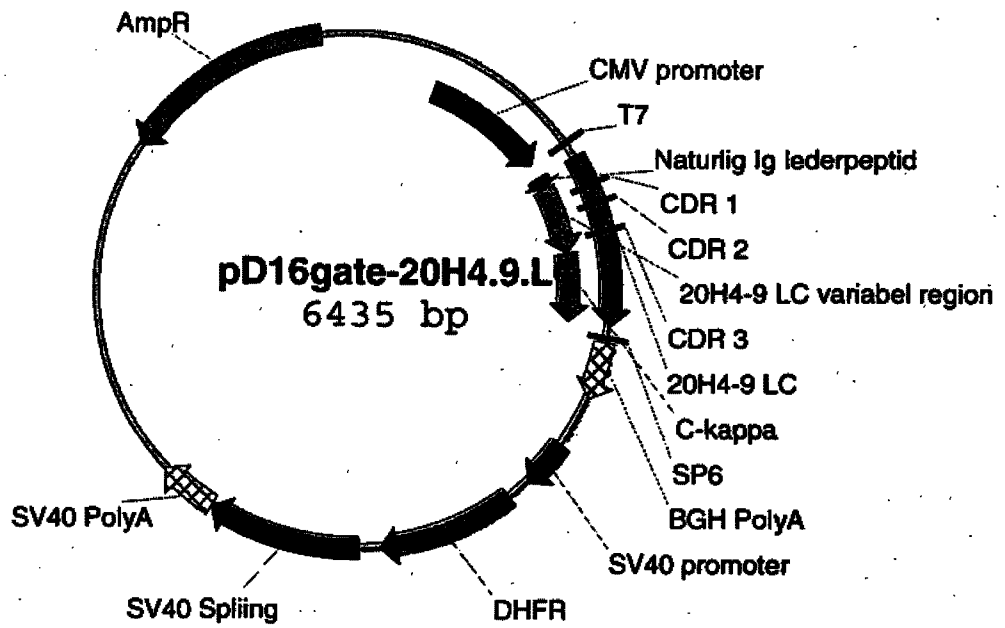


FIG. 2

2/29

```

1  CGATGTACGG GCCAGATATA CGCGTTGACA TTGATTATTG ACTAGTTATT
   GCTACATGCC CGGTCATATAT GCGCAACTGT AACTAATAAC TGATCAATAA
51  AATAGTAATC AATTACGGGG TCATTAGTTC ATAGCCCATA TATGGAGTTC
   TTATCATTAG TTAATGCCCC AGTAATCAAG TATCGGGTAT ATACCTCAAG
101 CGCGTTACAT AACTTACGGT AAATGGCCCG CCTGGCTGAC CGCCCAACGA
   GCGCAATGTA TTGAATGCCA TTTACCGGGC GGACCGACTG GCGGGTTGCT
151 CCCCCGCCCA TTGACGTCAA TAATGACGTA TGTTCCCATTA GTAACGCCAA
   GGGGGCGGGT AACTGACGTT ATTACTGCAT ACAAGGGTAT CATTGCGGTT
201 TAGGGACTTT CCATTGACGT CAATGGGTGG ACTATTTACG GTAAACTGCC
   ATCCCTGAAA GGTAAC TGCA GTTACCCACC TGATAAATGC CATTTGACGG
251 CACTTGGCAG TACATCAAGT GTATCATATG CCAAGTACGC CCCCTATTGA
   GTGAACCGTC ATGTAGTTC CATAGTATAC GGTTTCATGCG GGGGATAACT
301 CGTCAATGAC GGTAAATGGC CCGCTGGCA TTATGCCAG TACATGACCT
   GCAGTTACTG CCATTTACCG GCGGACCGT AATACGGGTC ATGTACTGGA
351 TATGGGACTT TCCTACTTGG CAGTACATCT ACGTATTAGT CATCGCTATT
   ATACCCTGAA AGGATGAACC GTCATGTAGA TGCATAATCA GTAGCGATAA
401 ACCATGGTGA TCGGTTTTG GCAGTACATC AATGGGCGTG GATAGCGGTT
   TGGTACCCT ACGCCAAAAC CGTCATGTAG TTACCCGCAC CTATCGCCAA
451 TGACTCACGG GGATTTCCAA GTCTCCACCC CATTGACGTC AATGGGAGTT
   ACTGAGTGCC CCTAAAGGTT CAGAGGTGGG GTAAC TGCA GTTACCCCTCAA
501 TGTTTTGGCA CCAAATCAA CGGGACTTTC CAAAATGTG TAACA ACTCC
   ACAAACCGT GGTTTTAGTT GCCCTGAAAG GTTTTACAGC ATTGTTGAGG
551 GCCCCATTGA CGCAAATGGG CGGTAGGCGT GTACGGTGGG AGGTCTATAT
   AAGCAGAGCT CTCTGGCTAA CTAGAGAACC CACTGCTTAC TGGCTTATCG
601 TTCGTCTCGA GAGACCGATT GATCTCTTGG GTGACGAATG ACCGAATAGC
                                     -----
                                     M K
651 AAATTAATAC GACTCACTAT AGGGAGACCC AAGCTTGGTA CCGCCATGAA
   TTTAATTATG CTGAGTGATA TCCCTCTGGG TTCGAACCAT GCGGTTACTT
   naturlig Ig lederpeptid
-----
. H L W F F L L L V A A P R W V L S
701 ACACCTGTGG TTCTTCCTCC TCCTGGTGGC AGCTCCAG A TGGGTCCTGT
   TGTGGACACC AAGAAGGAGG AGGACCACCG TCGAGGGTCT ACCCAGGACA
   natural Ig leader sequence
   ~~~
           20H4-9 HC variabel region
-----
. Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E
751 CCCAGGTGCA ACTACAGCAG TGGGGCGCAG GACTGTTGAA GCCTTCGGAG
   GGGTCCACGT TGATGTCGTC ACCCGCGTC CTGACAACCT CGGAAGCCTC
                                     CDR 1
                                     -----
           20H4-9 HC variabel region
-----
. T L S L T C A V Y G G S F S G Y Y
801 ACCCTGTCCC TCACCTGCGC TGTCATGGT GGGTCCTTCA GTGGTTACTA
   TGGGACAGGG AGTGGACGCG ACAGATACCA CCCAGGAAGT CACCAATGAT
   CDR 1 CDR 2
-----
           20H4-9 HC variabel region
-----
. W S W I R Q S P E K G L E W I G E
851 CTGGAGCTGG ATACGCCAGT CCCAGAGAA GGGGCTGGAG TGGATTGGGG
   GACCTCGACC TATGCGGTCA GGGGTCTCTT CCCCACCTC ACCTAACCC

```

FIG. 3A

3/29

CDR 2

20H4-9 HC variabel region

901 · I N H G G Y V T Y N P S L E S R
AAATCAATCA TGGTGGATAC GTCACCTACA ATCCGTCCTT CGAGAGTCGA
TTTAGTTAGT ACCACCTATG CAGTGGATGT TAGGCAGGGA GCTCTCAGCT
20H4-9 HC variable region

951 V T I S V D T S K N Q F S L K L S
GTCACCATAT CAGTAGACAC GTCCAAGAAC CAGTTCTCCC TGAAGCTGAG
CAGTGGTATA GTCATCTGTG CAGGTTCTTG GTCAAGAGGG ACTTCGACTC
CDR 3

20H4-9 HC variabel region

1001 · S V T A A D T A V Y Y C A R D Y G
CTCTGTGACC GCCGCGGACA CGGCTGTATA TTACTGTGCG AGGGACTATG
GAGACACTGG CCGCGCCTGT GCCGACATAT AATGACACGC TCCCTGATAC
CDR 3

20H4-9 HC variabel region

1051 · P G N Y D W Y F D L W G R G T L
GTCCGGGGAA TTATGACTGG TACTTCGATC TCTGGGGCCG TGGCACCTTG
CAGGCCCTT AATACTGACC ATGAAGCTAG AGACCCCGC ACCGTGGGAC
IgG4 CH1 domene

20H4-9 HC variable region

1101 · V T V S S A S T K G P S V F P L A
GTCACTGTCT CCTCAGCTAG CACCAAGGGC CCATCCGTCT TCCCCCTGGC
CAGTGACAGA GGAGTCGATC GTGGTTCCCG GGTAGGCAGA AGGGGGACCG
IgG4 CH1 domene

1151 · P C S R S T S E S T A A L G C L V
GCCCTGTCTC AGGAGCACCT CCGAGAGCAC AGCCGCCCTG GGCTGCCTGG
CGGGACGAGG TCCTCGTGGG GGCTCTCGTG TCGGCGGGAC CCGACGGACC
IgG4 CH1 domene

1201 · K D Y F P E P V T V S W N S G A
TCAAGGACTA CTTCCCGGAA CCGGTGACGG TGTCGTGGAA CTCAGGCGCC
AGTTCCTGAT GAAGGGGCTT GGCCACTGCC ACAGCACCTT GAGTCCGCGG
IgG4 CH1 domene

1251 · L T S G V H T F P A V L Q S S G L
CTGACCAGCG GCGTGCACAC CTTCCCGGCT GTCCTACAGT CCTCAGGACT
GACTGGTCGC CGCACGTGTG GAAGGGCCGA CAGGATGTCA GGAGTCTGA
IgG4 CH1 domene

1301 · Y S L S S V V T V P S S S L G T K
CTACTCCCTC AGCAGCGTGG TGACCGTGCC CTCCAGCAGC TTGGGCACGA
GATGAGGGAG TCGTCGCACC ACTGGCACGG GAGGTCGTG AACCCGTGCT

FIG. 3B

4/29

IgG4 CH1 domene

1351 · T Y T C N V D H K P S N T K V D
AGACCTACAC CTGCAACGTA GATCACAAGC CCAGCAACAC CAAGGTGGAC
TCTGGATGTG GACGTTGCAT CTAGTGTTCG GGTCGTTGTG GTTCCACCTG
 IgG4 hengselregion

IgG4 CH1 domene

1401 K R V E S K Y G P P C P P C P A P
AAGAGAGTTG AGTCCAAATA TGGTCCACCT TGCCACCTT GCCCAGCACC
TTCTCTCAAC TCAGGTTTAT ACCAGGTGGA ACGGGTGGAA CGGGTCGTGG
 IgG4 CH2 domene

1451 · E F L G G P S V F L F P P K P K D
TGAGTTCCTG GGGGACCAT CAGTCTTCCT GTTCCCCCA AAACCCAAGG
ACTCAAGGAC CCCCTGGTA GTCAGAAGGA CAAGGGGGGT TTTGGGTTCC
 IgG4 CH2 domene

1501 · T L M I S R T P E V T C V V V D
ACACTCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACGTGCGT GGTGGTGGAC
TGTGAGAGTA CTAGAGGGCC TGGGGACTCC AGTGCACGCA CCACCACCTG
 IgG4 CH2 domene

1551 V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V
GTGAGCCAGG AAGACCCCGA GGTCCAGTTC AACTGGTACG TGGATGGCGT
CACTCGGTCC TTCTGGGGCT CCAGGTCAAG TTGACCATGC ACCTACCGCA
 IgG4 CH2 domene

1601 · E V H N A K T K P R E E Q F N S T
GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TTCAACAGCA
CCTCCACGTA TTACGGTTCT GTTTCGGCGC CCTCCTCGTC AAGTTGTGCT
 IgG4 CH2 domene

1651 · Y R V V S V L T V L H Q D W L N
CGTACCGTGT GGTACGCGTC CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAC
GCATGGCACA CCAGTCGCAG GAGTGGCAGG ACGTGGTCTT GACCGACTTG
 IgG4 CH2 domene

1701 G K E Y K C K V S N K G L P S S I
GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGGCCTCC CGTCCTCCAT
CCGTTCTCA TGTTCACGTT CCAGAGGTTG TTTCCGGAGG GCAGGAGGTA
 IgG4 CH3 domene

IgG4 CH2 domene

1751 · E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y
CGAGAAAACC ATCTCAAAG CCAAAGGGCA GCCCGAGAG CCACAGGTGT
GCTCTTTTGG TAGAGGTTTC GGTTCCTCGT CGGGGCTCTC GGTGTCCACA
 IgG4 CH3 domene

1801 · T L P P S Q E E M T K N Q V S L
ACACCTGCC CCCATCCAG GAGGAGATGA CCAAGAACCA GGTGAGCCTG
TGTGGGACGG GGGTAGGGTC CTCCTCTACT GGTCTTGGT CCAGTCGGAC

FIG. 3C

5/29

IgG4 CH3 domene

1851 T C L V K G F Y P S D I A V E W E
ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTACCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA
TGGACGGACC AGTTTCCGAA GATGGGGTCG CTGTAGCGGC ACCTCACCTT
IgG4 CH3 domene

1901 S N G Q P E N N Y K T T P P V L D
GAGCAATGGG CAGCCGAGG ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGCTGG
CTCGTTACCC GTCGGCCTCT TGTTGATGTT CTGGTGCGGA GGGCACGACC
IgG4 CH3 domene

1951 S D G S F F L Y S R L T V D K S
ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTACAGCA GGCTAACCGT GGACAAGAGC
TGAGGCTGCC GAGGAAGAAG GAGATGTCGT CCGATTGGCA CCTGTTCTCG
IgG4 CH3 domene

2001 R W Q E G N V F S C S V M H E A L
AGGTGGCAGG AGGGGAATGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC ATGAGGCTCT
TCCACCGTCC TCCCCTTACA GAAGAGTACG AGGCACTACG TACTCCGAGA
IgG4 CH3 domene

2051 H N H Y T Q K S L S L S L G K
GCACAACCAC TACACACAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCTG GGTAATGAT
CGTGTGGTG ATGTGTGTCT TCTCGGAGAG GGACAGAGAC CCATTTACTA
2101 CTAGAGGGCC CTATTCTATA GTGTCACCTA AATGCTAGAG CTCGCTGATC
GATCTCCCGG GATAAGATAT CACAGTGGAT TTACGATCTC GAGCGACTAG
2151 AGCCTCGACT GTGCCTTCTA GTTGCCAGCC ATCTGTTGTT TGCCCTCCC
TCGGAGCTGA CACGGAAGAT CAACGGTCCG TAGACAACAA ACGGGGAGGG
2201 CCGTGCCTTC CTTGACCCTG GAAGGTGCCA CTCCCCTGT CCTTTCCTAA
GGCACGGGAG GAACTGGGAC CTTCCACGGT GAGGGTGACA GGAAAGGATT
2251 TAAAATGAGG AAATTGCATC GCATTGTCTG AGTAGGTGTC ATTCTATTCT
ATTTACTCC TTTAACGTAG CGTAACAGAC TCATCCACAG TAAGATAAGA
2301 GGGGGTGGG GTGGGGCAGG ACAGCAAGGG GGAGGATTGG GAAGACAATA
CCCCCACC CACCCGTCC TGTGTTCCC CCTCCTAAC CCTTCTGTTAT
2351 GCAGGCATGC TGGGGATGCG GTGGGCTCTA TGGCTTCTGA GGCAGAAAGA
CGTCCGTACG ACCCTACGC CACCCGAGAT ACCGAAGACT CCGCCTTCT
2401 ACCAGCTGGG GCTCTAGGGG GTATCCCCAC GCGCCCTGTA GCGGCGCATT
TGTCGACCC CGAGATCCCC CATAGGGGTG CCGGGGACAT CGCCCGTAA
2451 AAGCGCGCG GGTGTGGTGG TTACGCGCAG CGTGACCGCT ACACTTGCCA
TTCGCGCCGC CCACACCACC AATGCGCGTC GCACTGGCGA TGTGAACGGT
2501 GCGCCCTAGC GCCCGCTCCT TTCGCTTCT TCCCTTCCTT TCTCGCCAG
CGCGGATCG CCGGCGAGGA AAGCGAAAGA AGGGAAGGAA AGAGCGGTGC
2551 TTCGCCGGC CTCTCAAAAA AGGGAAGAAA AGCATGCATC TCAATTAGTC
AAGCGGCCG GAGAGTTTTT TCCCTTTTTT TCGTACGTAG AGTTAATCAG
2601 AGCAACCATA GTCCCGCCCC TAACTCCGCC CATCCCGCCC CTAACTCCGC
TCGTTGGTAT CAGGGCGGGG ATTGAGGCGG GTAGGGCGGG GATTGAGCGG
2651 CCAGTTCCGC CCATTCTCCG CCCCATGGCT GACTAATTTT TTTTATTAT
GGTCAAGCGG GGTAAAGAGC GGGGTACCGA CTGATTAAAA AAAATAAATA
2701 GCAGAGGCCG AGGCCGCTC GGCCTCTGAG CTATTCCAGA AGTAGTGAGG
CGTCTCCGGC TCCGGCGGAG CCGGAGACTC GATAAGGTCT TCATCACTCC
2751 AGGCTTTTTT GGAGGCCTAG GCTTTTGCAA AAAGCTTGGA CAGCTCAGGG
TCCGAAAAAA CCTCCGGATC CGAAAAAGTT TTTGAACTT GTGAGTCCC
2801 CTGCGATTTT GCGCCAAACT TGACGGCAAT CCTAGCGTGA AGGCTGGTAG
GACGCTAAAG CGCGGTTTGA ACTGCCGTTA GGATCGCACT TCCGACCATC

FIG. 3D

6/29

2851 GATTTTATCC CCGCTGCCAT CATGGTTCGA CCATTGAACT GCATCGTCGC
 CTAAAATAGG GCGGACGGTA GTACCAAGCT GGTAACCTGA CGTAGCAGCG
 2901 CGTGTCCCAA AATATGGGGA TTGGCAAGAA CGGAGACCTA CCCTGGCCTC
 GCACAGGGTT TTATACCCCT AACCGTCTTT GCCTCTGGAT GGGACCGGAG
 2951 CGCTCAGGAA CGAGTTC AAG TACTTCCAAA GAATGACCAC AACCTCTTCA
 GCGAGTCCTT GCTCAAGTTC ATGAAGGTTT CTTACTGGTG TTGGAGAAGT
 3001 GTGGAAGGTA AACAGAACT GGTGATTATG GGTAGGAAAA CCTGGTTCTC
 CACCTTCCAT TTGTCTTAGA CCACTAATAC CCATCCTTTT GGACCAAGAG
 3051 CATTCTCGAG AAGAATCGAC CTTTAAAGGA CAGAATTAAT ATAGTCTCA
 GTAAGGACTC TTCTTAGCTG GAAATTTCCCT GTCTTAATTA TATCAAGAGT
 3101 GTAGAGAACT CAAAGAACCA CCACGAGGAG CTCATTTTCT TGCCAAAAGT
 CATCTCTTGA GTTCTTGGT GGTGCTCCTC GAGTAAAAGA ACGGTTTTCA
 3151 TTGGATGATG CCTTAAGACT TATTGAACAA CCGGAATTGG CAAGTAAAGT
 AACCTACTAC GGAATTCCTGA ATAACCTGTT GGCCTTAACC GTTCATTTCA
 3201 AGACATGGTT TGGATAGTCG GAGGCAGTTC TGTTTACCAG GAAGCCATGA
 TCTGTACCAA ACCTATCAGC CTCCGTC ACAAATGGTC CTTCCGTTACT
 3251 ATCAACCAGG CCACCTTAGA CTCCTTGTGA CAAGGATCAT GCAGGAATTT
 TAGTTGGTCC GGTGGAATCT GAGAAACACT GTTCCTAGTA CGTCCTTAAA
 3301 GAAAGTGACA CGTTTTTCCC AGAAATGAT TTGGGGAAAT ATAACTTCT
 CTTTCACTGT GCAAAAAGGG TCTTTAACTA AACCCCTTTA TATTTGAAGA
 3351 CCCAGAAATC CCAGGCGTCC TCTCTGAGGT CCAGGAGGAA AAAGGCATCA
 GGGTCTTATG GGTCCGCAAG AGAGACTCCA GTCCTTCTT TTTCCGTAGT
 3401 AGTATAAGTT TGAAGTCTAC GAGAAGAAAG ACTAACAGGA AGATGCTTTC
 TCATATTCAA ACTTCAGATG CTCCTTCTTC TGATTGTCTT TCTACGAAAG
 3451 AAGTCTCTG CTCCCTCCT AAAGCTATGC ATTTTTATAA GACCATGGGA
 TTCAAGAGAC GAGGGGAGGA TTTCGATACG TAAAAATATT CTGGTACCCT
 3501 CTTTTGCTGG CTTTAGATCT CTTTGTGAAG GAACCTTACT TCTGTGGTGT
 GAAAACGACC GAAATCTAGA GAAACACTTC CTTGGAATGA AGACACCACA
 3551 GACATAATTG GACAACTAC CTACAGAGAT TTAAAGCTCT AAGGTAAATA
 CTGTATTAAC CTGTTTGATG GATGTCTCTA AATTTGAGGA TTCCATTTAT
 3601 TAAAATTTTT AAGTGTATAA TGTGTTAAAC TACTGATTCT AATTGTTTGT
 ATTTTAAAAA TTCACATATT ACACAATTTG ATGACTAAGA TTAACAAACA
 3651 GTATTTTAGA TTCCAACCTA TGGAAGTATG GAATGGGAGC AGTGGTGGAA
 CATAAAATCT AAGGTTGGAT ACCTTGACTA CTTACCCTCG TCACCACCTT
 3701 TGCCTTTAAT GAGGAAAACC TGTTTTGCTC AGAAGAAATG CCATCTAGTG
 ACGGAAATTA CTCCTTTTGG ACAAACGAG TCTTCTTAC GGTAGATCAC
 3751 ATGATGAGGC TACTGCTGAC TCTCAACATT CTACTCCTCC AAAAAAGAAG
 TACTACTCCG ATGACGACTG AGAGTTGTAA GATGAGGAGG TTTTTCTTC
 3801 AGAAAGGTAG AAGACCCCAA GGACTTTCCT TCAGAATTGC TAAGTTTTTT
 TCTTTCCATC TTCTGGGGTT CCTGAAAGGA AGTCTTAACG ATTCAAAAAA
 3851 GAGTCATGCT GTGTTTAGTA ATAGAACTCT TGCTTGCTTT GCTATTTACA
 CTCAGTACGA CACAAATCAT TATCTTGAGA ACGAACGAAA CGATAAATGT
 3901 CCACAAAGGA AAAAGCTGCA CTGCTATACA AGAAAATTAT GGAAAATAT
 GGTGTTTCTT TTTTCGACGT GACGATATGT TCTTTTAATA CCTTTTTATA
 3951 TCTGTAACCT TTATAAGTAG GCATAACAGT TATAATCATA ACATACTGTT
 AGCATTGGA AATATTCATC CGTATTGTCA ATATTAGTAT TGTATGACAA
 4001 TTTTCTTACT CCACACAGGC ATAGAGTGTG TGCTATTAAT AACTATGCTC
 AAAAGAATGA GGTGTGTCGG TATCTCACAG ACGATAATTA TTGATACGAG
 4051 AAAAATTGTG TACCTTTAGC TTTTAAATTT GTAAAGGGGT TAATAAGGAA
 TTTTAAACAC ATGGAAATCG AAAAATTAAA CATTTCCCA ATTATTCCTT
 4101 TATTTGATGT ATAGTGCCTT GACTAGAGAT CATAATCAGC CATACCACAT
 ATAACTACA TATCACGGAA CTGATCTCTA GTATTAGTCG GTATGGTGTG
 4151 TTGTAGAGGT TTTACTTGCT TTA AAAAACC TCCACACCT CCCCCTGAAC
 AACATCTCCA AAATGAACGA AATTTTTTGG AGGGTGTGGA GGGGGACTTG
 4201 CTGAAACATA AAATGAATGC AATTGTTGTT GTTAACTTGT TTATTGCAGC

FIG. 3E

7/29

4251 GACTTTGTAT TTTACTTACG TTAACAACAA CAATTGAACA AATAACGTCG
 TTATAATGGT TACAAATAAA GCAATAGCAT CACAAATTTT ACAAATAAAG
 AATATTACCA ATGTTTATTT CGTTATCGTA GTGTTTAAAG TGTTTATTTT
 4301 CATTTTTTTC ACTGCATTC T AGTTGTGGTT TGTCCAAAC CATCAATGTA
 GTAAAAAAG TGACGTAAGA TCAACACCAA ACAGGTTTGA GTAGTTACAT
 4351 TCTTATCATG TCTGGATCGG CTGGATGATC CTCCAGCGCG GGGATCTCAT
 AGAATAGTAC AGACCTAGCC GACCTACTAG GAGGTCGCGC CCCTAGAGTA
 4401 GCTGGAGTTC TTCGCCCACC CCAACTTGT TATTGCAGCT TATAATGGTT
 CGACCTCAAG AAGCGGGTGG GGTGGAACAA ATAACGTCGA ATATTACCAA
 4451 ACAAATAAAG CAATAGCATC ACAAATTTCA CAAATAAAGC ATTTTTTTTCA
 TGTTTATTTT GTTATCGTAG TGTTTAAAGT GTTTATTTTC TAAAAAAGT
 4501 CTGCATTCTA GTTGTGGTTT GTCCAAACTC ATCAATGTAT CTTATCATGT
 GACGTAAGAT CAACACCAA CAGGTTTGG TAGTTACATA GAATAGTACA
 4551 CTGTATACCG TCGACCTCTA GCTAGAGCTT GCGTAATCA TGGTCATAGC
 GACATATGGC AGCTGGAGAT CGATCTCGAA CCGCATTAGT ACCAGTATCG
 4601 TGTTTCCGTG GTGAAATGT TATCCGCTCA CAATTCCACA CAACATACGA
 ACAAAGGACA CACTTAAACA ATAGGCGAGT GTTAAGGTGT GTTGTATGCT
 4651 GCCGGAAGCA TAAAGTGTA AGCCTGGGGT GCCTAATGAG TGAGCTAACT
 CGGCCTTCGT ATTTACATT TCGGACCCA CGGATTACTC ACTCGATTGA
 4701 CACATTAATT GCGTTGCGCT CACTGCCCGC TTTCCAGTCG GGAAACCTGT
 GTGTAATTA CGCAACCGCA GTGACGGGCG AAAGGTCAGC CCTTTGGACA
 4751 CGTGCCAGCT GCATTAATGA ATCCGCCAAC GCGCGGGGAG AGGCGGTTTG
 GCACGGTCGA CGTAATTA CT TAGCCGTTG CCGCCCCCTC TCCGCCAAAC
 4801 CGTATTGGGC GCTCTCCGC TTCCTCGCTC ACTGACTCGC TCGCTCGGT
 GCATAACCCG CGAGAAGGCG AAGGAGCGAG TGACTGAGCG ACGCGAGCCA
 4851 CGFTCCGCTG CCGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAATACGGT
 GCAAGCCGAC GCCGCTCGCC ATAGTCGAGT GAGTTTCCGC CATTATGCCA
 4901 TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACCGAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC
 ATAGGTGTCT TAGTCCCTA TTGCGTCTT TCTTGTACAC TCGTTTTCCG
 4951 CAGCAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA
 GTCGTTTTCC GGTCCFTGGC ATTTTTCCGG CGCAACGACC GCAAAAAGGT
 5001 TAGGCTCCCG CCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC TCAAGTCAGA
 ATCCGAGCGG GGGGACTGC TCGTAGTGT TTTAGCTGCG AGTTCACTT
 5051 GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA
 CCACCGCTTT GGGCTGTCTT GATATTCTA TGGTCCGCAA AGGGGGACCT
 5101 AGCTCCCTCG TCGCTCTCC GTTCCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT
 TCGAGGGAGC ACGCGAGAGG ACAAGGCTGG GACGGCGAAT GGCCTATGGA
 5151 GTCCGCCCTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTTCTCAA TGCTCAGCT
 CAGGCGGAAA GAGGAAGCC CTTCGCACCG CGAAAGAGTT ACGAGTGC GA
 5201 GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTT GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG
 CATCCATAGA GTCAGCCAC ATCCAGCAAG CGAGGTTCTGA CCCGACACAC
 5251 CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC GCCTTATCCG GTAACTATCG
 GTGCTTGGGG GGCAAGTCGG GCTGGCGACG CGGAATAGGC CATTGATAGC
 5301 TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA
 AGAACTCAGG TTGGGCCATT CTGTGCTGAA TAGCGGTGAC CGTCGTGCGT
 5351 CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
 GACCAITGTC CTAATCGTCT CGCTCCATAC ATCCGCCACG ATGTCTCAAG
 5401 TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT
 AACTTCACCA CCGGATTGAT GCCGATGTGA TCTTCCTGTC ATAAACCATA
 5451 CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT
 GACGCGAGAC GACTTCGGTC AATGGAAGCC TTTTTCTCAA CCATCGAGAA
 5501 GATCCGGCAA ACAAACCACC GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTGTCGAAG
 CTAGGCCGTT TGTTGGTGG CGACCATCGC CACCAAAAAA ACAAACGTTT
 5551 CAGCAGATTA CGCCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT
 GTCGTCTAAT CGCGCTCTT TTTTCTAGA GTTCTTCTAG GAAACTAGAA

FIG. 3F

8/29

5601 TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AAACTCACGT TAAGGGATTT
 AAGATGCCCC AGACTGCGAG TCACCTTGCT TTTGAGTGCA ATTCCCTAAA
 5651 TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTAA
 ACCAGTACTC TAATAGTTTT TCCTAGAAGT GGATCTAGGA AAATTTAATT
 5701 AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA
 TTTACTTCAA AATTTAGTTA GATTTTCATAT ATACTCATT GAACCAGACT
 5751 CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT
 GTCAATGGTT ACGAATTAGT CACTCCGTGG ATAGAGTCGC TAGACAGATA
 5801 TTCGTTTCATC CATAGTTGCC TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA
 AAGCAAGTAG GTATCAACGG ACTGAGGGGC AGCACATCTA TTGATGCTAT
 5851 CGGGAGGTT TACCATCTGG CCCAGTGTCT GCAATGATAC CGCGAGACCC
 GCCCCTCCGA ATGGTAGACC GGGGTCACGA CGTTACTATG GCGCTCTGGG
 5901 ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG
 TGCGAGTGGC CGAGGTCTAA ATAGTCGTTA TTTGGTCGGT CGGCCTTCCC
 5951 CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCTCCAT CCAGTCTATT
 GGCTCGCGTC TTCACCAGGA CGTTGAAATA GGCGGAGGTA GGTACAGATA
 6001 AATTGTTGCC GGGAAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG
 TTAACAACGG CCCTTCGATC TCATTCATCA AGCGGTCAAT TATCAAACGC
 6051 CAACGTTGTT GCCATTGCTA CAGGCATCGT GGTGTACGC TCGTCTTTG
 GTTGCAACAA CGGTAACGAT GTCCGTAGCA CCACAGTGGC AGCAGCAAAC
 6101 GTATGGCTTC ATTCAGCTCC GGTTCCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA
 CATACCGAAG TAAGTCGAGG CCAAGGGTTG CTAGTTCCGC TCAATGTACT
 6151 TCCCCATGT TGTGCAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT
 AGGGGTACATA ACACGTTTTT TCGCCAATCG AGGAAGCCAG GAGGCTAGCA
 6201 TGTCAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC
 ACAGTCTTCA TTCAACCGGC GTCACAATAG TGAGTACCAA TACCGTCGTG
 6251 TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
 ACGTATTAAG AGAATGACAG TACGGTAGGC ATTCTACGAA AAGACACTGA
 6301 GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCACCGAG
 CCACTCATGA GTTGGTTCAG TAAGACTCTT ATCACATACG CCGCTGGCTC
 6351 TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA TACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA
 AACGAGAACG GGCCGCGATT ATGCCCTATT ATGGCGCGGT GTATCGTCTT
 6401 CTTTAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT CTTGCGGGCG AAAACTCTCA
 GAAATTTTCA CGAGTAGTAA CCTTTTGCAA GAAGCCCCGC TTTTGAGAGT
 6451 AGGACTTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG ATGTAACCCA CTCGTGCACC
 TCCTAGAAATG GCGACAATC TAGGTCAAGC TACATTGGGT GAGCACGTGG
 6501 CAACTGATCT TCAGCATCTT TTTACTTTTAC CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA
 GTTGACTAGA AGTCGTAGAA AATGAAAAGT GTCGCAAAGA CCCACTCGTT
 6551 AAACAGGAAG GCAAAAATGCC GCAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA
 TTTGTCCTTC CGTTTTACGG CGTTTTTCC CTTATTCCCG CTGTGCCTTT
 6601 TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA
 ACAACTTATG AGTATGAGAA GGAAAAAGTT ATAATAACTT CGTAAATAGT
 6651 GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA
 CCCAATAACA GAGTACTCGC CTATGTATAA ACTTACATAA ATCTTTTTAT
 6701 AACRAATAGG GGTTCGCGC ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC
 TTGTTTATCC CCAAGGCGCG TGTAAGGGG CTTTTACGG TGGACTGCAG
 6751 GACGGATCGG GAGATCTGCT AGGTGACCTG AGGCGCGCG GCTTCGAATA
 CTGCCTAGCC CTCTAGACGA TCCACTGGAC TCCGCGCGGC CGAAGCTTAT
 6801 GCCAGAGTAA CCTTTTTTTT TAATTTTATT TTATTTTATT TTTGAGATGG
 CGGTCTCATT GGAAAAAAA ATTAAAAATA AATAAAAATA AAACCTACC
 6851 AGTTTGGCGC CGATCTCCCG ATCCCCTATG GTCGACTCTC AGTACAATCT
 TCAAACCGCG GCTAGAGGGC TAGGGGATAC CAGCTGAGAG TCATGTTAGA
 6901 GCTCTGATGC CGCATAGTTA AGCCAGTATC TGCTCCCTGC TTGTGTGTTG
 CGAGACTACG GCGTATCAAT TCGGTATAG ACGAGGGACG AACACACAAC
 6951 GAGGTCGCTG AGTAGTGCCG GAGCAAAAT TAAGCTACAA CAAGGCAAGG

FIG. 3G

9/29

CTCCAGCGAC TCATCACGGC CTCGTTTTAA ATTCGATGTT GTTCCGTTCC
7001 CTTGACCGAC AATTGCATGA AGAATCTGCT TAGGGTTAGG CGTTTTGCGC
GAACTGGCTG TTAACGTACT TCTTAGACGA ATCCCAATCC GCAAAACGCG
7051 TGCTTCG
ACGAAGC

FIG. 3H

10/29

1 GACGGATCGG GAGATCTGCT AGCCCGGGTG ACCTGAGGCG CGCCGGCTTC
 CTGCCTAGCC CTCTAGACGA TCGGGCCCAC TGGACTCCGC GCGGCCGAAG
 51 GAATAGCCAG AGTAACCTTT TTTTTTAATT TTATTTTATT TTATTTTGA
 CTTATCGGTC TCATTGGAAA AAAAAATTAA AATAAAATAA AATAAAACT
 101 GATGGAGTTT GCGCCGATC TCCCAGATCCC CTATGGTCGA CTCTCAGTAC
 CTACCTCAA CCGCGGCTAG AGGGCTAGGG GATACCAGCT GAGAGTCATG
 151 AATCTGCTCT GATGCCGCAT AGTTAAGCCA GTATCTGCTC CCTGCITGTG
 TTAGACGAGA CTACGGCGTA TCAATTCGGT CATAGACGAG GGACGAACAC
 201 TGTGGAGGT CGCTGAGTAG TGCGCGAGCA AAATTTAAGC TACAACAAGG
 ACAACCTCCA GCGACTCATC ACGCGCTCGT TTTAAATTCG ATGTTGTTCC
 251 CAAGGCTGA CCGACAATTG CATGAAGAAT CTGCTTAGGG TTAGGCGTTT
 GTTCCGAACT GGCTGTTAAC GTACTTCTTA GACGAATCCC AATCCGAAA
 301 TGCGCTGCTT CCGGATGTAC GGGCCAGATA TACGCGTTGA CATTGATTAT
 ACGCGACGAA GCGCTACATG CCCGGTCTAT ATGCGCAACT GTAACATAA
 351 TGACTAGTTA TTAATAGTAA TCAATTACGG GGTCATTAGT TCATAGCCCA
 ACTGATCAAT AATTATCATT AGTTAATGCC CCAGTAATCA AGTATCGGGT
 401 TATATGGAGT TCCGCGTTAC ATAACCTACG GTAAATGGCC CGCCTGGCTG
 ATATACCTCA AGGCGCAATG TATTGAATGC CATTACCAGG GCGGACCGAC
 451 ACCGCCAAC GACCCCCGCC CATTGACGTC AATAATGACG TATGTTCCCA
 TGGCGGGTTG CTGGGGGCGG GTAACCTGCAG TTATTACTGC ATACAAGGGT
 501 TAGTAACGCC AATAGGGACT TTCCATTGAC GTCAATGGGT GGAGTATTTA
 ATCATTGCGG TTATCCCTGA AAGGTAACCTG CAGTTACCCA CCTCATAAAT
 551 CGGTAAACTG CCCACTTGGC AGTACATCAA GTGTATCATA TGCCAAGTAC
 GCCATTGAC GGGTGAACCG TCATGTAGTT CACATAGTAT ACGGTTTAC
 601 GCCCCCTATT GACGTCAATG ACGGTAAATG GCGCGCTGG CATTATGCCC
 CGGGGGATAA CTGCAGTTAC TGCCATTTAC CGGGCGGACC GTAATACGGG
 651 AGTACATGAC CTTATGGGAC TTTCTACTT GGCAGTACAT CTACGTATTA
 TCATGTACTG GAATACCCTG AAAGGATGAA CCGTCATGTA GATGCATAAT
 701 GTCATCGCTA TTACCATGGT GATGCGGTTT TGGCAGTACA TCAATGGGCG
 CAGTAGCGAT AATGGTACCA CTACGCCAAA ACCGTCATGT AGTTACCCGC
 751 TGGATAGCGG TTTGACTCAC GGGGATTTCC AAGTCTCCAC CCCATTGACG
 ACCTATCGCC AAAGTGAAGT CCCCTAAAGG TTCAGAGGTG GGGTAACTGC
 801 TCAATGGGAG TTTGTTTTGG CACCAAATC AACGGGACTT TCCAAAATGT
 AGTTACCCCT AAACAAAACC GTGGTTTTAG TTGCCCTGAA AGGTTTTACA
 851 CGTAACCACT CCGCCCCATT GACGCAAATG GCGGTTAGGC GTGTACGGTG
 GCATTGTTGA GCGGGGTAA CTGCGTTTAC CCGCCATCCG CACATGCCAC
 901 GGAGGTCTAT ATAAGCAGAG CTCTCTGGCT AACTAGAGAA CCCACTGCTT
 CCTCCAGATA TATTCGTCTC GAGAGACCGA TTGATCTCTT GGGTGACGAA
 951 ACTGGCTTAT CGAAATTAAT ACGACTCACT ATAGGGAGAC CCAAGCTTAT
 TGACCGAATA GCTTTAATTA TGCTGAGTGA TATCCCTCTG GGTTCGAATA

Naturlig Ig leder

M E A P A Q

1001 CAACAAGTTT GTACAAAAAA GCAGGCTGGT ACCATGGAAG CCCCAGCTCA
 GTTGTTCAA CATGTTTTTT CGTCCGACCA TGGTACCTTC GGGGTCGAGT

Naturlig Ig lederpeptid

 L L F L L L L W L P D T T G E I V
 1051 GCTTCTCTC CTCTGCTAC TCTGGCTCCC AGATACCACC GGAGAAATG
 CGAAGAGAAG GAGGACGATG AGACCGAGGG TCTATGGTGG CCTCTTTAAC

FIG. 4A

11/29

20H4-9 LC variabel region

 . . L T Q S P A T L S L S P G E R A
 1101 TGTTGACACA GTCTCCAGCC ACCCTGTCTT TGTCTCCAGG GGAAAGAGCC
 ACAACTGTGT CAGAGGTCCG TGGGACAGAA ACAGAGGTCC CCTTTCTCGG
 20H4-9 LC variabel region

CDR 1

 T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
 1151 ACCCTCTCCT GCAGGGCCAG TCAGAGTGTT AGCAGCTACT TAGCCTGGTA
 TGGGAGAGGA CGTCCCGGTC AGTCTCACAA TCGTCGATGA ATCGGACCAT
 20H4-9 LC variabel region

CDR 2

 . Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N
 1201 CCAACAGAAA CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT GATGCATCCA
 GGTTGTCTTT GGACCGGTCC GAGGGTCCGA GGAGTAGATA CTACGTAGGT
 20H4-9 LC variabel region

CDR 2

 . R A T G I P A R F S G S G S G T
 1251 ACAGGGCCAC TGGCATCCCA GCCAGGTTC A GTGGCAGTGG GTCTGGGACA
 TGTCCCGGTG ACCGTAGGGT CGTCCAAGT CACCGTCACC CAGACCCTGT
 20H4-9 LC variabel region

 D F T L T I S S L E P E D F A V Y
 1301 GACTTCACTC TCACCATCAG CAGCCTAGAG CCTGAAGATT TTGCAGTTTA
 CTGAAGTGAG AGTGGTAGTC GTCGGATCTC GGACTTCTAA AACGTCAAAT
 CDR 3

20H4-9 LC variabel region

 . Y C Q Q R S N W P P A L T F G G G
 1351 TTACTGTCAG CAGCGTAGCA ACTGGCCTCC GGCCTCACT TTCGGCGGAG
 AATGACAGTC GTCGCATCGT TGACCGGAGG CCGCGAGTGA AAGCCGCTC
 C-kappa

20H4-9 LC variabel region

 . T K V E I K R T V A A P S V F I
 1401 GGACCAAGGT GGAGATCAA CGTACGGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC
 CCTGGTTCCA CCTCTAGTTT GCATGCCACC GACGTGGTAG ACAGAAGTAG
 C-kappa

 F P P S D E Q L K S G T A S V V C
 1451 TTCCCGCCAT CTGATGAGCA GTTGAAATCT GGAAGTGCCT CTGTTGTGTG
 AAGGGCGGTA GACTACTCGT CACTTTAGA CCTTGACGGA GACAACACAC
 C-kappa

 . L L N N F Y P R E A K V Q W K V D
 1501 CCTGCTGAAT AACTTCTATC CCAGAGAGGC CAAAGTACAG TGAAGGTGG
 GGACGACTTA TTGAAGATAG GGTCTCTCCG GTTTCATGTC ACCTTCCACC

FIG. 4B

12/29

C-kappa

```

-----
  N A L Q S G N S Q E S V T E Q D
1551 ATAAAGCCCT CCAATCGGGT AACTCCCAGG AGAGTGTAC AGAGCAGGAC
      TATTGCGGGA GGTTAGCCCA TTGAGGGTCC TCTCACAGTG TCTCGTCCTG
      C-kappa
-----
  S K D S T Y S L S S T L T L S K A
1601 AGCAAGGACA GCACCTACAG CCTCAGCAGC ACCCTGACGC TGAGCAAAGC
      TCGTTCCTGT CGTGGATGTC GGAGTCGTCTG TGGGACTGCG ACTCGTTTTCG
      C-kappa
-----
  D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L
1651 AGACTACGAG AAACACAAAG TCTACGCCTG CGAAGTCACC CATCAGGGCC
      TCTGATGCTC TTTGTGTTTC AGATGCGGAC GCTTCAGTGG GTAGTCCCGG
      C-kappa
-----
  S S P V T K S F N R G E C
1701 TGAGCTCGCC CGTCACAAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGTG TTAGACCCAG
      ACTCGAGCGG GCAGTGTTC TCGAAGTGT CCCCTCTCAC AATCTGGGTC
1751 CTTTCTTGTA CAAAGTGGTT GATCTAGAGG GCCCTATTCT ATAGTGTAC
      GAAAGAACAT GTTTCACCAA CTAGATCTCC CGGGATAAGA TATCACAGTG
1801 CTAAATGCTA GAGCTCGCTG ATCAGCCTCG ACTGTGCCTT CTAGTTGCCA
      GATTTACGAT CTCGAGCGAC TAGTCGGAGC TGACACGGAA GATCAACGGT
1851 GCCATCTGTT GTTTGCCCT CCCCCGTGCC TTCCTTGACC CTGGAAGGTG
      CGGTAGACAA CAAACGGGGA GGGGGCACGG AAGGAACTGG GACCTTCCAC
1901 CCACTCCAC TGTCCTTCC TAATAAAATG AGGAAATTGC ATCGCATTGT
      GGTGAGGGTG ACAGGAAAGG ATTATTTTAC TCCTTTAACG TAGCGTAACA
1951 CTGAGTAGGT GTCATTCTAT TCTGGGGGGT GGGGTGGGGC AGGACAGCAA
      GACTCATCCA CAGTAAGATA AGACCCCCCA CCCACCCCG TCCTGTCTGTT
2001 GGGGGAGGAT TGGGAAGACA ATAGCAGGCA TGCTGGGGAT GCGGTGGGCT
      CCCCCTCCTA ACCCTTCTGT TATCGTCCGT ACGACCCCTA CGCCACCCGA
2051 CTATGGCTTC TGAGGCGGAA AGAACCAGCT GGGGCTCTAG GGGGTATCCC
      GATACCGAAG ACTCCGCCCT TCTTGGTGA CCCCAGATC CCCCATAGGG
2101 CACGCGCCCT GTAGCGCGCT ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG TGGTTACGCG
      GTGCGCGGGA CATCGCGCG TAATTGCGCG CGCCACACC ACCAATGCGC
2151 CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT CCTTTCGCTT
      GTCGCACTGG CGATGTGAAC GGTCGCGGGA TCGCGGGCGA GGAAAGCGAA
2201 TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCGG GGCCTCTCAA AAAAGGGAAA
      AGAAGGGAAG GAAAGAGCGG TGCAAGCGGC CCGGAGAGTT TTTTCCCTTT
2251 AAAAGCATGC ATCTCAATTA GTCAGCAACC ATAGTCCCGC CCCTAACTCC
      TTTTTCGTACG TAGAGTTAAT CAGTCGTGG TATCAGGGCG GGGATTGAGG
2301 GCCCATCCCG CCCCTAATC CGCCCAGTTC CGCCATTCT CCGCCCCATG
      CCGGTAGGGC GGGGATTGAG GCGGGTCAAG GCGGGTAAGA GCGGGGTAC
2351 GCTGACTAAT TTTTTTTATT TATGCAGAGG CCGAGGCCGC CTCGGCCTCT
      CGACTGATTA AAAAAATAA ATACGTCTCC GGCTCCGGCG GAGCCGAGA
2401 GAGCTATTCC AGAAGTAGTG AGGAGGCTTT TTTGGAGGCC TAGGCTTTG
      CTCGATAAGG TCTTCATCAC TCCTCCGAAA AAACCTCCGG ATCCGAAAAC
2451 CAAAAAGCTT GGGGGGACAG CTCAGGGCTG CGATTTCGCG CCAAACCTGA
      GTTTTTCGAA CCCCCGTGTC GAGTCCCGAC GCTAAAAGCGC GGTTTGAACT
2501 CGGCAATCCT AGCGTGAAGG CTGGTAGGAT TTTATCCCCG CTGCCATCAT
      GCCGTTAGGA TCGCACTTCC GACCATCCTA AAATAGGGGC GACGGTAGTA
2551 GGTTGACCA TTGAACTGCA TCGTCGCCGT GTCCCAAAT ATGGGGATTG
      CCAAGCTGGT AACTTGACGT AGCAGCGGCA CAGGGTTTTA TACCCTAAC

```

FIG. 4C

13/29

2601 GCAAGAACGG AGACCTACCC TGGCCTCCGC TCAGGAACGA GTTCAAGTAC
 CGTTCCTGGC TCTGGATGGG ACCGGAGGCG AGTCCTTGCT CAAGTTCATG
 2651 TTCCAAAGAA TGACCACAAC CTCTTCAGTG GAAGGTAAAC AGAATCTGGT
 AAGGTTTCTT ACTGGTGTG GAGAAGTCAC CTTCCATTTG TCTTAGACCA
 2701 GATTATGGGT AGGAAAACCT GGTTCCTCCAT TCCTGAGAAG AATCGACCTT
 CTAATACCCA TCCTTTTGGA CCAAGAGGTA AGGACTCTTC TTAGCTGGAA
 2751 TAAAGGACAG AATTAATATA GTTCTCAGTA GAGAACTCAA AGAACCACCA
 ATTTCCGTGC TTAATTATAT CAAGAGTCAT CTCTTGAGTT TCTTGGTGGT
 2801 CGAGGAGCTC ATTTCTTGC CAAAAGTTG GATGATGCCT TAAGACTTAT
 GCTCCTCGAG TAAAAGAACG GTTTTCAAAC CTACTACGGA ATTCTGAATA
 2851 TGAACAACCG GAATTGGCAA GTAAAGTAGA CATGGTTTGG ATAGTCGGAG
 ACTTGTGGC CTTAACCGTT CATTTCATCT GTACCAAACC TATCAGCTC
 2901 GCAGTTCGT TTACCAGGAA GCCATGAATC AACCAGGCCA CCTCAGACTC
 CGTCAAGACA AATGGTCCTT CGGTACTTAG TTGGTCCGGT GGAGTCTGAG
 2951 TTTGTGACAA GGATCATGCA GGAATTTGAA AGTGACACGT TTTTCCCAGA
 AAACACTGTT CCTAGTACGT CCTTAAACTT TCACTGTGCA AAAAGGGTCT
 3001 AATTGATTTG GGGAAATATA AACTTCTCCC AGAATACCCA GCGTCTCTCT
 TTAACATAAC CCCTTTATAT TTGAAGAGGG TCTTATGGGT CCGCAGGAGA
 3051 CTGAGGTCCA GGAGGAAAAA GGCATCAAGT ATAAGTTTGA AGTCTACGAG
 GACTCCAGGT CCTCCTTTTT CCGTAGTTCA TATTCAAAC TCAGATGCTC
 3101 AAGAAAGACT AACAGGAAGA TGCTTCAAG TTCTCTGCTC CCCTCCTAAA
 TTCTTTCTGA TTGTCTTCT ACGAAAGTTC AAGAGACGAG GGGAGGATTT
 3151 GCTATGCATT TTTATAAGAC CATGGGACTT TTGTGGCTT TAGATCTGAT
 CGTACGTAA AAATATCTG GTACCCGTAA AACGACCGAA ATCTAGACTA
 3201 CTTTGTGAAG GAACCTFACT TCTGTGGTGT GACATAATTG GACAACTAC
 GAAACACTTC CTGGGAATGA AGACACCACA CTGTATTAAC CTGTTTGATG
 3251 CTACAGAGAT TTAAAGCTCT AAGGTAAATA TAAAATTTTT AAGTGTATAA
 GATGTCTCTA AATTCGAGA TTCCATTTAT ATTTTAAAAA TTCACATATT
 3301 TGTGTTAAAC TACTGATTCT AATTGTTTGT GTATTTTAGA TTCCAACCTA
 ACACAATTTG ATGACTAAGA TTAACAAACA CATAAAATCT AAGGTTGGAT
 3351 TGGAACGTAT GAATGGGAGC AGTGGTGGAA TGCCTTTAAT GAGGAAAACC
 ACCTTGACTA CTTACCCCTG TCACCACCTT ACGGAAATTA CTCCTTTTGG
 3401 TGTTTTGCTC AGAAGAAATG CCATCTAGTG ATGATGAGGC TACTGCTGAC
 ACAAACGAG TCTTCTTTAC GGTAGATCAC TACTACTCCG ATGACGACTG
 3451 TCTCAACATT CTACTCCTCC AAAAAAGAAG AGAAAGGTAG AAGACCCCAA
 AGCTTGTAA GATGAGGAGG TTTTCTTCTC TCTTCCATC TTCTGGGGTT
 3501 GGACTTTCCT TCAGAATTGC TAAGTTTTTT GAGTCATGCT GTGTTTAGTA
 CCTGAAAGGA AGTCTTAACG ATTCAAAAAA CTCAGTACGA CACAAATCAT
 3551 ATAGAACTCT TGCTTGCTTT GCTATTTACA CCACAAAGGA AAAAGCTGCA
 TATCTTGAGA ACGAACGAAA CGATAAATGT GGTGTTTCCT TTTTCGACGT
 3601 CTGCTATACA AGAAAATTAT GGAAAAATAT TCTGTAACCT TTATAAGTAG
 GACGATATGT TCTTTAATA CCTTTTATA AGACATTGGA AATATTCATC
 3651 GCATAACAGT TATAATCATA ACATACTGTT TTTTCTTACT CCACACAGGC
 CGTATTGTCA ATATTAGTAT TGTATGACAA AAAAGAATGA GGTGTGTCCG
 3701 ATAGAGTGTC TGCTATTAAT AACTATGCTC AAAAATTGTG TACCTTTAGC
 TATCTCACAG ACGATAATTA TTGATACGAG TTTTAAACAC ATGGAAATCG
 3751 TTTTAAATTT GTAAAGGGGT TAATAAGGAA TATTTGATGT ATAGTGCTT
 AAAAATTAAT CATTCCCCA ATTATTCCTT ATAACTACA TATCAGGAA
 3801 GACTAGAGAT CGATCATAAT CAGCCATACC ACATTTGTAG AGGTTTTACT
 CTGATCTCTA GCTAGTATTA GTCGGTATGG TGTAACATC TCCAAAATGA
 3851 TGCTTTAAAA AACCTCCCAC ACCTCCCCCT GAACCTGAAA CATAAAATGA
 ACGAAATTTT TTGGAGGGTG TGGAGGGGGA CTTGGACTTT GTATTTTACT
 3901 ATGCAATTGT TGTGTTAAC TTGTTTATTG CAGCTTATAA TGGTTACAAA
 TACGTTAACA ACAACAATTG AACAAATAAC GTCGAATATT ACCAATGTTT

FIG. 4D

14/29

3951 TAAAGCAATA GCATCACAAA TTTCACAAAT AAAGCATTTT TTTCAGTACA
 ATTTTCGTTAT CGTAGTGTTT AAAGTGTTTA TTTCGTAAAA AAAGTGACGT
 4001 TTCTAGTTGT GGTTTGTCCA AACTCATCAA TGTATCTTAT CATGTCTGGA
 AAGATCAACA CCAAACAGGT TTGAGTAGTT ACATAGAATA GTACAGACCT
 4051 TCGGCTGGAT GATCCTCCAG CGCGGGGATC TCATGCTGGA GTTCTTCGCC
 AGCCGACCTA CTAGGAGGTC GCGCCCTAG AGTACGACCT CAAGAAGCGG
 4101 CACCCCAACT TGTTTATTGC AGCTTATAAT GGTACAAAAT AAAGCAATAG
 GTGGGGTTGA ACAAATAACG TCGAATATTA CCAATGTTTA TTTCGTTATC
 4151 CATCACAAAT TTCACAAATA AAGCATTTT TTCACTGCAT TCTAGTTGTG
 GTAGTGTTTA AAGTGTTTAT TTTCGTAAAA AAGTGACGTA AGATCAACAC
 4201 GTTTGTCCAA ACTCATCAAT GTATCTTATC ATGTCTGTAT ACCGTCGACC
 CAAACAGGTT TGAGTAGTTA CATAGAATAG TACAGACATA TGGCAGCTGG
 4251 TCTAGCTAGA GCTTGCGGTA ATCATGGTCA TAGCTGTTTC CTGTGTGAAA
 AGATCGATCT CGAACCGCAT TAGTACCAGT ATCGACAAAG GACACACTTT
 4301 TTGTTATCCG CTCACAATTC CACACAACAT ACGAGCCGGA AGCATAAAGT
 AACAAATAGGC GAGTGTTAAG GTGTGTTGTA TGCTCGGCC TCGTATTTCA
 4351 GTAAAGCCTG GGGTGCCTAA TGAGTGAGCT AACTCACATT AATTGCGTTG
 CATTTCGGAC CCCACGGATT ACTCACTCGA TTGAGTGTA TTAACGCAAC
 4401 CGCTCACTGC CCGCTTTCCA GTCCGGAAAC CTGTCTGACC AGCTGCATTA
 GCGAGTGACG GCGGAAAGGT CAGCCCTTTG GACAGCACGG TCGACGTAAT
 4451 ATGAATCGGC CAACGCGCGG GGAGAGGCGG TTGCGTATT GGGCGCTCTT
 TACTTAGCCG GTTGCGCGCC CCTCTCCGCC AAACGCATAA CCCGCGAGAA
 4501 CCGCTTCCTC GCTCACTGAC TCGCTGCGCT CCGTCTGTTG GCTGCGGCGA
 GCGGAGGAG CGAGTGACTG AGCGACGCGA GCCAGCAAG CGACGCGCT
 4551 GCGGTATCAG CTCACTCAA GCGCGTAATA CGGTTATCCA CAGAATCAGG
 CGCCATAGTC GAGTGAGTTT CCGCCATTAT GCCAATAGGT GTCTTAGTCC
 4601 GGATAACGCA GGAAAGAACA TGTGAGCAA AGGCCAGCAA AAGGCCAGGA
 CCTATTGCGT CCTTTCTTGT AACTCTGTTT TCCGGTCTGT TTCGGTCTCT
 4651 ACCGTAAAAA GCGCGCGTTG CTGGCGTTTT TCCATAGGCT CCGCCCCCT
 TGGCATTTTT CCGCGCAAC GACCGCAAAA AGGTATCCGA GCGGGGGGA
 4701 GACGAGCATC AAAAAATCG ACGCTCAAGT CAGAGGTGGC GAAACCCGAC
 CTGCTCGTAG TGTTTTTAGC TGCGAGTTCA GTCTCCACCG CTTTGGGCTG
 4751 AGGACTATAA AGATACCAGG CGTTTCCCCC TGGAAGCTCC CTCGTGCGCT
 TCCTGATATT TCTATGGTCC GCAAAGGGGG ACCTTCGAGG GAGCACGCGA
 4801 CTCCTGTTCC GACCTGCGG CTTACCGGAT ACCTGTCCGC CTTTCTCCCT
 GAGCAAGAG CTGGGACGGC GAATGGCCTA TGGACAGGCG GAAAGAGGA
 4851 TCGGGAAGCG TGGCGCTTTC TCATAGCTCA CGCTGTAGGT ATCTCAGTTC
 AGCCCTTCGC ACCGCGAAAG AGTATCGAGT GCGACATCCA TAGAGTCAAG
 4901 GGTGTAGGTC GTTCGCTCCA AGCTGGGCTG TGTGCACGAA CCCCCGTTT
 CCACATCCAG CAAGCGAGGT TCGACCCGAC ACACGTGCTT GGGGGGCAAG
 4951 AGCCCGACCG CTGCGCCTTA TCCGGTAACT ATCGTCTTGA GTCCAACCCG
 TCGGGCTGGC GACGCGGAAT AGGCCATTGA TAGCAGAACT CAGGTTGGGC
 5001 GTAAGACAG ACATTATCGCC ACTGGCAGCA GCCACTGGTA ACAGGATTAG
 CATTCTGTGC TGAATAGCGG TGACCGTCTG CCGTGACCAT TGTCTTAATC
 5051 CAGAGCGAGG TATGTAGGCG GTGCTACAGA GTTCTTGAAG TGGTGGCCTA
 GTCTCGCTCC ATACATCCGC CACGATGTCT CAAGAACTTC ACCACCGGAT
 5101 ACTACGGCTA CACTAGAAGG AACAGTATTT GGTATCTGCG CTCTGCTGAA
 TGATGCCGAT GTGATCTTCC TTGTCAATAA CCATAGACGC GAGACGACTT
 5151 GCCAGTTACC TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAAACAAA
 CGGTCAATGG AAGCCTTTTT CTCAACCATC GAGAACTAGG CCGTTTGTTC
 5201 CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTGTTT GCAAGCAGCA GATTACGCGC
 GGTGGCGACC ATCGCCACCA AAAAAACAAA CGTTCGTCGT CTAATGCGCG
 5251 AGAAAAAAG GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA
 TCTTTTTTTC CTAGAGTTCT TCTAGGAAAC TAGAAAAGAT GCCCCAGACT

FIG. 4E

15/29

5301 CGCTCAGTGG AACGAAAAC T CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT
 GCGAGTCACC TTGCTTTTGA GTGCAATTCC CTAAAACCAG TACTCTAATA
 5351 CAAAAAGGAT CTTACCTAG ATCCTTTTAA ATTA AAAATG AAGTTTTAAA
 GTTTTTCCCTA GAAGTGGATC TAGGAAAATT TAATTTTAC TTCAAAATTT
 5401 TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT ACCAATGCTT
 AGTTAGATTT CATATATACT CATTTGAACC AGACTGTCAA TGGTTACGAA
 5451 AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCTG TCATCCATAG
 TTAGTCACTC CGTGGATAGA GTCGCTAGAC AGATAAAGCA AGTAGGTATC
 5501 TTGCCTGACT CCCCCTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA
 AACGGAGTA GGGGCAGCAC ATCTATTGAT GCTATGCCCT CCCGAATGGT
 5551 TCTGGCCCCA GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCAGCT CACCGGTCC
 AGACCGGGGT CACGACGTTA CTATGGCGCT CTGGGTGCGA GTGGCCGAGG
 5601 AGATTTATCA GCAATAAACC AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG
 TCTAAATAGT CGTTATTTGG TCGGTCGGCC TTCCCGGCTC GCGTCTTAC
 5651 GTCCTGCAAC TTTATCCGCC FCCATCCAGT CTATTAATTG TTGCCGGGAA
 CAGGACGTTG AAATAGGCGG AGGTAGGTCA GATAATTAAC AACGGCCCTT
 5701 GCTAGAGTAA GTAGTTCGCC AGTTAATAGT TTGCGCAACG TTGTTGCCAT
 CGATCTCATT CATCAAGCGG TCAATTATCA AACCGGTGC AACACGGTA
 5751 TGCTACAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA
 ACGATGTCCG TAGCACCACA GTGCGAGCAG CAAACCATAC CGAAGTAAGT
 5801 GCTCCGGTTC CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC
 CGAGGCCAAG GGTTCGTAGT TCCGCTCAAT GTACTAGGGG GTACAACACG
 5851 AAAAAAGCGG TTAGCTCCTT CGSTCCTCCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT
 TTTTTTCGCC AATCGAGGAA GCCAGGAGGC TAGCAACAGT CTTCAATCAA
 5901 GGCCGCAGTG TTATCACTCA TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA
 CCGGCGTCAC AATAGTGAAT ACCAATACCG TCGTGACGTA TTAAGAGAAT
 5951 CTGTCAATGC ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG TGACTGGTGA GTACTCAACC
 GACAGTACGG TAGGCATTCT ACGAAAAGAC ACTGACCACT CATGAGTTGG
 6001 AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT CTTGCCCGGC
 TTCAGTAAGA CTCTTATCAC ATACGCCGCT GGCTCAACGA GAACGGGCCG
 6051 GTCAATACGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA
 CAGTTATGCC CTATTATGGC GCGGTGTATC GTCTTGAAAT TTTACAGAGT
 6101 TCATTGGAAA ACGTTCCTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG
 AGTAACTTTT TGCAAGAAGC CCCGCTTTTG AGAGTTCCTA GAATGGCGAC
 6151 TTGAGATCCA GTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAAC TATCTTCAGC
 AACTCTAGGT CAAGCTACAT TGGGTGAGCA CGTGGGTGA CTAGAAGTCG
 6201 ATCTTTTACT TTCACCAGCG TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA
 TAGAAAATGA AAGTGGTCGC AAAGACCCAC TCGTTTTTGT CCTTCCGTTT
 6251 ATGCCGCAAA AAAGGGAATA AGGGCGACAC GGAAATGTTG AATACTCATA
 TACGGCGTTT TTTCCCTTAT TCCCGCTGTG CCTTTACAAC TTATGAGTAT
 6301 CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT ATTGTCTCAT
 GAGAAGGAAA AAGTTATAAT AACTTCGTAA ATAGTCCCAA TAACAGAGTA
 6351 GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTT
 CTCGCCTATG TATAA ACTTA CATAAATCTT TTTATTTGTT TATCCCCAAG
 6401 CGCGCACATT TCCCCGAAA GTGCCACCTG ACGTC
 GCGCGTGTA AGGGGCTTTT CACGGTGGAC TGCAG

FIG. 4F

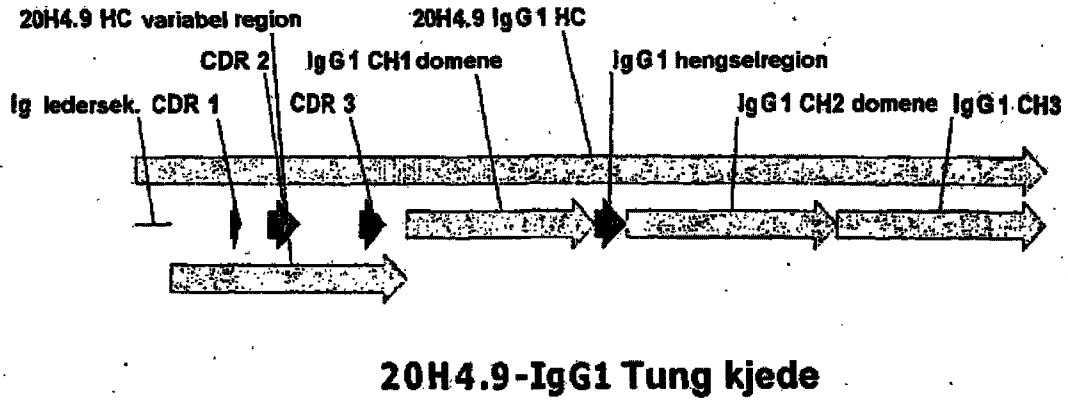


FIG. 5

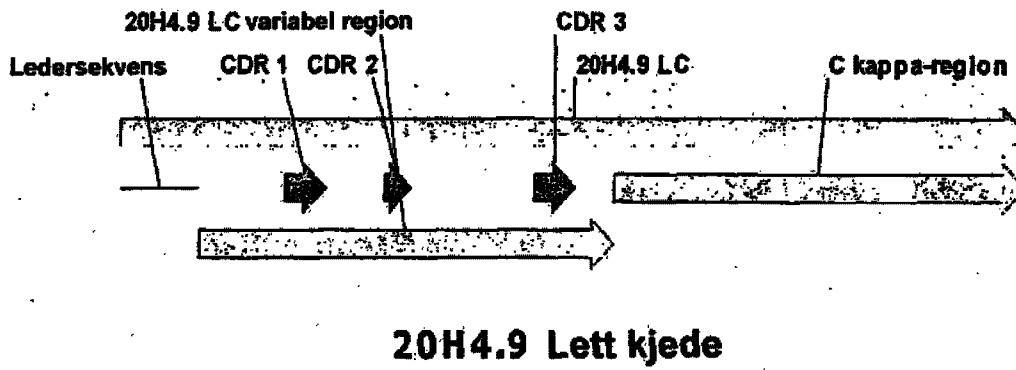


FIG. 6

17/29

naturlig Ig lederpeptid

 M K H L W F F L L L V A A P R W V
 1 ATGAAACACC TGTGGTTCCTT CCTCCTCCTG GTGGCAGCTC CCAGATGGGT
 TACTTTGTGG ACACCAAGAA GGAGGAGGAC CACCGTCGAG GGTCTACCCA

20H4.9 HC variabel region

 L S Q V Q L Q Q W G A G L L K P S
 51 CCTGTCCCAG GTGCAACTAC AGCAGTGGGG CGCAGGACTG TTGAAGCCTT
 GGACAGGGTC CACGTTGATG TCGTCACCCC GCGTCCTGAC AACTTCGGAA
 CDR 1

20H4.9 HC variabel region

 E T L S L T C A V Y G G S F S G
 101 CGGAGACCCT GTCCCTCACC TGGCTGTCT ATGGTGGGTC CTTCAGTGGT
 GCCTCTGGGA CAGGGAGTGG ACGCGACAGA TACCACCCAG GAAGTCACCA
 CDR 1

20H4.9 HC variabel region

 Y Y W S W I R Q S P E K G L E W I
 151 TACTACTGGA GCTGGATACG CCAGTCCCA GAGAAGGGGC TGGAGTGGAT
 ATGATGACCT CGACCTATGC GGTCCAGGGT CTCTTCCCCG ACCTCACCTA
 CDR 2

20H4.9 HC variabel region

 G E I N H G G Y V T Y N P S L E S
 201 TGGGAAATC AATCATGGTG GATACGTAC CTACAATCCG TCCCTCGAGA
 ACCCCTTTAG TTAGTACCAC CTATGCAGTG GATGTTAGGC AGGGAGCTCT
 CDR 2

20H4.9 HC variabel region

 R V T I S V D T S K N Q F S L K
 251 GTCGAGTCAC CATATCAGTA GACACGTCCA AGAACCAGTT CTCCCTGAAG
 CAGCTCAGTG GTATAGTCAT CTGTGCAGGT TCTTGGTCAA GAGGGACTTC
 CDR 3

20H4.9 HC variabel region

 L S S V T A A D T A V Y Y C A R D
 301 CTGAGCTCTG TGACCGCCGC GGACACGGCT GTATATTACT GTGCGAGGGA
 GACTCGAGAC ACTGGCGGCG CCTGTGCCGA CATATAATGA CACGCTCCCT
 CDR 3

20H4.9 HC variabel region

 Y G P G N Y D W Y F D L W G R G T
 351 CTATGGTCCG GGGAAATTATG ACTGGTACTT CGATCTCTGG GGCCGTGGCA
 GATACCAGGC CCCTTAATAC TGACCATGAA GCTAGAGACC CCGGCACCGT

FIG. 7A

18/29

IgG1 CH1 domene

20H4.9 HC variabel region

401 · L V T V S S A S T K G P S V F P
 CCCTGGTCAC TGTCTCCTCA GCCTCCACCA AGGGCCCATC GTCTTCCCC
 GGGACCAGTG ACAGAGGAGT CGGAGGTGGT TCCCGGGTAG CCAGAAGGGG
 IgG1 CH1 domene

451 L A P S S K S T S G G T A A L G C
 CTGGCACCCT CCTCCAAGAG CACCTCTGGG GGCACAGCGG CCTGGGCTG
 GACCGTGGGA GGAGGTTCTC GTGGAGACCC CCGTGTGCGC GGGACCCGAC
 IgG1 CH1 domene

501 · L V K D Y F P E P V T V S W N S G
 CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTGCG TGGAActCAG
 GGACCAGTTC CTGATGAAGG GGCTTGGCCA CTGCCACAGC ACCTTGAGTC
 IgG1 CH1 domene

551 · A L T S G V H T F P A V L Q S S
 GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCTT ACAGTCTCA
 CGCGGGACTG GTCGCCGCAC GTGTGGAAGG GCCGACAGGA TGTCAGGAGT
 IgG1 CH1 domene

601 G L Y S L S S V V T V P S S S L G
 GGACTCTACT CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG
 CCTGAGATGA GGGAGTCGTC GCACCACTGG CACGGGAGGT CGTCGAACCC
 IgG1 CH1 domene

651 · T Q T Y I C N V N H K P S N T K V
 CACCCAGACC TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG
 GTGGGTCTGG ATGTAGACGT TGCACCTAGT GTTCGGGTCG TTGTGGTTCC
 IgG1 CH1 domain

IgG1 hengselregion

701 · D K R V E P K S C D K T H T C P
 TGGACAAGAG AGTTGAGCCC AAATCTTG TG ACAAActCA CACATGCCCA
 ACCTGTTCTC TCAACTCGGG TTTAGAACAC TGTTTTGAGT GTGTACGGGT
 IgG1 CH2 domene

IgG1 hengselregion

751 P C P A P E L L G G P S V F L F P
 CCGTGCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC
 GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCTT GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG
 IgG1 CH2 domene

801 · P K P K D T L M I S R T P E V T C
 CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT
 GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA

FIG. 7B

19/29

IgG1 CH2 domene

851 · V V V D V S H E D P E V K F N W
 GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG
 CGCACCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG GACTCCAGTT CAAGTTGACC
 IgG1 CH2 domene

901 Y V D G V E V H N A K T K P R E E
 TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA
 ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT
 IgG1 CH2 domene

951 · Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q
 GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC
 CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC GCAGGAGTGG CAGGACGTGG
 IgG1 CH2 domene

1001 · D W L N G K E Y K C K V S N K A
 AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC
 TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA CGTTCCAGAG GTTGTTCGG
 IgG1 CH3 domene

IgG1 CH2 domene

1051 L P A P I E K T I S K A K G Q P R
 CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG
 GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG TTTCCGGTTTC CCGTCGGGGC
 IgG1 CH3 domene

1101 · E P Q V Y T L P P S R D E L T K N
 AGAACCACAG GTGTACACC TGCCCCATC CCGGGATGAG CTGACCAAGA
 TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG GGCCCTACTC GACTGGTTCT
 IgG1 CH3 domene

1151 · Q V S L T C L V K G F Y P S D I
 ACCAGTCCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC
 TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC CGAAGATAGG GTCGCTGTAG
 IgG1 CH3 domene

1201 A V E W E S N G Q P E N N Y K T T
 GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC TACAAGACCAC
 CGGCACCTCA CCTCTCGTT ACCCGTCGGC CTCTTGTTGA TGTTCTGGTG
 IgG1 CH3 domene

1251 · P P V L D S D G S F F L Y S K L T
 GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTAC AGCAAGCTCA
 CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA GAAGGAGATG TCGTTCGAGT
 IgG1 CH3 domene

1301 · V D K S R W Q Q G N V F S C S V
 CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG
 GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT TGCAGAAGAG TACGAGGCAC

FIG. 7C

20/29

IgG1 CH3 domene

```
-----  
M H E A L H N H Y T Q K S L S L S  
1351 ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC  
TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC GTCTTCTCGG AGAGGGACAG  
IgG1 CH3 domene  
-----  
P G K  
1401 CCCGGGTAAA TGA  
GGGCCCATTT ACT
```

FIG. 7D

21/29

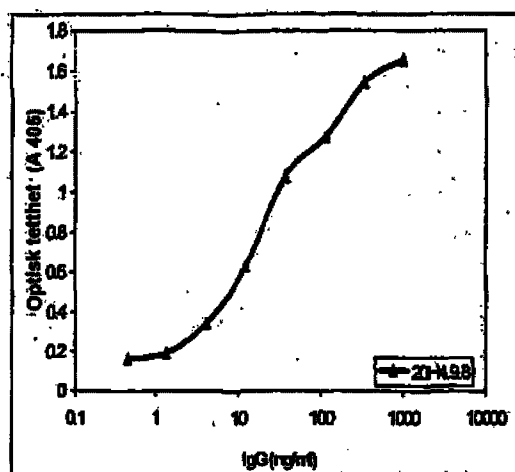


FIG. 8A

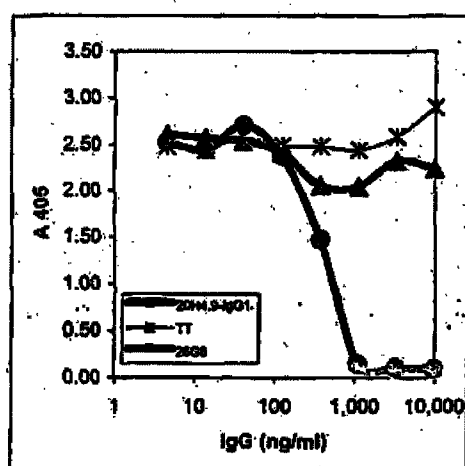


FIG. 8B

22/29

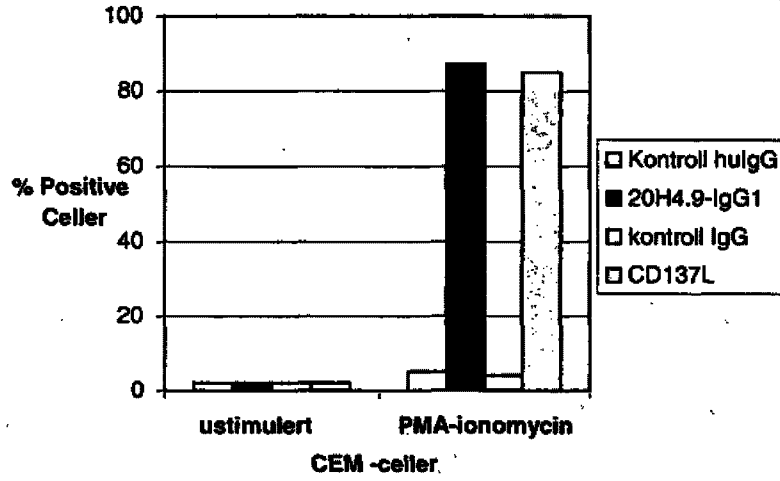


FIG. 9A

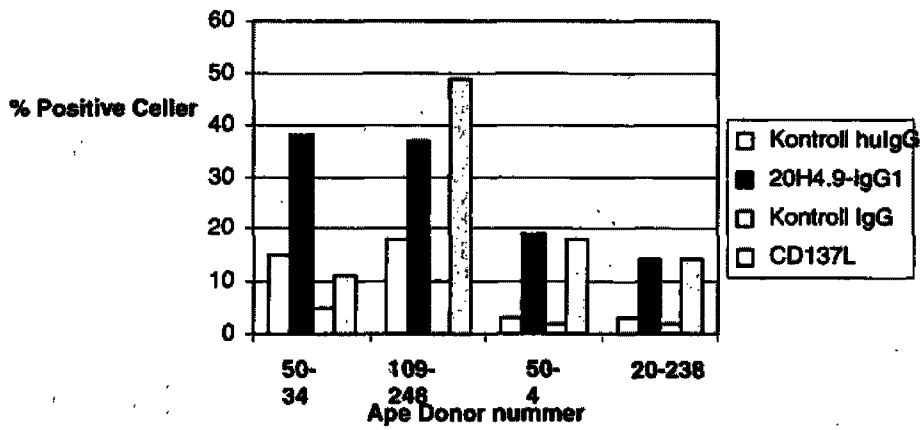


FIG. 9B

23/29

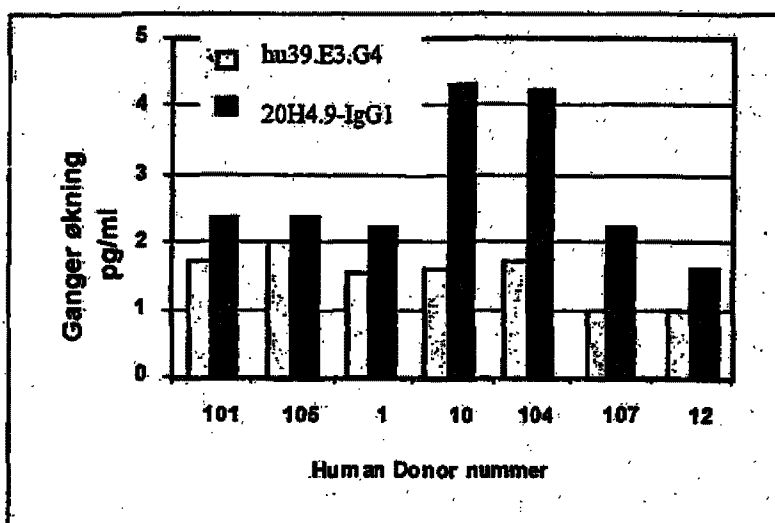


FIG. 10A

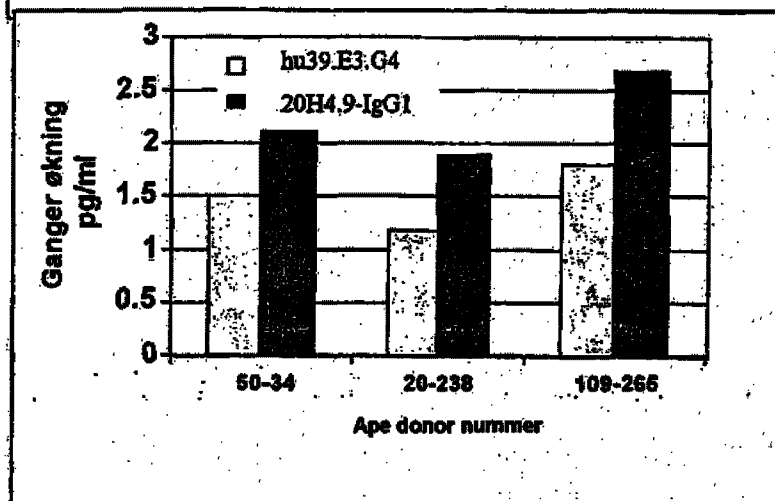


FIG. 10B

24/29

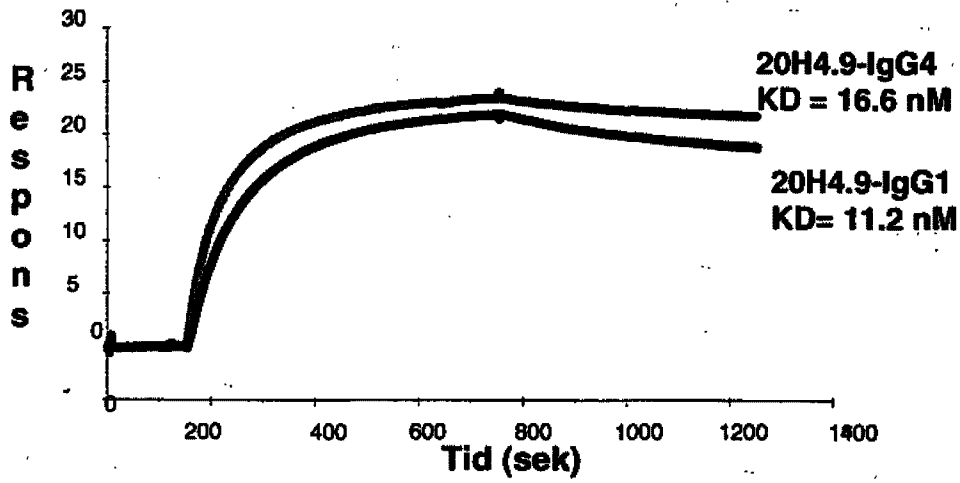


FIG. 11

25/29

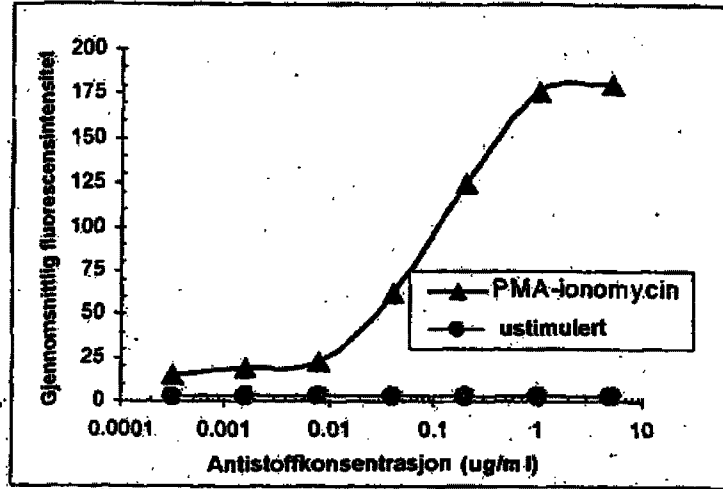


FIG. 12

26/29

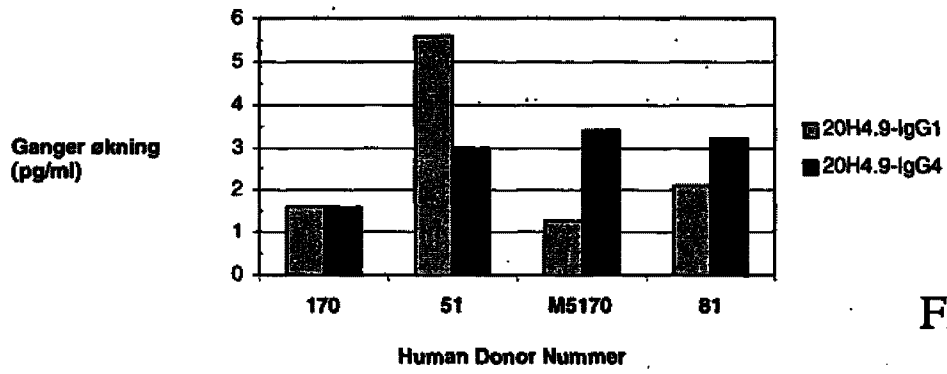


FIG. 13A

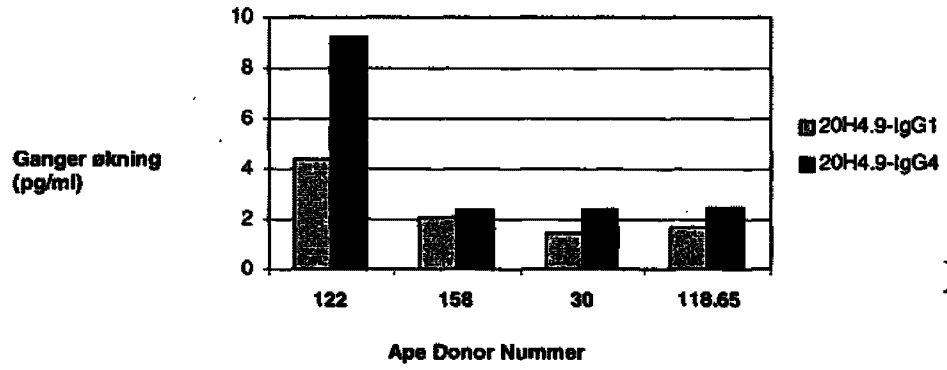


FIG. 13B

27/29

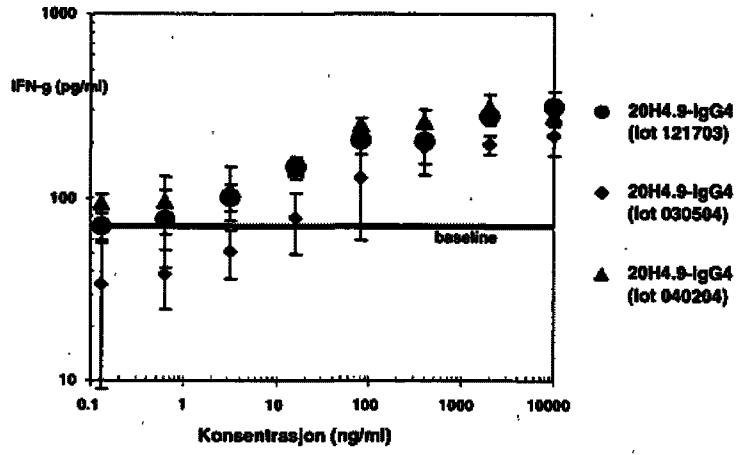


FIG. 14A

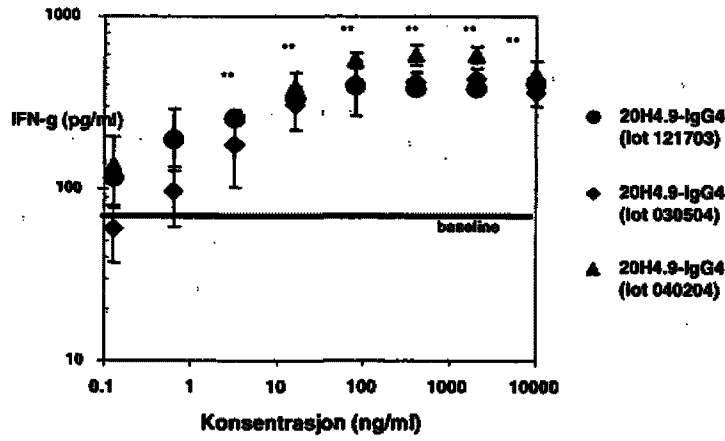


FIG. 14B

28/29

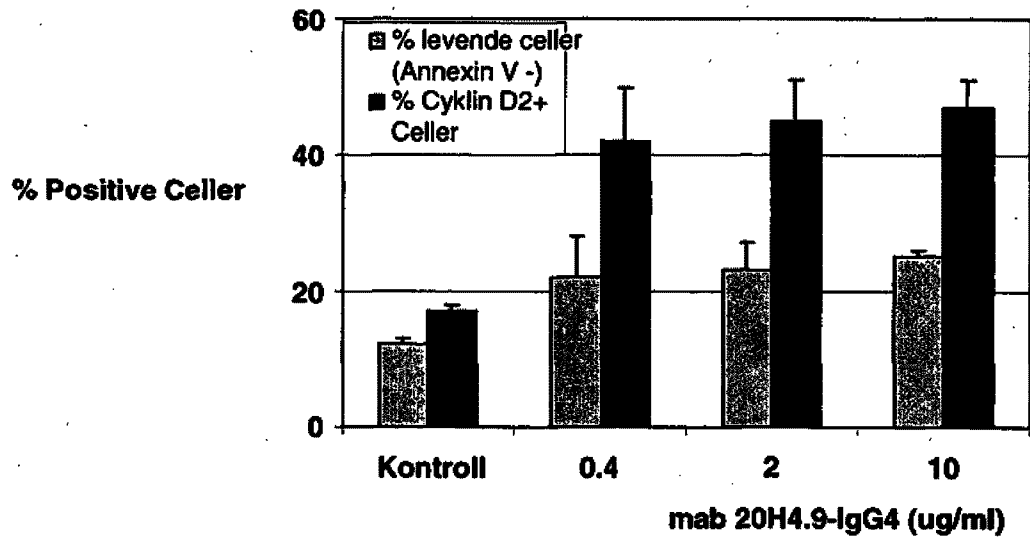


FIG. 15

FIG. 16A

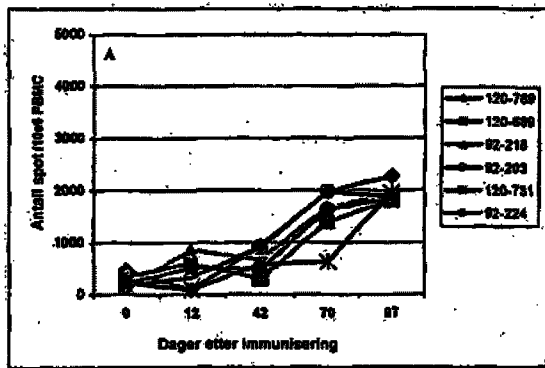


FIG. 16B

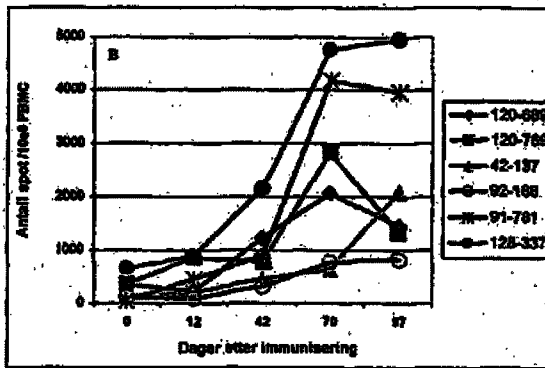


FIG. 16C

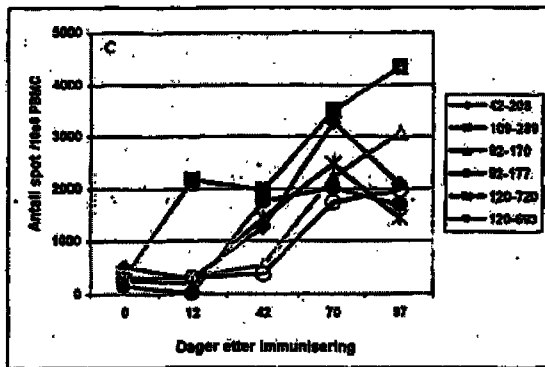


FIG. 16D

