



(12) **PATENT**

(11) **341921**

(13) **B1**

NORGE

(19) NO

(51) Int Cl.

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20084650	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2007.05.23 PCT/EP2007/55029
(22)	Inng.dag	2008.11.05	(85)	Videreføringsdag	2008.11.05
(24)	Løpedag	2007.05.23	(30)	Prioritet	2006.05.25, GB, 0610438.4 2006.06.05, GB, 0611046.4
(41)	Alm.tilgj	2008.12.19			
(45)	Meddelt	2018.02.19			
(73)	Innehaver	Glaxo Group Limited, 980 Great West Road, GB-TW89GS BRENTFORD, MIDDLESEX, Storbritannia Jonathan Henry Ellis, c/o GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, GB-SG12NY STEVENAGE, HERTFORDSHIRE, Storbritannia Paul A Hamblin, c/o GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, GB-SG12NY STEVENAGE, HERTFORDSHIRE, Storbritannia Volker Germaschewski, c/o GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, GB-SG12NY STEVENAGE, HERTFORDSHIRE, Storbritannia Ian Kirby, c/o GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, GB-SG12NY STEVENAGE, HERTFORDSHIRE, Storbritannia			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig	BRYN AARFLOT AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Humanisert anti-interleukin-18 antistoff og dets anvendelse, farmasøytisk sammensetning, polynukleotid, vektor, vertscelle, samt fremgangsmåte for fremstilling av et antistoff.			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 00/56771 A1			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse beskriver humaniserte anti-IL-18 antistoffer, fremgangsmåter for fremstilling og preparater for behandling med nevnte antistoffer. Ytterligere beskrevet er screeningsmetoder ved anvendelse av for eksempel overflate plasmon resonans for å identifisere antistoffer med terapeutisk potensiale.

1. Oppfinnelsens område

Foreliggende oppfinnelse angår generelt området immunglobuliner slik som antistoffer og spesielt humaniserte antistoffer, anvendelige ved behandling og diagnose av lidelser mediert av human interleukin-18.

2. Bakgrunn for oppfinnelsen

Human interleukin-18 (hIL-18) er et cytokin som blir syntetisert som et biologisk inaktivt 193 aminosyrers forløperprotein (Ushio et al., *J. Immunol.* 156:4274, 1996). Kløyving av forløperprotein, for eksempel ved kaspase-1 eller kaspase-4, frigir det modne proteinet på 156 aminosyrer (Gu et al., *Science* 275:206, 1997; Ghayur et al., *Nature* 386:619, 1997), som oppviser biologiske aktiviteter som omfatter kostimulering av T-celleproliferasjon, forbedring av NK celle cytotoxicitet, induksjon av IFN- γ produksjon ved T-celler og NK-celler og potensiering av T-hjelper type 1 (Th1)-differensiering (Okamura et al., *Nature* 378:88, 1995; Ushio et al., *J. Immunol.* 156:4274, 1996; Micallef et al., *Eur. J. Immunol.* 26:1647, 1996; Kohno et al., *J. Immunol.* 158:1541, 1997; Zhang et al., *Infect. Immunol.* 65:3594, 1997; Robinson et al., *Immunity* 7:571, 1997). I tillegg er IL-18 en effektiv inducerer av human monocytt proinflammatoriske mediatorer, omfattende IL-8, tumornekrosefaktor- α (TNF- α) og prostaglandin E₂ (PGE₂) (Ushio, S. et al., *J. Immunol.* 156:4274-4279, 1996; Puren, A. J. et al., *J. Clin. Invest.* 10:711-721, 1997; Podolin et al., *J. Immunol.* fremlagt, 1999).

Det tidligere klonede IL-1 reseptor-relatert protein (IL-1Rrp) (Parnet et al., *J. Biol. Chem.* 271:3967, 1996) ble identifisert som en subenhet av IL-18-reseptoren (K_d=18 nM) (Torigoe et al., *J. Biol. Chem.* 272:25737, 1997). En andre subenhet av IL-18 reseptoren oppviser homologi med IL-1 reseptor hjelpe-proteinet og har blitt betegnet AcPL (for hjelpe- ("accessory") protein-lignende). Ekspresjon av både IL-1 Rrp og AcPL er nødvendig for IL-18-indusert NF- κ B og JNK-aktivering (Born et al., *J. Biol. Chem.* 273:29445, 1998). I tillegg til NF- κ B og JNK, signalerer IL-18 gjennom IL-1 reseptor-assosiert kinase (IRAK), p56lck (LCK) og mitogen-aktivert proteinkinase (MAPK) (Micallef et al., *Eur. J. Immunol.* 26:1647, 1996;

Matsumoto et al., *Biophys Biochem. Res. Comm.* 234:454, 1997; Tsuji-Takayama et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 237:126, 1997).

5 TH1-celler, som produserer proinflammatoriske cytokiner slik som IFN- γ , IL-2 og TNF- β (Mosmann et al., *J. Immunol.* 136:2348, 1986), er delaktig i mediering av mange autoimmune sykdommer, omfattende multippel sklerose (MS), revmatoid artritt (RA), type 1 eller insulinavhengig diabetes (IDDM), inflammatorisk tarmsykdom (IBD) og psoriasis (Mosmann og Sad, *Immunol. Today* 17:138, 1996). Følgelig ville antagonisme av et TH1-fremmede cytokin slik som IL-18 være forventet å hemme sykdomsutvikling. IL-18-spesifikke mAb-er kunne anvendes som en antagonist.

10 Rollen til IL-18 ved utvikling av autoimmune sykdommer har blitt vist. Følgelig har det blitt vist at IL-18-ekspresjon er betydelig økt i pankreas og milt hos "nonobese" diabetiske (NOD) mus umiddelbart før begynnelse av sykdom (Rothe et al., *J. Clin. Invest.* 99:469, 1997). Tilsvarende har nivåer av IL-18 blitt vist å være tydelig forøyet i synovialvæsken fra pasienter med revmatoid artritt (Kawashima et al., *Arthritis and Rheumatism* 39:598, 1996). Videre har det blitt vist at administrering av IL-18 øker den kliniske alvorlighetsgraden av murin eksperimentell allergisk encefalomyelitt (EAE), en Th1- mediert autoimmun sykdom som er en modell for multippel sklerose. I tillegg er det vist at nøytraliserende anti-rotte IL-18 antiserum forhindrer utvikling av EAE i Lewis hunnrotter (Wildbaum et al., *J. Immunol.* 161:6368, 1998). Følgelig er IL-18 et ønskelig mål for utvikling av et nytt terapeutikum for autoimmunitet.

25 Taniguchi et al., *J. Immunol. Methods* 206:107, beskriver syv murine og seks rotte anti-humane IL-18 monoklonale antistoffer (mAb-er), som binder til fire distinkte antigene seter. En av de murine mAb-er (nr. 125-2H) og de seks rotte mAb-er hemmer IL-18-indusert IFN- γ -produksjon ved KG-1-celler, hvor rotte mAb-er fremviser nøytraliserende aktiviteter 10 ganger lavere enn den for nr. 125-2H. Som demonstrert ved Western blot-analyse, er tre av de murine mAb-er, men ingen av rotte mAb-er, sterkt reaktive med membranbundet human IL-18. I tillegg er en enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for å detektere human IL-18 beskrevet, som anvender nr. 125-2H og et rotte mAb. Grensen for deteksjon ved denne ELISA er 10 pg/ml.

Europeisk patentsøknad EP 0 712 931 beskriver to mus anti-humane IL-18 mAb, H1 (IgG1) og H2 (IgM). Som vist ved Western blot-analyse, reagerer begge mAb med membranbundet human IL-18, men ikke med membranbundet human IL-12. H1 blir anvendt i en immuno affinitetskromatografi-metode for å
5 rens human IL-18 og i en ELISA for å måle human IL-18. H2 blir anvendt i en radioimmunanalyse for å måle human IL-18.

WO 0056771 beskriver rotte mAb 2C10 som har CDR som angitt i SEKV. ID.NR. 1-6. WO 0056771 beskriver også humanisert 2C10 som omfatter disse CDRene

10 Nøytraliserende IL-18-antistoffer kan potensielt være anvendelige for å lindre autoimmune sykdommer og relaterte symptomer hos mennesker. Følgelig er det et behov på området for en høyaffinitets IL-18 antagonist, slik som et nøytraliserende monoklonalt antistoff mot human interleukin 18, som ville redusere Th1 celle-differensiering og proliferasjon og følgelig autoimmune sykdommer og relaterte symptomer.

15 Alle referanser nevnt i hele foreliggende beskrivelse er uttrykkelig og fullstendig inntatt her ved referanse.

3. Oppsummering av oppfinnelsen

I henhold til foreliggende oppfinnelse tilveiebringes et humanisert anti-interleukin-18 antistoff som definert i kravene.

20 Antistoffet omfatter en tung kjede og lett kjede som har de følgende komplementaritetsbestemmende regionene (CDRer):

CDRH1:SEKV ID NR:1

CDRH2:SEKV ID NR:2

CDRH3:SEKV ID NR:3

25 CDRL1:SEKV ID NR:4

CDRL2:SEKV ID NR:5

CDRL3:SEKV ID NR:6

Resten i posisjon 71 av den lette kjeden er substituert med den tilsvarende resten funnet i donorantistoffet fra hvilket CDRene er avledet, nemlig en tyrosinrest.

Det vil være klart for fagfolk på området at betegnelsen "avledet" er ment å definere ikke bare kilden i betydningen av at den er den *fysiske* opprinnelsen for materialet, men også å definere materiale som er strukturelt identisk med materialet men som ikke stammer fra referansekilden. Følgelig trenger ikke den korresponderende resten "funnet i donorantistoff-rammen("framework") fra hvilken CDRene er avledet" nødvendigvis å være rensset fra donorantistoff-strukturen. Tilsvarende trenger ikke CDRer "avledet fra et donor antistoff" nødvendigvis å være rensset fra donorantistoffet.

CDRer og ramme("framework")-regioner (FR) og nummerering av aminosyrer følger, hvis ikke annet er angitt, Kabat-definisjonen som angitt i Kabat *et al* "Sequences of immunological interest", NIH.

Den lett kjeden og/eller tunge kjeden er fortrinnsvis ikke-immunogene i en human pasient.

Det tilveiebringes et humanisert antistoff hvorved de ovennevnte CDRer er podet på en human lett kjede akseptorramme("framework") hvor nevnte lett kjede akseptorramme omfatter rammeregioner avledet fra sekvensen angitt i SEKV ID NR:38.

Det tilveiebringes også et humanisert anti-interleukin-18 antistoff hvilket antistoff oppviser en likevektskonstant (KD) på 300pM eller mindre med hensyn til binding av human IL-18 når målt ved overflate plasmon resonans (f.eks. Biacore™, fortrinnsvis ved anvendelse av et Biacore™ 3000 instrument og betingelser som angitt i 8,4,1 nedenfor) ved 37°C.

Fortrinnsvis er likevektskonstanten (KD) for antistoffet med hensyn til binding av human IL-18 når målt ved overflate plasmon resonans (fortrinnsvis ved anvendelse av et Biacore™ T100 instrument og betingelser som angitt i 8,4,2 nedenfor) ved 37°C mindre enn 90pM. Mer foretrukket er likevektskonstanten 70pM eller mindre og enda mer foretrukket, 65pM, 60pM, 55pM eller 50pM eller mindre.

Det tilveiebringes også et humanisert anti-interleukin-18 antistoff hvilket antistoff fremviser en dissosiasjonskonstant eller off-rate (kd) på 0,0002 1/s eller mindre med hensyn til binding av human IL-18 når målt ved overflate plasmon resonans (f.eks. Biacore™, fortrinnsvis ved anvendelse av et Biacore™ T100 instrument og betingelser som angitt i 8,4,2 nedenfor) ved 37°C.

Det tilveiebringes et humanisert anti-interleukin-18 antistoff omfattende en tung kjede og en lett kjede, hvor et forhold mellom "off-rate" (kd) for nevnte antistoff fra binding til human IL-18 ved 25°C til off-rate (kd) for nevnte antistoff fra binding til human IL-18 ved 37°C er 1:5 eller. Off-raten blir fortrinnsvis målt ved anvendelse av et Biacore™ T100-instrument og betingelser som angitt i 8,4,2 nedenfor.

Det tilveiebringes et humanisert anti-interleukin-18 antistoff omfattende en tung kjede valgt fra gruppen bestående av; SEKV ID NR: 9, SEKV ID NR: 17, SEKV ID NR: 21; og en lett kjede valgt fra gruppen bestående av; SEKV ID NR: 13, SEKV ID NR: 29.

Spesielt tilveiebringer oppfinnelsen et humanisert anti-interleukin-18 antistoff omfattende en tung kjede ifølge SEKV ID NR: 9 og en lett kjede ifølge SEKV ID NR: 13.

I et annet aspekt ved oppfinnelsen tilveiebringes en farmasøytisk sammensetning omfattende et anti-interleukin-18 antistoff som beskrevet ovenfor og i patentkravene og en farmasøytisk akseptabel bærer.

Det tilveiebringes en fremgangsmåte for å selekttere et antistoff (spesielt et antistoff som hemmer interaksjonen mellom en ligand og en reseptor slik som et anti-interleukin-18 antistoff) for terapeutisk anvendelse hvilken fremgangsmåte omfatter;

(a) måle bindingsaffiniteten (ved anvendelse av f.eks. overflate plasmon resonans, slik som Biacore™) av antistoffet for et antigen til hvilket antistoffet spesifikt binder ved en temperatur på mellom 30 til 45°C (fortrinnsvis 37°C);

(b) måle bindingsaffiniteten (ved anvendelse av f.eks. overflate plasmon resonans slik som Biacore™) av antistoffet for et antigen til hvilket antistoffet spesifikt binder ved en temperatur på mellom 20 til 25°C (fortrinnsvis 25°C);

- 5 (c) selektene nevnte antistoff for terapeutisk anvendelse dersom affiniteten ifølge (a) er høyere enn affiniteten ifølge (b), fortrinnsvis dersom nevnte affinitet ifølge (a) er 2 ganger eller høyere, mer foretrukket 4 ganger eller høyere, enn affiniteten av trinn (b).

- 10 Det tilveiebringes også en fremgangsmåte for å selektene et antistoff (spesielt et antistoff som hemmer interaksjonen mellom en ligand og en reseptor slik som et anti-interleukin-18 antistoff) for terapeutisk anvendelse hvilken fremgangsmåte omfatter;

- (a) måle off-raten (ved anvendelse av f.eks. overflate plasmon resonans slik som Biacore™) for antistoffet fra antigenet til hvilket antistoffet spesifikt binder, ved en temperatur på mellom 30 til 45°C (fortrinnsvis 37°C);
- 15 (b) måle off-raten (ved anvendelse av f.eks. overflate plasmon resonans slik som Biacore™) for antistoffet fra antigenet til hvilket antistoffet spesifikt binder ved en temperatur på mellom 20 til 25°C (fortrinnsvis 25°C);
- (c) selektene nevnte antistoff for terapeutisk anvendelse dersom off-raten ifølge (a) er langsommere enn off-raten ifølge (b).
- 20 Betegnelsen "anti-interleukin-18" som den refererer til antistoffer ifølge oppfinnelsen betyr at slike antistoffer er i stand til å nøytralisere den biologiske aktiviteten av human interleukin-18. Det utelukker imidlertid ikke at slike antistoffer også i tillegg kan nøytralisere den biologiske aktiviteten av ikke-human primat (f.eks. rhesus og/eller cynomolgus) interleukin-18.

25 **Kort beskrivelse av figurene**

Oppfinnelsen vil nå bli ytterligere beskrevet med referanse til figurene, hvor:

Figur 1 viser effekten av temperatur på on-rate (k_a) for H1L1 og H1L2;

Figur 2 viser effekten av temperatur på off-rate (k_d);

Figur 3 viser effekten av temperatur på likevektskonstanten (KD);

Figurene 4A-4C viser representative data fra ett forsøk som frembrakte EC50-verdiene illustrert i tabell 7;

5 Figur 5 viser EC50-verdier for fire valgte humaniserte varianter som binder til humant IL18;

Figur 6 viser EC50-verdier for fire selekterte humaniserte varianter som binder til rhesus IL18;

Figur 7 viser binding av H1L2 til humant IL18 i nærvær av 50% synovialvæske;

Figur 8 viser hemning av IL18-stimulert IFN- γ produksjon i et KG1-forsøk;

10 Figur 9A og 9B viser hemming av LPS-stimulert IFN- γ produksjon i en human PBMCS donor i henholdsvis 10% og 25% autologt serum;

Figur 10 viser 2C10 binding til hIL18 oppfanget av hIL18BP;

Figur 11 viser evnen av de ni humaniserte variantene til å hemme human IL18-stimulert IFN- γ -frigjøring i KG1-celler;

15 Figur 12 viser hemning av IL-18-stimulert IFN- γ -produksjon ved H1 variantene og 2C10 i KG1-celler;

Figur 13 viser IC50-data for H1 variantene med et 95% konfidensintervall;

Figur 14 viser hemning av human IL-18-stimulert IFN- γ produksjon i KG1-celler;

Figur 15 viser hemning av rhesus IL-18-stimulert IFN- γ produksjon i KG1-celler;

20 Figur 16 viser resultatene av en human IL-18 bindings-ELISA ved anvendelse av kimær 2C10;

Figur 17 viser resultatene av en rhesus IL-18 bindings-ELISA ved anvendelse av kimær 2C10; og

25 Figurene 18A og 18B viser resultatene av bindings-ELISAer ved anvendelse av henholdsvis H1L2 og 2C10, ved binding til humant IL-18 bundet IL-18BP.

4. Humaniserte antistoffer

Anvendelse av intakte ikke-humane antistoffer ved behandling av humane sykdommer eller lidelser bærer med seg potensiale for de nå veletablerte problemene med immunogenisitet, spesielt ved gjentatt administrering av antistoffet. Det vil si at immunsystemet til pasienten kan gjenkjenne det ikke-humane intakte antistoffet som "non-self" og sette i gang en nøytraliserende respons. I tillegg til utvikling av fullstendig humane antistoffer (se ovenfor) har forskjellige teknikker blitt utviklet gjennom årene for å overvinne disse problemene og omfatter generelt å redusere sammensetningen av ikke-humane aminosyresekvenser i det intakte antistoffet, mens den relative lettheten med hensyn til å oppnå ikke-humane antistoffer fra et immunisert dyr f.eks. mus, rotte eller kanin, beholdes. I store trekk har to metoder blitt anvendt for å oppnå dette. Den første er kimære antistoffer, som generelt omfatter et ikke-humant (f.eks. gnager slik som mus) variabelt domene fusjonert til en human konstant region, se Morrison (1984), PNAS, 81, 6851. Fordi det antigenbindende setet av et antistoff er lokalisert innenfor de variable regionene beholder det kimære antistoffet dets bindingsaffinitet for antigenet men tilegner seg effektorfunksjonene fra den humane konstante regionen og er derfor i stand til å utføre effektorfunksjoner slik som beskrevet *supra*. Kimære antistoffer blir typisk fremstilt ved anvendelse av rekombinant DNA-metoder. DNA som koder for antistoffene (f.eks. cDNA) blir isolert og sekvensert ved anvendelse av konvensjonelle metoder (f.eks. ved anvendelse av oligonukleotidprober som er i stand til å binde spesifikt til gener som koder for H og L-kjedene av antistoffet ifølge oppfinnelsen, f.eks. DNA som koder for SEKV ID NR 1, 2, 3, 4, 5 og 6 beskrevet ovenfor). Hybridomceller tjener som en typisk kilde for slikt DNA. Dersom det er ønsket å uttrykke det kimære antistoffet, blir isolerte cDNAer som koder for de fullstendige modne variable regionene av de lette og tunge kjedene insertert i leseramme inn i egnede ekspresjonsvektorer som inneholder, bl.a. passende immunglobulin konstante regioner, vanligvis av human opprinnelse, sammen med signalsekvenser, stoppkodoner, promotere, terminatorer og andre elementer etter behov for å oppnå ekspresjon av antistoffet. Slike vektorer blir deretter transfektert inn i vertsceller slik som *E.coli*, COS-celler, CHO-celler eller myelomceller som ellers ikke produserer immunglobulin-protein for å oppnå syntese av antistoffet. DNA kan

modifiseres ved sette inn den kodende sekvensen for humane L og H-kjeder i stedet for de tilsvarende ikke-humane (f.eks. murin) H og L konstante regionene se f.eks. Morrison; PNAS 81, 6851 (1984).

- 5 Den andre metoden omfatter fremstilling av humaniserte antistoffer hvor det ikke-humane innholdet av antistoffet blir redusert ved humanisering av de variable regionene. To teknikker for humanisering er blitt populære. Den første er humanisering ved CDR-poding ("grafting"). CDRer anlegger løkker nær antistoffets N-terminale ende hvor de danner en overflate montert i et skaffold gitt av ramme-
- 10 ("framework")-regionene. Antigen-bindende spesifisitet av antistoffet blir hovedsakelig definert ved topografien og ved de kjemiske egenskapene av dets CDR-overflate. Disse trekkene blir i sin tur bestemt av konformasjonen av de individuelle CDRene, ved den relative ordningen av CDRene og ved egenskapene og ordningen av sidekjedene av restene som utgjør CDRene. En stor reduksjon i
- 15 immunogenisitet kan oppnås ved å binde kun CDR'ene fra ikke-humane (f.eks. murine) antistoffer ("donor" antistoffer) til en egnet human ramme("framework") ("akseptor struktur") og konstante regioner (se Jones *et al* (1986) Nature 321,522-525 og Verhoeyen M *et al* (1988) Science 239, 1534-1536). Imidlertid kan CDR grafting i og for seg ikke føre til fullstendig bibehold av antigenbindende
- 20 egenskaper og det er ofte funnet at det er nødvendig å bevare noen ramme- ("framework")-rester (noen ganger referert til som "tilbake-mutasjoner") av donor antistoffet i det humaniserte molekylet dersom signifikant antigenbindende affinitet skal gjenvinnes (se Queen C *et al*. (1989) PNAS 86, 10,029-10,033, Co, M *et al* (1991) Nature 351, 501-502). I dette tilfellet kan humane V-regioner som viser den
- 25 største sekvenshomologien (typisk 60% eller større) med det ikke-humane donor antistoffet velges fra en database for å tilveiebringe den humane rammen ("framework") (FR). Seleksjon av humane FRer kan foretas enten fra human konsensus eller individuelle humane antistoffer. Hvor nødvendig blir viktige rester fra donor antistoffet substituert inn i den humane akseptor strukturen for å bevare
- 30 CDR-konformasjoner. Datamaskin-modellering av antistoffet kan anvendes for å bidra til å identifisere slike strukturelt viktige rester, se WO99/48523.

Alternativt kan humanisering oppnås ved en metode for "veneering". En statistisk analyse av unike humane og murine immunglobulin tung og lett kjede variable regioner viste at de nøyaktige mønstrene av eksponerte rester er forskjellige i humane og murine antistoffer og de fleste individuelle overflate-posisjoner har en sterk preferanse for et lite antall forskjellige rester (se Padlan E.A. *et al*; (1991) Mol. Immunol., 28, 489-498 og Pedersen J.T. *et al* (1994) J. Mol.Biol. 235; 959-973). Derfor er det mulig å redusere immunogenisiteten av en ikke-human Fv ved å erstatte eksponerte rester i dens ramme("framework")-regioner som skiller seg fra de vanligvis funnet i humane antistoffer. Fordi protein antigenisitet kan samsvare med overflate tilgjengelighet, kan erstatning av overflate-rester være tilstrekkelig til å gjøre variabel region fra mus "usynlig" for det humane immunsystemet (se også Mark G.E. *et al* (1994) i *Handbook of Experimental Pharmacology vol.113: The pharmacology of monoclonal Antibodies*, Springer-Verlag, s.105-134). Denne metoden for humanisering er referert til som "veneering" fordi kun overflaten av antistoffet er endret, de understøttende restene forblir uforstyrret. Ytterligere alternative metoder omfatter den angitt i WO04/006955 og fremgangsmåten ifølge Humaneering™ (Kalobios), som anvender bakterielle ekspresjonssystemer og produserer antistoffer som er nær human kjønnselle i sekvens (Alfenito-M Advancing Protein Therapeutics, Januar 2007, San Diego, California). En annen, nyere metode for humanisering omfatter å selekttere humane akseptor rammer ("framework") på grunnlag av strukturell likhet av de humane CDR-regionene med de av donor mus antistoff CDR-regionene heller enn på homologi mellom andre regioner av antistoffet slik som struktur ("framework")-regioner. Denne fremgangsmåten er også kjent som Superhumanisation™ (Evogenix Inc.; Hwang et al (2005) Methods 36:35-42).

Følgelig angår foreliggende oppfinnelse humaniserte antistoffer som angitt i avsnitt 3 ovenfor og som definert i kravene. Slike humaniserte antistoffer omfatter foretrukket en human konstant region av en IgG isotype, slik som IgG1 eller IgG4.

De humaniserte variable regionene som angitt i avsnitt 3 ovenfor kan fusjoneres med en ikke-human konstant region ("reverse kimærer") slik som ikke-human primat, rotte, murin eller kanin.

Det vil selvfølgelig være klart for fagfolk på området at akseptor-rammene

(“framework”) angitt i SEKV ID NR: 37 og 38 utgjør immunglobulin aminosyrer kodet for av henholdsvis et VH og Vkappa-gen. Som sådan omfatter de både ramme(“framework”)-regioner og CDReNe av akseptor antistoffet. Det er godt innenfor fagfolks evner å erstatte akseptor antistoff CDReNe med donor CDReNe angitt i SEKV ID NR: 1, 2, 3, 4, 5 og 6 og å forbinde de resulterende sekvensene med egnede ramme (”framework”) 4 sekvenser slik som dem angitt i SEKV ID NR: 39 og SEKV ID NR: 40, for derved å fremstille en fullstendig immunglobulin variabel region slik som angitt i SEKV ID NR: 11 og SEKV ID NR: 15.

10 **4.1. Andre modifikasjoner**

Interaksjonen mellom Fc-regionen av et antistoff og forskjellige Fc-reseptorer (Fc γ R) er antatt å mediere effektor-funksjonene av antistoffet som omfatter antistoff-avhengig cellulær cytotoxicitet (ADCC), fiksering av komplement, fagocytose og halveringstid/utskilling av antistoffet. Forskjellige modifikasjoner av Fc-regionen av antistoffer ifølge oppfinnelsen kan foretas avhengig av den ønskede effektor-egenskapen. For eksempel er spesifikke mutasjoner i Fc-regionen for å gjøre et ellers lytisk antistoff, ikke-lytisk detaljert beskrevet i EP 0629 240 B1 og EP 0307 434 B2, eller en salvage reseptor bindende epitop kan inkorporeres i antistoffet for å øke halveringstid i serum se US 5,739,277. Det finnes for tiden fem kjente humane Fc γ -reseptorer, Fc γ R (I), Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa og neonatal FcRn. Shields *et al*, (2001) J.Biol.Chem 276, 6591-6604 viste at et felles sett av IgG1-rester er involvert i binding av alle Fc γ Rer, mens Fc γ RII og Fc γ RIII anvender distinkte seter utenfor dette felles settet. En gruppe av IgG1-rester reduserte binding til alle Fc γ Rer når endret til alanin: Pro-238, Asp-265, Asp-270, Asn-297 og Pro-239. Alle er i IgG CH2-domenet og er samlet i klynge nær hengselen som forbinder CH1 og CH2. Mens Fc γ RI anvender kun det felles settet av IgG1-rester for binding, interagerer Fc γ RII og Fc γ RIII med distinkte rester i tillegg til det felles settet. Endring av noen rester reduserte binding kun til Fc γ RII (f.eks. Arg-292) eller Fc γ RIII (f.eks. Glu-293). Noen varianter viste forbedret binding til Fc γ RII eller Fc γ RIII men påvirket ikke binding til den andre reseptoren (f.eks. Ser-267Ala forbedret binding til Fc γ RII men binding til Fc γ RIII var upåvirket).

Andre varianter viste forbedret binding til Fc γ RII eller Fc γ RIII med reduksjon i binding til den andre reseptoren (f.eks. Ser-298Ala forbedret binding til Fc γ RIII og reduserte binding til Fc γ RII). For Fc γ RIIIa hadde de beste bindende IgG1-variantene kombinerte alanin-substitusjoner ved Ser-298, Glu-333 og Lys-334.

5 Den neonatale FcRn-reseptoren er antatt å medvirke i både utskilling av antistoff og transcytose gjennom vev (se Junghans R.P (1997) Immunol. Res 16. 29-57 og Ghetie *et al* (2000) Annu.Rev.Immunol. 18, 739-766). Humane IgG1-rester bestemt å interagere direkte med human FcRn omfatter Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 og His435. Foreliggende oppfinnelse angår derfor
10 antistoffer ifølge oppfinnelsen som har hvilken som helst (eller flere) av endringene av rester detaljert beskrevet ovenfor for å modifisere halveringstid/utskilling og/eller effektorfunksjoner slik som ADCC og/eller komplement lysis.

Andre modifikasjoner omfatter glykosylerings-varianter av antistoffene ifølge
15 oppfinnelsen. Glykosylering av antistoffer ved konserverte posisjoner i deres konstante regioner er kjent å ha en inngående effekt på antistofffunksjon, spesielt effektorfunksjon slik som de beskrevet ovenfor, se for eksempel Boyd *et al* (1996), Mol. Immunol. 32, 1311-1318. Glykosylerings-varianter av antistoffene eller antigenbindende fragmenter derav ifølge foreliggende oppfinnelse hvor én eller
20 flere karbohydratgrupper er tilføyd, substituert, deletert eller modifisert er omfattet. Innføring av et asparagin-X-serin eller asparagin-X-treonin-motiv skaper et potensielt sete for enzymatisk binding av karbonhydratgrupper og kan derfor anvendes for å manipulere glykosyleringen av et antistoff. I Raju *et al* (2001) Biochemistry 40, 8868-8876 ble terminal sialylering av et TNFR-IgG
25 immunoadhesin økt gjennom en fremgangsmåte for regalaktosylering og/eller resialylering ved anvendelse av beta-1, 4-galaktosyltransferase og/eller alfa, 2,3 sialyltransferase. Økning av terminal sialylering er antatt å øke halveringstiden av immunglobulinet. Antistoffer blir, liksom de fleste glykoproteiner, typisk fremstilt som en blanding av glykoformer. Denne blandingen er spesielt tydelig når
30 antistoffer blir produsert i eukaryote, spesielt mammalske celler. En rekke metoder er utviklet for fremstilling av definerte glykoformer, se Zhang *et al* Science (2004), 303, 371, Sears *et al*, Science, (2001) 291, 2344, Wacker *et al* (2002) Science, 298 1790, Davis *et al* (2002) Chem.Rev. 102, 579, Hang *et al* (2001)

Acc.Chem.Res 34, 727. Følgelig omfatter oppfinnelsen en rekke terapeutiske (typisk monoklonale) antistoffer (som kan være av IgG isotypen, f.eks. IgG1) som her beskrevet omfattende et definert antall (f.eks. 7 eller færre, for eksempel 5 eller færre slik som to eller en enkelt) glykoform(er) av nevnte antistoffer eller
5 antigenbindende fragmenter derav.

Ytterligere utførelsesformer ifølge oppfinnelsen omfatter antistoffer ifølge oppfinnelsen eller antigenbindende fragmenter derav koblet til en ikke-proteinlignende polymer slik som polyetylenglykol (PEG), polypropylenglykol eller
10 polyoksyalkylen. Konjugering av proteiner til PEG er en etablert teknikk for å øke halveringstid av proteiner, så vel som å redusere antigenisitet og immunogenisitet av proteiner. Anvendelse av Pegylering med forskjellige molekylvekter og typer (lineær eller forgrenet) har blitt undersøkt med intakte antistoffer så vel som Fab'-fragmenter, se Koumenis I.L. *et al* (2000) Int.J.Pharmaceut. 198:83-95.

15

5. Fremstillingsmetoder

Antistoffer ifølge foreliggende oppfinnelse kan fremstilles i transgene organismer slik som geiter (se Pollock *et al* (1999), J.Immunol.Methods 231:147-157),
20 kyllinger (se Morrow KJJ (2000) Genet.Eng.News 20:1-55, mus (se Pollock *et al.*, *ibid*) eller planter (se Doran PM, (2000) Curr.Opinion Biotechnol. 11, 199-204, Ma JK-C (1998), Nat. Med. 4; 601-606, Baez J *et al*, BioPharm (2000) 13: 50-54, Stoger E *et al*; (2000) Plant Mol.Biol. 42:583-590). Antistoffer kan også fremstilles ved kjemisk syntese. Imidlertid blir antistoffer ifølge oppfinnelsen typisk fremstilt
25 ved anvendelse av rekombinant celledyrkings teknologi velkjent for fagfolk på området. Et polynukleotid som koder for antistoffet blir isolert og insertert i en replikerbar vektor slik som et plasmid for videre kloning (amplifisering) eller ekspresjon. Ett anvendelig ekspresjonssystem er et glutamat syntetase system (for eksempel solgt av Lonza Biologics), spesielt hvor vertscellen er CHO eller
30 NS0 (se nedenfor). Polynukleotid som koder for antistoffet blir lett isolert og sekvensert ved anvendelse av konvensjonelle metoder (f.eks. oligonukleotid-prober). Vektorer som kan anvendes omfatter plasmid, virus, fag, transposoner, minikromosomer av hvilke plasmider er en typisk utførelsesform. Generelt omfatter

- slike vektorer videre en signalsekvens, replikasjonsorigo, ett eller flere markørgener, et enhancer-element, en promoter og transkripsjonstermineringssekvenser operabelt bundet til det lette og/eller tunge kjede polynukleotidet for derved å lette ekspresjon. Polynukleotid som koder for de lette og tunge kjedene kan være insertert i separate vektorer og innført (f.eks. ved transformasjon, transfeksjon, elektroporering eller transduksjon) inn i samme vertscelle eller, om ønsket kan både den tunge kjeden og lette kjeden være insertert i samme vektor før slik innføring.
- Det vil umiddelbart være klart for fagfolk på området at beroende på redundansen for den genetiske koden, er alternative polynukleotider til de beskrevet her også tilgjengelige som vil kode for polypeptidene ifølge oppfinnelsen.

5.1 Signalsekvenser

- Antistoffer ifølge foreliggende oppfinnelse kan fremstilles som et fusjonsprotein med en heterolog signalsekvens som har et spesifikt kløyvingsstede ved den N-terminale enden av det modne proteinet. Signalsekvensen skulle bli gjenkjent og prosessert av vertscellen. For prokaryote vertsceller kan signalsekvensen være en alkalisk fosfatase, penicillinase eller varmestabil enterotoksin II-ledere. For sekresjon i gjær kan signalsekvensene være en gjær invertase-leder, α faktor-leder eller sur-fosfatase-ledere se f.eks. WO90/13646. I mammalske celledsystemer, er virale sekretorisk ledere slik som herpes simplex gD-signal og en nativ immunglobulin signalsekvens (slik som human Ig tung kjede) tilgjengelig. Typisk er signalsekvensen ligert i leseramme med polynukleotid som koder for antistoffet ifølge oppfinnelsen.

5.2 Replikasjonsorigo

- Replikasjonsorigo er velkjent på området hvor pBR322 er egnet for de fleste gram-negative bakterier, 2 μ -plasmid for de fleste gjær og forskjellige virale origo slik som SV40, polyoma, adenovirus, VSV eller BPV for de fleste pattedyrceller. Generelt er ikke replikasjonsorigo-komponenten nødvendig for integrerte

mammalske ekspresjonsvektorer, dersom ikke vektor propagering er nødvendig i E.coli. Imidlertid kan SV40 ori anvendes siden det inneholder early-promoteren.

5.3 Seleksjonsmarkør

5

Typiske seleksjonsgener koder for proteiner som (a) gir resistens mot antibiotika eller andre toksiner f.eks. ampicillin, neomycin, metotrexat eller tetracyklin eller (b) komplementerer auxotrofe mangler eller tilfører næringsstoffer ikke tilgjengelige i de komplekse media eller (c) kombinasjoner av begge. Seleksjonsskjemaet kan

10

involvere stans av vekst av vertscellen som ikke inneholder noen vektor eller vektorer. Celler som har blitt vellykket transformert med genene som koder for terapeutisk antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse, overlever på grunn av f.eks. medikamentresistens meddelt av den samtidig leverte seleksjonsmarkøren. Ett eksempel er DHFR seleksjonssystemet hvor transformanter blir dannet i DHFR-

15

negative vertsstammer (f.eks. se Page og Sydenham 1991 Biotechnology 9: 64-68). I dette systemet blir DHFR-genet levert sammen med antistoff

polynukleotidsekvenser ifølge oppfinnelsen og DHFR-positive celler deretter selektert ved nukleosid fjerning. Om nødvendig blir DHFR-inhibitoren metotrexat også anvendt for å selekttere transformanter med DHFR gen-amplifisering. Ved å

20

forbinde DHFR-genet operabelt til de antistoff-kodende sekvensene ifølge oppfinnelsen eller funksjonelle derivater derav, resulterer DHFR gen-amplifisering i ledsagende amplifisering av de ønskede antistoffsekvensene av interesse. CHO-

25

celler er en spesielt anvendelig cellelinje for denne DHFR/metotrexat-seleksjonen og metoder for å amplifisere og selekttere vertsceller ved anvendelse av DHFR-systemet er veletablert på området se Kaufman R.J. et al J.Mol.Biol. (1982) 159, 601-621, for oversikt, se Werner RG, Noe W, Kopp K, Schluter M, "Appropriate mammalian expression systems for biopharmaceuticals", Arzneimittel-Forschung. 48(8):870-80, 1998 Aug. Et ytterligere eksempel er glutamat syntetase

30

ekspresjonssystemet (Lonza Biologics). Et egnet seleksjonsgen for anvendelse i gjær er trp1-genet; se Stinchcomb *et al* Nature 282, 38, 1979.

5.4 Promotere

Egnede promotere for ekspresjon av antistoffer ifølge oppfinnelsen er operabelt bundet til DNA/polynukleotid som koder for antistoffet. Promotere for prokaryote verter omfatter phoA promoter, Beta-laktamase og laktose promotersystemer, alkalisk fosfatase, tryptofan og hybride promotere slik som Tac. Promotere egnet for ekspresjon i gjærceller omfatter 3-fosfoglycerat kinase eller andre glykolytiske enzymer f.eks. enolase, glyceraldehyd 3 fosfat dehydrogenase, heksokinase, pyruvat dekarboksylase, fosfofruktokinase, glukose 6 fosfat isomerase, 3-fosfoglycerat mutase og glukokinase. Induserbare gjær-promotere omfatter alkohol dehydrogenase 2, isocytokrom C, sur fosfatase, metallotionein og enzymer ansvarlig for nitrogen-metabolisme eller maltose/galaktose anvendelse.

Promotere for ekspresjon i pattedyr-celle systemer omfatter RNA polymerase II promotere omfattende virale promotere slik som polyoma, fowlpox og adenovirus (f.eks. adenovirus 2), bovint papillomavirus, avian sarkoma virus, cytomegalovirus (spesielt immediate early gen promoter), retrovirus, hepatitt B-virus, aktin, rous sarkoma virus (RSV)-promoter og early eller late Simian virus 40 og ikke-virale promotere slik som EF-1alfa (Mizushima og Nagata Nucleic Acids Res 1990 18(17):5322. Valg av promoter kan være basert på egnet kompatibilitet med vertscellen anvendt for ekspresjon.

5.5 Enhancer-element

Når passende, f.eks. for ekspresjon i høyere eukaroyter, kan ytterligere enhancer-elementer inkluderes istedenfor eller så vel som de funnet lokalisert i promoterene beskrevet ovenfor. Egnede pattedyr-enhancer-sekvenser omfatter enhancer-elementer fra globin, elastase, albumin, fetoprotein, metallotionein og insulin. Alternativt kan det anvendes et enhancer-element fra et eukaryot celle virus slik som SV40 enhancer, cytomegalovirus early promoter enhancer, polyoma enhancer, baculovirus enhancer eller murint IgG2a lokus (se WO04/009823). Selv om slike enhancere fortrinnsvis er lokalisert i vektoren ved et sete oppstrøms for promoteren kan de også være lokalisert andre steder f.eks. innenfor den utranslaterte regionen eller nedstrøms for polyadenyleringssignalet. Valg av og

plassering av enhancer kan være basert på egnet kompatibilitet med vertscellen anvendt for ekspresjon.

5.6 Polyadenylering/Terminering

5

I eukaryote systemer er polyadenyleringssignaler operabelt bundet til polynukleotid som koder for antistoffet ifølge foreliggende oppfinnelse. Slike signaler er typisk plassert 3' for den åpne leserammen. I mammalske systemer omfatter ikke-begrensede eksempel signaler avledet fra veksthormoner, elongeringsfaktor-1 alfa og virale (f.eks. SV40) gener eller retroviral long terminal repeat. I gjærssystemer omfatter ikke-begrensede eksempler på polydenylering/termineringssignaler de avledet fra fosfoglycerat kinase (PGK) og alkohol dehydrogenase 1 (ADH)-genene. I prokaryot system er polyadenyleringssignaler typisk ikke nødvendig og det er istedet vanlig å anvende kortere og mer definerte terminatorsekvenser. Valg av polyadenylering/terminering sekvenser kan være basert på passende kompatibilitet med vertscellen anvendt for ekspresjon.

10

15

5.7 Andre metoder/elementer for forbedrede utbytter

20

I tillegg til det ovennevnte, omfatter andre trekk som kan anvendes for å forbedre utbytter kromatin remodelleringselementer, introner og vertscelle-spesifikk kodon-modifikasjon. Kodon-bruken for antistoffet ifølge foreliggende oppfinnelse derav kan modifiseres for å tilpasses kodon-bias for vertscellen for slik å øke transkript og/eller produktutbytte (f.eks. Hoekema A et al Mol Cell Biol 1987 7(8):2914-24). Valg av kodoner kan være basert på egnet kompatibilitet med vertscellen anvendt for ekspresjon.

25

5.8 Vertsceller

30

Egnede vertsceller for kloning eller ekspresjonsvektorer som koder for antistoffer ifølge oppfinnelsen er prokaroyte, gjær eller høyere eukaryote celler. Egnede prokaryote celler omfatter eubakterier f.eks. enterobacteriaceae slik som

Escherichia f.eks. *E.Coli* (for eksempel ATCC 31,446; 31,537; 27,325), *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella* *Proteus*, *Salmonella* f.eks. *Salmonella typhimurium*, *Serratia* f.eks. *Serratia marcescans* og *Shigella* så vel som Bacilli slik som *B.subtilis* og *B.licheniformis* (se DD 266 710), *Pseudomonas* slik som

5 *P.aeruginosa* og *Streptomyces*. Av gjær-vertscellene er *Saccharomyces cerevisiae*, *schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* (f.eks. ATCC 16,045; 12,424; 24178; 56,500), *yarrowia* (EP402, 226), *Pichia Pastoris* (EP183, 070, se også Peng *et al* J.Biotechnol. 108 (2004) 185-192), *Candida*, *Trichoderma reesia* (EP244, 234), *Penicillin*, *Tolypocladium* og *Aspergillus*-verter slik som *A.nidulans*

10 og *A.niger* også omfattet.

Selv om prokaryote og gjær-vertsceller er spesifikt omfattet ved oppfinnelsen er, typisk imidlertid, foretrukne vertsceller ifølge foreliggende oppfinnelse vertebratceller. Egnede vertebrat vertsceller omfatter pattedyrceller slik som COS-

15 1 (ATCC nr. CRL 1650) COS-7 (ATCC CRL 1651), human embryonisk nyre-linje 293, PerC6 (Crucell), nyreceller fra babyhamster (BHK) (ATCC CRL,1632), BHK570 (ATCC NR: CRL 10314), 293 (ATCC NR.CRL 1573), ovarieceller fra kinesisk hamster CHO-celler (f.eks. CHO-K1, ATCC NR: CCL 61, DHFR-CHO-cellelinje slik som DG44 (se Urlaub *et al*, (1986) *ibid*), spesielt CHO-cellelinjene

20 tilpasset for suspensjonskultur, mus sertoli-celler, ape nyreceller, nyreceller fra afrikansk grønn ape (ATCC CRL-1587), HELA-celler, nyreceller fra hundedyr (ATCC CCL 34), humane lungeceller (ATCC CCL 75), Hep G2 og myelom eller lymfom-celler f.eks. NS0 (se US 5,807,715), Sp2/0, Y0.

25 Følgelig tilveiebringes i én utførelsesform ifølge oppfinnelsen en stabilt transformert vertscelle omfattende en vektor som koder for en tung kjede og/eller lett kjede av det terapeutiske antistoffet som her beskrevet. Typisk omfatter slike vertsceller en første vektor som koder for den lette kjeden og en andre vektor som koder for nevnte tunge kjede.

30

Slike vertsceller kan også ytterligere konstrueres eller tilpasses for å modifisere kvalitet, funksjon og/eller utbytte av antistoffet ifølge foreliggende oppfinnelse.

Ikke-begrensende eksempler omfatter ekspresjon av spesifikk modifierende (f.eks. glykosylering) enzymer og proteinfolding chaperoner.

5.9 Metoder for celledyrking.

5

Vertsceller transformert med vektorer som koder for terapeutiske antistoffer ifølge oppfinnelsen kan dyrkes ved hvilken som helst metode kjent for fagfolk på området. Vertsceller kan dyrkes i spinnerkolber, rollerflasker eller hulfibersystemer, men for storskala produksjon er det foretrukket at omrørte tankreaktorer eller bag reaktorer (f.eks. Wave Biotech, Somerset, New Jersey USA) blir anvendt spesielt for suspensjonskulturer. Typisk er de omrørte tankene tilpasset for ventilasjon ved anvendelse av f.eks. sprinkler, skilleplater eller skovler med lav skjærekraft. For boblesøyler og luftinnpressing reaktorer kan direkte ventilasjon med luft eller oksygenbobler anvendes. Når vertscellene blir dyrket i et serumfritt dyrkningsmedium er det foretrukket at media er supplert med et cellebeskyttende middel slik som pluronic F-68 for å bidra til å forhindre celledød som et resultat av ventilasjonsprosessen. Avhengig av vertscellens egenskaper, kan enten mikrobærere anvendes som vekstsubstrater for cellelinjer avhengige av forankring eller cellene kan tilpasses suspensjonskultur (hvilket er typisk). Ved dyrking av vertsceller, spesielt vertebrat vertsceller kan det anvendes en rekke arbeidsmetoder slik som batch, fed-batch, gjentatt batch prosessering (se Drapeau *et al* (1994) cytotechnology 15: 103-109), forlenget batch-prosess eller perfusjons kultur. Selv om rekombinant transformerte mammalske vertsceller kan dyrkes i serum-inneholdende media slik som media omfattende føtalt kalveserum (FCS) er det foretrukket at slike vertsceller blir dyrket i syntetiske serumfri media slik som beskrevet i Keen *et al* (1995) Cytotechnology 17:153-163 eller kommersielt tilgjengelige media slik som ProCHO-CDM eller UltraCHO™ (Cambrex NJ, USA), supplert hvor nødvendig med en energikilde slik som glukose og syntetiske vekstfaktorer slik som rekombinant insulin. Serumfri dyrking av vertsceller kan kreve at disse cellene er tilpasset til vekst i serumfrie betingelser. En metode for tilpasning er å dyrke slike vertsceller i serum-inneholdende media og gjentatte ganger skifte ut 80% av dyrkningsmediet med serumfritt medium slik at vertscellene lærer seg tilpasning til serumfrie betingelser (se f.eks.

10

15

20

25

30

Scharfenberg K et al (1995) i *Animal Cell technology: Developments towards the 21st century* (Beuvery E.C. et al eds), s. 619-623, Kluwer Academic publishers).

Antistoffer ifølge oppfinnelsen utskilt i mediet kan gjenvinnes og renses fra mediet ved anvendelse av en rekke teknikker for å gi en grad av rensing egnet for den tilsiktede anvendelsen. For eksempel bemyndiger anvendelse av terapeutiske antistoffer ifølge oppfinnelsen for behandling av humane pasienter typisk minst 95% renhet som bestemt ved reduserende SDS-PAGE, mer typisk 98% eller 99% eller høyere renhet, sammenlignet med dyrkningsmediene omfattende de terapeutiske antistoffene. I første instans blir celledetrit fra dyrkningsmediene typisk fjernet ved anvendelse av sentrifugering fulgt av et rensetrinn av supernatanten ved anvendelse av f.eks. mikrofiltrering, ultrafiltrering og/eller dybde filtrering. Alternativt kan antistoffet høstes ved mikrofiltrering, ultrafiltrering eller dybde filtrering uten foregående sentrifugering. En rekke andre teknikker slik som dialyse og gelelektroforese og kromatografiske teknikker slik som hydroksoapatitt (HA), affinitetskromatografi (eventuelt omfattende et affinitets merking-system slik som polyhistidin) og/eller hydrofob interaksjons kromatografi (HIC, se US 5,429,746) er tilgjengelige. I én utførelsesform blir antistoffene ifølge oppfinnelsen, etter forskjellige rensetrinn, oppfanget ved anvendelse av Protein A eller G affinitetskromatografi fulgt av ytterligere kromatografitrinn slik som ionebytter og/eller HA-kromatografi, anion eller kationbytter, størrelseseksklusions-kromatografi og ammoniumsulfat presipitering. Typisk blir forskjellige trinn for virusfjerning også anvendt (f.eks. nanofiltrering ved anvendelse av f.eks. et DV-20-filter). Etter disse forskjellige trinnene tilveiebringes et rensset (fortrinnsvis monoklonalt) preparat omfattende minst 10 mg/ml eller mer f.eks. 100 mg/ml eller mer av antistoffet ifølge oppfinnelsen og danner derfor en utførelsesform ifølge oppfinnelsen. Konsentrasjon til 100 mg/ml eller mer kan frembringes ved ultrasentrifugering. Hensiktsmessig er slike preparater hovedsakelig fri for aggregerte former av antistoffer ifølge oppfinnelsen.

Bakterielle systemer er spesielt egnet for ekspresjon av antistofffragmenter. Slike fragmenter er lokalisert intracellulært eller innenfor periplasma. Uoppløselig periplasmiske proteiner kan ekstraheres og refoldes for å danne aktive proteiner i

henhold til metoder kjent for fagfolk på området, se Sanchez *et al* (1999) J.Biotechnol. 72, 13-20 og Cupit PM *et al* (1999) Lett Appl Microbiol, 29, 273-277.

6. Farmasøytiske sammensetninger

5

Rensede preparater av antistoffer ifølge oppfinnelsen (spesielt monoklonale preparater) som beskrevet ovenfor, kan inkorporeres i farmasøytiske sammensetninger for anvendelse ved behandling av humane sykdommer og lidelser slik som de beskrevet ovenfor. Typisk omfatter slike sammensetninger videre en farmasøytisk akseptabel (dvs. inert) bærer som kjent og krevet ved akseptabel farmasøytisk praksis, se f.eks. Remingtons Pharmaceutical Sciences, 16th utgave, (1980), Mack Publishing Co. Eksempler på slike bærere omfatter sterilisert bærer slik som saltoppløsning, Ringers løsning eller dekstroseløsning, bufret med egnede buffere til en pH innenfor et område på 5 til 8. Farmasøytiske sammensetninger for injeksjon (f.eks. ved intravenøs, intraperitoneal, intradermal, subkutan, intramuskulær eller intraportal) eller kontinuerlig infusjon er hensiktsmessig fri for synlig partikulært materiale og kan omfatte mellom 0,1ng til 100 mg antistoff, typisk mellom 5 mg og 25 mg antistoff. Metoder for fremstilling av slike farmasøytiske sammensetninger er velkjent for fagfolk på området. I én utførelsesform omfatter farmasøytiske sammensetninger mellom 0,1ng til 100 mg terapeutiske antistoffer ifølge oppfinnelsen i enhetsdoseform, eventuelt sammen med instruksjoner for anvendelse. Farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen kan være lyofilisert (frysetørket) for rekonstituering før administrering i henhold til metoder velkjente eller innlysende for fagfolk på området. Når utførelsesformer ifølge oppfinnelsen omfatter antistoffer ifølge oppfinnelsen med en IgG1-isotype, kan en chelator av kobber slik som citrat (f.eks. natriumcitrat) eller EDTA eller histidin tilsettes til den farmasøytiske sammensetningen for å redusere graden av kobbermediert nedbrytning av antistoffer av denne isotypen, se EP0612251.

30

Effektive doser og behandlingsregimer for administrering av antistoffet ifølge oppfinnelsen blir generelt bestemt empirisk og er avhengig av faktorer slik som alder, vekt og helsetilstanden for pasienten og sykdommen eller lidelsen som skal

behandles. Slike faktorer er innenfor området for den behandlende lege.

Veiledning for valg av passende doser kan finnes i f.eks. Smith *et al* (1977)

Antibodies in human diagnosis and therapy, Raven Press, New York men vil

generelt være mellom 1 mg og 1000 mg. I én utførelsesform er doseringsregimet

5 for behandling av en human pasient rammet av RA 100 mg eller der omkring (dvs. mellom 50 mg til 200 mg) av antistoff ifølge oppfinnelsen (eller antigenbindende fragment derav) administrert subkutant pr. uke eller annenhver uke.

Sammensetninger ifølge foreliggende oppfinnelse kan også anvendes profylaktisk.

10 Avhengig av sykdommen eller lidelsen som skal behandles, kan farmasøytiske sammensetninger omfattende en terapeutisk effektiv mengde av antistoffet ifølge oppfinnelsen anvendes samtidig, separat eller sekvensielt med en effektiv mengde av et annet medikament slik som et anti-inflammatorisk middel f.eks. en NSAID, metotrexat, bucillamin, natrium tiomalat eller én eller flere av en anti-TNF alfa-

15 behandling slik som Enbrel™ (etanrcept), Remicade™ (infliximab), Humira™ (adalimumab) og/eller CDP870. Antistoffer ifølge oppfinnelsen kan anvendes i kombinasjon med en effektiv mengde av et anti-TNF-alfa reseptor antistoff, se Davis MW *et al* (2000) Ann Rheum Dis 59(Suppl 1): 41-43. I andre utførelsesformer kan antistoffer ifølge oppfinnelsen anvendes i kombinasjon med

20 en effektiv mengde av et middel rettet mot; IL-1/IL-1R (f.eks. Kineret™), CTLA4-Ig, IL-6 (se Choy *et al*, (2002) Ann.Rheum.Dis 61(suppl 1): 54), IL-8, IL-15, VEGF, IL-17, IL-18 (se Taylor *et al* (2001) Curr.Opin.Immunol,13: 611-616), anti-ICAM og/eller anti-CD4-antistoffer, midler rettet mot et medlem av MMP-familien f.eks. MMP-1, 2,3 og/eller 13. Antistoffer ifølge oppfinnelsen kan også anvendes i

25 kombinasjon med et middel som fjerner celler kjent å medvirke i den inflammatoriske prosessen, f.eks. CD20-positive B-celler ved anvendelse av for eksempel Mabthera™ (Rituximab). Andre terapier i kombinasjon med antistoffer ifølge oppfinnelsen omfatter anti-angiogene terapier slik som antagonister av integrin $\alpha_v\beta_3$, Kringler 1-5 (se Sumariwalla P *et al* (2003), Arthritis Res Ther

30 5:R32-R39.), oppløselig Flt-1 (se Miotla *et al*, (2000) Lab.Invest. 80:1195-1205), et anti-COX-2 middel eller et anti-OSM-middel slik som et anti-OSM antistoff, se WO2005/095457. Hensiktsmessig er en farmasøytisk sammensetning omfattende et sett av deler av antistoffet ifølge oppfinnelsen eller antigenbindende fragment

derav sammen med slike andre medikamenter eventuelt sammen med instruksjoner for anvendelse også omfattet av foreliggende oppfinnelse. Disse kombinasjonene kan være spesielt anvendelige ved behandling av artrittiske sykdommer/lidelser slik som revmatoid artritt.

5

7. Kliniske anvendelser

Antistoffer ifølge oppfinnelsen kan anvendes i terapeutiske behandlinger av IL-18-medierte sykdommer slik som autoimmune sykdommer. Spesielt nevnes multippel sklerose, artrittiske sykdommer slik som revmatoid artritt, Type 1 diabetes, inflammatorisk tarmsykdom (IBD) og psoriasis. En human pasient rammet av en sykdom mottagelig for nøytralisering av hIL-18 (slik som multippel sklerose, revmatoid artritt, Type 1 diabetes, IBD, psoriasis) kan få administrert en terapeutisk effektiv mengde av et antistoff ifølge oppfinnelsen, spesielt et antistoff som har en tung kjede med en sekvens angitt i SEKV ID NR:9 og en lett kjede som har sekvensen angitt i SEKV ID NR:13.

10

15

Anvendelse av et antistoff ifølge oppfinnelsen ved fremstilling av et medikament for behandling av hvilken som helst (eller flere) av ovennevnte sykdommer/lidelser tilveiebringes også.

20

Tabell A

Protein eller polynukleotid (PN) beskrivelse	Sekvens identifikator (SEKV ID NR :)
CDRH1	1
CDRH2	2
CDRH3	3
CDRL1	4
CDRL2	5
CDRL3	6
Human IL-18	7
Human IL-18 PN	8
H1 tung kjede (variabel + konstant region)	9
H1 tung kjede (PN)	10
H1 variabel region	11
H1 variabel region (PN)	12
L2 lett kjede (variabel + konstant region)	13
L2 lett kjede (PN)	14
L2 variabel region	15
L2 variabel region (PN)	16
H2 tung kjede (variabel + konstant)	17
H2 tung kjede (PN)	18
H2 variabel region	19
H2 variabel region (PN)	20
H3 tung kjede (variabel + konstant)	21
H3 tung kjede (PN)	22
H3 variabel region	23
H3 variabel region (PN)	24
L1 lett kjede (variabel og konstant region)	25
L1 lett kjede (PN)	26
L1 variabel region	27
L1 variabel region (PN)	28
L3 lett kjede (variabel + konstant region)	29
L3 lett kjede (PN)	30
L3 variabel region	31
L3 variabel region (PN)	32
2c10 rotte-human IgG1 kimærer	33
2c10 rotte-human IgG1 kimærer (PN)	34
2c10 rotte-human CKappa kimærer	35
2c10 rotte-human CKappa kimærer (PN)	36
Tung kjede akseptor struktur ("framework")	37
Lett kjede akseptor struktur ("framework")	38
JH6 aminosyresekvens tilføyd til SEKV ID NR:37	39
JKappa 2 aminosyresekvens tilføyd til SEKV ID NR:38	40

8. Eksemplifisering

De følgende eksemplene illustrerer forskjellige aspekter ved foreliggende oppfinnelse. All generell kloning, ligering og annen rekombinant DNA-teknologi blir utført som generelt beskrevet i Maniatis *et al*, Molecular cloning (A laboratory manual), Cold Spring Harbor Laboratory eller Sambrook *et al* Molecular Cloning (A laboratory manual), Cold Spring Harbor Laboratory. Vektorsystemer og ytterligere molekylærbiologiske metoder anvendt her er beskrevet i WO2005/095457.

8.1 Kloning av hybridom variable regioner

Det parentale rotte antistoffet 2C10 er angitt i US patent 6,706,487. Leseren blir spesifikt henvist til dette dokumentet. Et kimært antistoff 2C10c ble utformet basert på de publiserte rotte V-regionene beskrevet ovenfor bundet til humane IgG1 eller kappa C-regioner. En generisk immunglobulin signalsekvens og translasjon startkodon ATG ble innført for tung og lett kjede konstruksjoner. Hind III og BsiWI restriksjonsendonuklease-seter ble utformet til å konstruere VL-domenet og tillate kloning inn i mammalske ekspresjonsvektorer som allerede inneholder den humane C kappa-regionen (SEKV ID NR:36). Hind III og SpeI restriksjonsendonuklease-seter ble utformet til å konstruere VH-domenet og tillate kloning inn i mammalske ekspresjonsvektorer som allerede inneholder den humane γ 1 C-regionen (SEKV ID NR:34). Dette resulterte i en to aminosyrers endring for 2C10 Vh-regionen i ramme ("framework") 4 (Kabat restene 107 og 108) fra den publiserte sekvensen som vist i SEKV ID NR: 33.

Overlappende oligonukleotider ble anvendt til å oppføre hele den kodende sekvensen ved PCR og kloning inn i ekspresjonsvektorene beskrevet ovenfor. Etter sekvensverifisering, ble det kimære antistoffet uttrykt CHO-celler. Antistoff produsert ble rensset fra cellekultur-supernatanter ved affinitetskromatografi på rProtein A Sepharose. Kimære antistoffer av 2C10 ble evaluert i *in vitro* bindingsanalyser å vise komparabel potens med den parentale rotte 2C10. Dette ble oppnådd ved å bestemme EC50-verdier for binding til human eller rhesus IL18

i ELISA (Figurene 16 og 17) eller ved hemning av IFN- γ frigjøring i KG-1 bioanalyse, se Figur 15.

8.2 Humanisering

8.2.1 Lett kjede humaniserings-strategi

- 5 For 2C10 rotte variabel lett kjede sekvens ble det valgt en human kjønnselle akseptor ramme ("framework") (F_IGKV1D-12-1, SEKV ID NR:38) som hadde 64% identitet (omfattende CDRer) med rotte 2C10 variabel lett kjede sekvens. Kjønnselle V-regionen ble kombinert in silico med en egnet FR4, i dette tilfellet J-region kappa 2 minigenet (Kabat Vol.II) basert på sekvenslikhet (SEKV ID NR:40).
- 10 Tre humaniserte varianter ble fremstilt på grunnlag av sekvenssammenligning og mulig innvirkning på antistoff-funksjon. Konstruksjon L1 var et rett graft av rotte CDRer (ved anvendelse av Kabat-definisjonen) inn i den humane akseptor rammen ("framework") valgt ovenfor. Konstruksjon L2 var basert på L1 med én ytterligere tilbakemutasjon ved rest 71. Konstruksjon L3 var basert på L2 med 4
- 15 ytterligere tilbakemutasjoner ved restene 45, 83, 84 og 85. Se Tabell 1.

20

25

30

Tabell 1: Oppsummering av humaniserte VL-varianter fremstilt

<u>Konstruksjon</u>	<u>Akseptor/templat</u> <u>ramme</u> <u>("framework")</u>	<u>Tilbake-mutasjoner</u> <u>ved aa nr.</u> <u>(Kabat)</u>	<u>Totalt antall</u> <u>tilbake-</u> <u>mutasjoner</u>	<u>Human</u> <u>akseptor</u> <u>ramme</u> <u>("frame-</u> <u>work")</u>	<u>Opprinnelig</u> <u>rotte-</u> <u>sekvens</u>
L1	F_IGV1D-12-1/J2 (SEKV ID NR:38)	-----	Ingen	----	-----
L2	L1	71	1	F	Y
L3	L2	45 83 84 85	5	K F A T	Q E G D

8.2.2 Strategi for humanisering av tung kjede

For 2C10 rotte variabel tung kjede sekvensen ble en human kjønnselle akseptor ramme ("framework") valgt (Fp_IGHV1-f_2, SEKV ID NR:37) som hadde 59% identitet (omfattende CDRer) med rotte 2C10 variabel tung kjede. Kjønnselle V-regionen ble kombinert *in silico* med en egnet FR4, i dette tilfellet JH6 minigenet (Kabat Vol. II) basert på sekvenslikhet (SEKV ID NR:39). Tre humaniserte variabel tung kjede varianter ble utformet basert på denne rammen ("framework"). H1 er et graft av rotte CDRene (ved anvendelse av Kabat-definisjonen med 4 ytterligere tilbagemutasjoner ved restene 27, 28, 29 og 93. Dette tillot en svært uvanlig aminosyresekvens like oppstrøms for CDR1 av parentalt (dvs. donor) antistoff som kan utgjøre del av CDRen (som definert av Chotia). H2 var basert på H1 med to ytterligere tilbagemutasjoner ved restene 39 og 40. H3 var i sin tur basert på H2 med enda 4 ytterligere tilbagemutasjoner ved restene 36, 71, 89 og 91. Se Tabell 2.

Tabell 2: Oppsummering av humaniserte Vh-varianter fremstilt

Konstruksjon	Akseptor/templat rammer("framework")	Tilbake- mutasjoner ved aa nr. (Kabat)	Totalt antall av tilbake- mutasjoner	Human akseptor ramme("framework")	Opprinnelig rotte- sekvens
H1	Fp_IGHV1-f_2 (SEKV ID NR:37)	27 28 29 93	4	Y T L A	E I S T
H2	H1	39 40	6	Q A	R R
H3	H2	36 71 89 91	10	W E V Y	F A T F

8.3 Humanisering av 2C10C

5 Humaniserte V-regioner ble syntetisert *de novo* ved oppbygging av overlappende
oligonukleotid og PCR amplifisering. Primere omfattet restriksjons seter for kloning
inn i mammalske ekspresjonsvektorer og humane immunoglobulin signalsekvenser
for sekresjon. De humaniserte V-regionene ble klonet inn i mammalske
ekspresjonsvektorer som H1, H2 og H3 ved anvendelse av HindIII og SpeI
10 mammalske ekspresjonsvektorer inneholdende den humane gamma 1 konstante
regionen og som L1, L2 og L3 ved anvendelse av HindIII og BsiWI inn i
mammalske ekspresjonsvektorer inneholdende den humane kappa konstante
regionen. Dette dannet humaniserte tung kjede varianter av human IgG1 isotype
og humaniserte lett kjede varianter av human kappa isotype.

8.3.1 Ekspresjon av humanisert tung og lett kjede antistoff kombinasjoner

CHOK1-celler ble transient transfektert i fire eksemplarer. Supernatanter ble
analysert for antistoffkonsentrasjon og deretter anvendt i *in vitro* bindingsforsøk
20 ved sammenligning med 2C10 rotte-humane kimærer.

Transient ekspresjon i større skala for alle de 9 variantene ble utført ved å blande, for hver kolbe, 51,4 µg lett kjede plasmid og 8,6 µg tung kjede plasmid med 240 µg transfeksjons lipid (dette lipidet er beskrevet i WO2006/053783, eksempel 13, i 8 ml medium (OptiMEM/ glutamax/ 5%FBS) og anvendende denne blandingen i to nesten konfluente T175 kolber av CHOK1-celler i 72 timer under typiske vevskulturbetingelser. Antistoffer ble også uttrykt i et polyklonalt CHO-celle-system ved mg mengde ved anvendelse av ristekolber og rensset ved anvendelse av FPLC og protein A.

8.4 In vitro bindingsforsøk

8.4.1 Biacore-analyse

Biacore™ kinetisk analyse av de humaniserte 2C10 antistoffene ble utført i et Biacore™ 3000 instrument ved anvendelse av Protein A oppfangning av antistoffene i HBS-EP buffer (Biacore™). I korthet ble Protein A immobilisert på en CM5-chip ved primær amin binding, ved anvendelse av produsenters anbefalte fremgangsmåte, til tettheter rundt 2000-4000 resonans enheter (RU's). Humanisert antistoff ble deretter passert over protein A-overflaten og oppfanget til nivåer på ca. 200-500 RU's, etter en periode med stabilisering, ble IL18 (human eller Rhesus) passert over oppfanget antistoff-overflaten ved definerte konsentrasjoner og binding sensorgrammer ble oppnådd. Regenerering, ved anvendelse av sure elueringsbetingelser resulterte i total fjerning av det oppfangete antistoffet fra protein A-overflaten og reduserte ikke i betydelig grad overflatens bindingskapasitet. Alle kurver ble dobbelt referert mot en bufferinjeksjon istedenfor IL18 og dataene ble tilpasset til 1:1-bindingsmodellen ved anvendelse av global tilpasning-parametrene i BiaEval 4,1. Off-rate rangering forsøk ble satt opp ved anvendelse av samme Protein A oppfangings-metode, imidlertid ble kun en enkelt konsentrasjon av IL18 anvendt (10nM). Så lenge dataene ble tilpasset ved anvendelse av samme bindingsmodell som den kinetiske analysen, siden bare én konsentrasjon av analytt ble anvendt ved off-raten er angitt, er denne verdien anvendelig for rangering heller enn å gi en nøyaktig kinetisk måling og ble anvendt som en måte å selekttere hvilke antistoffer som ville undersøkes videre.

5 Initielle resultater ved 25°C indikerte at alle konstruksjonene hadde lignende bindingsaffiniteter til human IL18 som rotte 2C10 parentalt antistoff. Imidlertid, når et off-rate rangeringsforsøk ble utført ved 37°C, fungerte L1 konstruksjonene dårlig sammenlignet med L2 og L3-konstruksjonene med en økning sett i off-ratene (Tabell 3a og 3b).

Tabell 3a: Kinetiske parametere for Biacore-analyse av humane anti-IL18-antistoffer, analysert ved 25°C.

ANTISTOFF	<i>ka</i>	<i>Kd</i>	KD (pM)
2C10c	2,55e6 (7e4)	3,5e-5 (4,2e-6)	13,9 (2,2)
H1L1	1,4e6	4,7e-5	33,2
H1L2	1,3e6 (1,4e5)	3,85e-5 (1,5e-5)	30,3 (8,7)
H1L3	1,25e6 (2,1e4)	2,8e-5 (5,7e-6)	22,5 (7,2)
H2L1	1,03e6 (1,0e5)	3,35e-5 (1,1e-5)	33,5 (13,4)
H2L2	1,4e6 (1,4e5)	2,8e-5 (0,0)	20,1 (1,8)
H2L3	1,15e6 (7e5)	2,8e-5 (2,8e-6)	23,8 (0,7)
H3L1	2,5e6 (4,2e5)	4,7e-5 (9,9e-6)	19,4 (7,6)
H3L2	2,6e6 (2,8e5)	4,3e-5 (3,6e-6)	16,5 (2,7)
H3L3	1,7e6 (4,2e5)	4,0e-5 (5,7e-6)	24,2 (9,3)

Data resultatet av to forsøk, (standardavvik).

10

Tabell 3b: Off-Rate rangering Biacore-analyse av human IL18-binding til Protein A-oppfangede humaniserte anti-IL18-antistoffer, analysert ved 37°C

ANTISTOFF	kd
2C10c	7,01E-5
H1L1	1,62E-4

H1L2	4,81e-5
H1L3	5,54e-5
H2L1	9,93E-5
H2L2	4,15E-5
H2L3	4,62E-5
H3L1	1,3E-4
H3L2	8,22E-5
H3L3	7,01E-5

Data resultatet av ett forsøk

Så vel som å fungere dårlig ved 37°C, var L1-konstruksjonene også verst med hensyn til affinitet for binding til Rhesus IL18 (Tabell 4a) ved 25°C. Basert på disse observasjonene ble selekterte antistoffer undersøkt mer detaljert med hensyn til binding til human og Rhesus IL18 ved 37°C. Dataene vist i Tabell 4b for human IL-18 er gjennomsnittet (og standardavvik) av seks separate bestemmelse. Dataene for Rhesus IL-18 viser gjennomsnittet og standardavvik for to forsøk for H1L2 og H1L3, mens dataene for H3L2 og H3L3 er fra et enkelt forsøk. Det relativt høye standardavviket for disse data er sannsynligvis et resultat av gjennomføring av dette forsøket ved 37°C.

Det faktum at L1-konstruksjoner fungerte relativt dårlig er overraskende når en tar i betraktning at forskjellen mellom L1 og L2-konstruksjonen er substitusjonen av et fenylalanin ved en tyrosin tilbakemutasjon i posisjon 71 av den lette kjeden. Både tyrosin og fenylalanin er selvfølgelig aromatiske aminosyrer så det faktum at en slik lett endring i rammen ("framework") ga opphav til tydelige resultater (når det gjelder bindingsaffinitet) observert i Biacore™ systemet ved 37°C (men ikke 25°C) var uventet.

Tabell 4a: Kinetiske parametere for Biacore-analyse av Rhesus IL18 binding til humaniserte antistoffkonstruksjoner analysert ved 25°C.

ANTISTOFF	<i>ka</i>	<i>kd</i>	KD (pM)
2C10c	1,2E6	6,6E-5	54,7
H1L1	4,3E5	1,6E-4	380
H1L2	4,3E5	4,7E-5	108
H1L3	5,8E5	6,4E-5	109
H2L1	2,9E5	1,8E-4	627
H2L2	5,3E5	5,5E-5	104
H2L3	4,7E5	8,8-5	189
H3L1	9,1E5	1,4E-4	149
H3L2	1,1E6	6,6E-5	59,6
H3L3	1,0E6	7,0E-5	69,1

Data resultatet av ett forsøk.

Tabell 4b: Kinetiske parametere for Biacore-analyse av human og rhesus IL18 binding til selekterte humaniserte antistoff-konstruksjoner analysert ved 37°C.

Antistoff/IL18	<i>ka</i>	<i>Kd</i>	KD (pM)
H1L2			
Human IL18	7,75e5 (2,9e4)	1,38e-4 (1,7e-5)	197 (66,3)
Rhesus IL18	1,01e6 (9,2e5)	1,40e-4 (2,1e-5)	139 (8,5)
H1L3			
Human IL18	7,12e5 (2,5e4)	1,18e-4 (1,9e-5)	188 (81)
Rhesus IL18	1,08e6 (2,2e5)	1,86e-4 (6,1e-5)	170 (21,9)

H3L2			
Human IL18	1,52e6 (4,9e5)	1,45e-4 (2,2e-5)	105 (39,6)
Rhesus IL18	1,85e6	1,19e-4	64,3
H3L3			
Human IL18	1,49e6 (4,5e5)	1,52e-4 (1,7e-5)	110 (36,1)
Rhesus IL18	1,79e6	1,35e-4	75,6

Variantene H1L1, H1L2 og H1L3 ble valgt for videre analyse i avsnitt 7.4.2 nedenfor.

5 **8.4.2 Biacore-analyse T100-data**

Karakterisering av visse variant antistoffer ble videre utført ved anvendelse av T100 Biacore™-maskinen. Denne maskinen gir fordeler fremfor Biacore™ 3000, når det gjelder sensitivitet, temperaturkontroll og stabilitet av baselinje ved høyere temperaturer på grunn av anvendelse av en in-line gassutskiller som begrenser buffereffekter ved høyere temperaturer. Den tilbyr også forbedret programvare slik som automatisk dataanalyse.

Metodologien var stort sett den samme som for metoden anvendt i avsnitt 8.4.1 ovenfor; Protein A ble immobilisert på en CM5-chip ved tettheter på mellom 2000-6000RU's ved primær amin kobling. Kjøringer ble utført i HBS-EP (Biacore™). Anti-IL18-antistoffene ble oppfanget til tettheter på mellom 100-500 RUs, human IL18 ble passert over denne oppfangede overflaten ved konsentrasjoner på mellom 16-0,0625 nM, hvor en konsentrasjon på 0nM (dvs. en buffer kun-injeksjon av oppfanget antistoff) ble anvendt for dobbelt referanse. Regenerering etter hver injeksjon av IL18 var ved svakt sur eluering ved anvendelse av to injeksjoner av 10mM glysin, pH1,5. Dette regenereringstrinnet fjernet det oppfangede antistoffet fra protein A-overflaten (og følgelig eventuell IL18 bundet til det). Regenereringen endret ikke betydelig protein A-overflatenes evne til å binde senere pulser av antistoff, hvilket tillater at det inntreffer en ny oppfangings-hendelse.

25 Bindingskurvene oppnådd ble analysert ved anvendelse av analyseprogramvare

tilknyttet T100-maskinen ved anvendelse av 1:1-modellen for binding. Kjøringer ble utført ved de angitte temperaturene.

Analyse av binding av H1L1 og H1L2 ved 15°C, 20°C, 25°C, 32°C og 37°C

- 5 Forsøket ble utført ved anvendelse av metoden ovenfor ved ulike temperaturer. Figur 1 viser effekten av temperatur på on-raten (k_a), mens Figur 2 viser effekten på off-rate (k_d) og Figur 3 effekten på likevektskonstanten (K_D). Tabell 5 viser i detaljer de kinetiske verdiene anvendt for å danne disse figurene.

10 **Tabell 5: Kinetiske parametere fra temperaturvariasjon-forsøket**

Temp °C	Antistoff	K_a	K_d	K_D (pM)
15	H1L1	1.49e6	2.98e-5	20.1
	H1L2	2.07e6	2.07e-5	10.0
20	H1L1	2.02e6	4.77e-5	23.7
	H1L2	2.84e6	2.53e-5	8.9
25	H1L1	2.52e6	7.82e-5	31.1
	H1L2	3.37e6	4.22e-5	12.5
32	H1L1	3.48e6	1.64e-4	47.2
	H1L2	4.51e6	8.57e-5	18.9
37	H1L1	6.30e6	3.36e-4	53.3
	H1L2	5.89e6	1.31e-4	22.3

Dataene er fra et enkelt forsøk.

- 15 Dataene viser at on-ratene for de to antistoffene testet er lignende over temperaturområdet testet, hvor H1L2 generelt har en raskere on-rate inntil den endelige verdien ved 37°C hvor H1L2 har en raskere on-rate. Imidlertid ses en større forskjell når en betrakter off-rater, de to antistoffene har lignende off-rater ved 15°C, 20°C, 25°C, men begynner å divergere ved 32°C og 37°C, hvor den raskeste off-raten ses for H1L1. Disse endringene reflekteres i den totale
- 20 likevektskonstanten (som er en funksjon av k_d/k_a) og indikerer at forskjellen mellom H1L1 og H1L2 hovedsakelig er i stabiliteten av antistoff/IL18-komplekset som definert ved off-raten (k_d).

Analyse av binding av H1L1, H1L2, H1L3 og kimær 2C10 ved 25°C og 37°C

Forsøkene ble utført som beskrevet ovenfor. Tabell 6 viser i detaljer de kinetiske parametrene oppnådd. Dataene viser at H1L2 er et bedre antistoff enn H1L1 når det gjelder binding som definert ved likevektskonstanten KD både ved 25°C og 37°C, men de kinetiske parametrene viser at ved 25°C har H1L2 en bedre on-rate (ka) enn H1L1. Ved 37°C er situasjonen omvendt hvilket indikerer at den bedre bindingen sett ved 37°C ved H1L2 er mer beroende på off-raten (kd), hvilket indikerer at mutasjonen som skjelner L2 fra L1 gir økt stabilitet av IL18-antistoffkomplekset ved høyere temperaturer.

Tabell 6: Kinetikk av H1L1, H1L2, H1L3 og kimær 2C10 binding til human IL18 ved 25 °C og 37°C

<i>Human IL18 ved 25 °C</i>				<i>Human IL18 ved 37 °C</i>			
Antistoff	Ka	Kd	KD (pM)	Antistoff	Ka	Kd	KD (pM)
H1L1 (n=4)	2.49e6 (4.41e5)	7.94e-5 (1.02e-5)	33.1 (9.3)	H1L1 (n=6)	5.64e6 (2.42e6)	4.58e-4 (1.02e-4)	94.3 (39.6)
H1L2 (n=4)	2.88e6 (7.39e5)	4.32e-5 (9.75e-6)	16.3 (7.0)	H1L2 (n=6)	4.86e6 (1.88e6)	1.98e-4 (5.20e-5)	46.0 (18.8)
H1L3 (n=3)	2.36e6 (9.89e5)	4.53e-5 (7.46e-6)	22.0 (9.9)	H1L3 (n=3)	6.43e6 (8.10e6)	2.11e-4 (4.84e-5)	64.8 (57.3)
Kimær 2C10 (n=3)	6.88e6 (3.22e6)	5.22e-5 (8.94e-6)	9.1 (4.7)	Kimær 2C10 (n=2)	2.55e7 (1.25e7)	5.62e-4 (1.97e-4)	22.9 (3.5)

Dataene er gjennomsnittet av flere separate datasett (n), gjennomsnitt og standardavvik er vist, hvor standardavvik er i parentes. Verdiene for kjøringene ved 25°C og 37°C for H1L1 og H1L2 oppnådd fra analyse ved fem forskjellige temperaturer er omfattet i disse datasettene.

8.4.3 Bedømmelse av 2C10c humaniserte varianter i IL18 bindings ELISA

ELISA med alle ni humaniserte varianter ble utført minst 6 ganger ved anvendelse av forskjellige batcher av rensset antistoffpreparat. Figurene 4A-4C viser

representative data fra ett forsøk som dannet EC50 verdi-rangeringen illustrert i Tabell 7. Human IL-18 ble immobilisert på Nunc Maxisorp 96-brønners plater ved anvendelse av 2,5ug/ml 16D10 (ikke-nøytraliserende mus monoklonalt antistoff) for å oppfange 5ng/ml rekombinant human IL-18. Anti-IL-18 humaniserte antistoffer ble tilsatt ved forskjellige fortyndninger. Bundne humaniserte antistoffer ble detektert ved anvendelse av anti-human IgG Fc spesifikt peroksidase konjugat (Sigma A0170).

Tabell 7: Økende EC50-verdier for humaniserte varianter av 2C10

(uttrykt i [$\mu\text{g/ml}$])

	2C10c	H3L2	H3L3	H1L1	H1L2	H1L3	H2L2	H3L1	H2L3	H2L1
EC50*	0,007	0,008	0,009	0,010	0,011	0,011	0,012	0,013	0,016	0,021

*Alle SE var mellom 0,001 og 0,002

Styrken av alle varianter viste seg å være svært nær 2C10 kimærer hvilket indikerer at humanisering hadde ført til lite tap av potens. Selv om EC50-verdiene dannet ved mange repetisjoner av disse analysene dannet en rangering av varianter, tillot ikke ELISA alene en tydelig skjelning mellom disse variantene (se Tabell 7 og Figurene 4A-4C). En viss skjelning av varianter ble oppnådd ved anvendelse av Biacore™ (avsnittene 8,4,1 og 8,4,2) hvilket resulterte i at kun 4 varianter ble undersøkt nærmere i mange uavhengig gjentatte forsøk ved anvendelse av human og rhesus IL18 (Tabell 8, Figur 5 [human] og 6 [rhesus]).

Tabell 8: EC50-verdier for seks uavhengig repeterte forsøk med fire valgte humaniserte varianter for binding til human IL18.

	Eksp. 1/1	Eksp. 1/2	Eksp. 2/1	Eks.2 /2	Eksp. 3/1	Eksp. 3/2	Gjennomsnitt	SE
2C10c	0,015	0,016	0,013	0,011	0,020	0,020	0,0158	0,004
H1L2	0,029	0,030	0,021	0,025	0,024	0,027	0,0260	0,003
H1L3	0,027	0,025	0,029	0,028	0,029	0,027	0,0275	0,002
H3L2	0,032	0,030	0,026	0,018	0,025	0,022	0,0255	0,005
H3L3	0,035	0,028	0,018	0,021	0,025	0,025	0,0253	0,006

8.4.4 Bedømmelse av 2C10 humaniserte H1 varianter i IL-18 bindings ELISA

ELISA ble utført med de tre humaniserte H1-variantene; H1L1, H1L2 og H1L3 for å bedømme binding til human IL-18 ved romtemperatur og ved 37 °C i både humant serum og i blokkeringsløsning (PBS 0,05% TWEEN med 1% BSA (vekt/volum)). De humaniserte antistoff-variantene ble immobilisert på Nunc Maxisorp 96-brønns plater ved 2,5 µg/ml. Oppfanging av 5 ng/ml rekombinant human IL-18 ble utført enten ved romtemperatur eller 37°C i humant serum eller blokkeringsløsning. Anti-IL-18 mus monoklonalt antistoff 16D10 ble tilsatt. Det bundne mus antistoffet ble detektert ved anvendelse av anti-mus kappa peroksidase konjugat (Serotec MCA 1291P). Representative EC50-verdier dannet fra studie-data er illustrert i Tabell 9.

Tabell 9 – EC50-verdier for 2C10 humaniserte H1-varianter ved romtemperatur og ved 37 °C

	EC50 (ng/ml)	Standard- avvik
Romtemperatur inkuberinger		
I nærvær av serum:		
2C10 Kimærer	7,296	0,358
H1L1	10,189	0,512
H1L2	9,791	0,471
H1L3	8,989	0,411
I blokkeringsbuffer:		
2C10 Kimærer	3,814	0,068
H1L1	3,315	0,136
H1L2	3,552	0,079
H1L3	3,790	0,133
37°C inkuberinger		
I nærvær av serum:		
2C10 Kimærer	10,140	1,254
H1L1	12,069	0,740
H1L2	9,791	0,471
H1L3	11,438	1,861
I blokkeringsbuffer:		
2C10 Kimærer	3,794	0,114
H1L1	3,430	0,104
H1L2	3,404	0,145
H1L3	3,334	0,222

Potensen av de tre humaniserte H1 variantene er upåvirket av endring av temperaturen ved hvilken det humane IL-18 bindingstrinnet blir utført, fra

romtemperatur til 37°C i dette forsøket. Lavere bindingssignaler er observert når antistoffene er til stede i humant serum.

8.4.5 Bedømmelse av stabilitet av humaniserte H1 variant antistoffer ved 37°C

Lagringsstabilitet av de tre humaniserte H1 variantene; H1L1, H1L2 og H1L3 ble bedømt over en tidsperiode på 14 dager ved 37°C i både humant serum og fosfatbufret saltoppløsning. Antistoffer ble fortynnet til 50 µg/ml, stabilitet ble bedømt ved IL-18 bindings ELISA etter inkuberingsperioder på 0, 1, 4, 6, 8 og 14 dager ved 37°C. For IL-18 bindings ELISA, ble 16D10 (ikke-nøytraliserende mus monoklonalt antistoff) immobilisert på Nunc Maxisorp-plater for å oppfange 5ng/ml rekombinant human IL-18. Anti-IL-18 humaniserte antistoffer oppsamlet ved forskjellige tidspunkter i løpet av 37°C tidsforløp inkuberingen ble tilsatt. Bundne humaniserte antistoffer ble detektert ved anvendelse av anti-human IgG Fc spesifikt peroksidase-konjugat.

Forlenget eksponering for en temperatur på 37°C i 0, 1, 4, 6, 8 og 14 dager påvirket ikke bindingsstyrken for de humaniserte H1 antistoff-variantene basert på deres evne til å binde til human IL-18 i dette analyseformatet.

8.5 Binding av H1L2 til human IL18 i nærvær av synovialvæske

En ELISA ble utført hvor 50% human synovialvæske ble spiket med rekombinant human IL18 i området fra 500ng/ml til 0ng/ml. IL-18 inneholdt i denne løsningen ble deretter applisert i brønner i en Maxisorp 96-brønns plate (Nunc) belagt med H1L2-antistoffet. Bundet IL-18 ble deretter detektert gjennom et biotinyleret anti-IL-18 antistoff (D045-6, MBL) og streptavidin-HRP. Titrering av rekombinant human IL18 i 50% synovialvæske (SF) frembrakte nesten samme kurve som titrering av human rekombinant IL-18 i buffer med kun et liten endring i halv maksimal verdi. Se Figur 7. Dette demonstrerer evnen av antistoffet til å binde hIL-18 selv i nærvær av 50% human SF som nærmere etterligner bindings omgivelsene antistoffet vil møte i en terapeutisk setting.

8.5.1 Binding til IL18 i nærvær av IL18 bindingsprotein (IL18bp)

5 Biacore™ teknologi (Biacore™ 3000) og ELISA ble anvendt for å bestemme hvorvidt H1L2 fortsatt kan binde human IL18 i nærvær av human IL18bp. IL18bp har høy affinitet for IL18 og fungerer som en naturlig inhibitor av IL-18-funksjon (Figur 8, Figur 9 A og B, Tabell 10 og Tabell 11).

Analyse ved Biacore

10 I korthet ble Protein A immobilisert på en CM5-chip til en overflate til en tetthet på ca. 4000 resonans enheter (RU) ved primær amin kobling. Rekombinant Fc-IL18-bindende protein (R&D Systems), ble deretter passert over i en konsentrasjon på 3µg/ml ved en strømningshastighet på 10µl/minutt i 1 minutt; dette resulterte i oppfangning av ca. 1400 RU av IL18-bindende protein. IL18 ble deretter passert over overflaten med det oppfangede IL18-bindende proteinet i en konsentrasjon 15 på 30nM, ved en strømningshastighet på 10µl/minutt i 5 minutter. Etter dette ble rotte 2C10 parentalt antistoff i en konsentrasjon på 10nM passert over IL18-bindende protein/IL18-overflaten i 3 minutter ved en strømningshastighet på 30. µl/minutt i 3 minutter. Skulle epitopen gjenkjent av 2C10 antistoffet på IL18 interferere med setet for interaksjon for IL18-bindende protein så skulle ingen 20 bindingssignal ses. Figur 10 viser at 2C10 blir bundet til hIL-18 som i sin tur var blitt oppfanget av hIL-18BP, hvilket indikerer at bindingssetene for 2C10 og hIL-18BP ikke er overlappende.

Tabell 10: Effekt av IL-18BP på IFN γ sekresjon revmatoid artritt (RA) synovialceller

25

Prøve, IL-18BP status	Kontroll	IL-12	IL-18	IL-12 + IL-18
RA1	ND	0.63	ND	1.63
+	ND	0.29	ND	0.13
RA2	ND	0.86	ND	0.70
+	ND	0.10	ND	0.10
RA3	ND	1.06	ND	1.62
+	ND	0.32	ND	0.40

Kawashima, M. og Miossec, P., Arthritis & Rheumatism, Vol. 48, nr. 3 (mars 2003), s. 631 - 637

Analyse ved ELISA

- 5 Binding av humanisert H1L2 eller 2C10 rotte MAb til human IL18 bundet oppfanget IL18bp ble testet i direkte bindings ELISAer hvor rekombinant human IL18bp-Fc fusjonsprotein (R&D Systems #119-BP) ble belagt på Nunc Maxisorp plater ved 0,5 µg/ml. Rekombinant human IL18 (intern reagens) ble tilsatt ved 100ng/ml i blokkeringsbuffer (PBS inneholdende 1% vekt/volum BSA). Rensede antistoffer ble tilsatt i konsentrasjoner i området fra 0,5 ng/ml til 1µg/ml. Bundet antistoff ble detektert med anti-human kappa lett kjede spesifikt HRP konjugat (Sigma) eller anti-rotte IgG HRP. Figur 18A og B illustrerer resultatene oppnådd.

8.6 In vitro bioanalyse

15 8.6.1 Aktivitet av humaniserte konstruksjoner i nøytraliserende IL18 stimulert IFN-γ frigjøring i KG-1 celledinje

- 20 Dette forsøket måler den nøytraliserende aktiviteten av antistoff spesifikt for IL-18 og er basert på IL-18-mediert induksjon av IFNγ i KG-1-celler. KG-1 (ATCC nr.CCL-246) er en human myelomonocytisk celledinje som konstitutivt uttrykker funksjonell IL-18 reseptor og, derfor, responderer på eksogen IL-18 stimulering.

Alle ni humaniserte varianter ble bedømt for deres evne til å hemme human IL18 stimulert IFN-γ frigjøring i KG-1-celler (Tabell 12 og Figur 11).

Tabell 12: IC50-verdier for nøytralisering av rekombinant human IL18 i KG-1 bioanalyse ved anvendelse av alle ni humaniserte varianter

Antistoff	IC50
H1L1	0,071
H1L2	0,033
H1L3	0,027
H2L1	0,145
H2L2	0,054
H2L3	0,046
H3L1	0,027
H3L2	0,035
H3L3	0,034
2C10(1)	0,042
2C10(2)	0,039

Minst 6 ytterligere gjentatte forsøk ble utført ved fire foretrukne humaniserte varianter som hadde vist best affinitet for rekombinant human og rhesus IL18 basert på Biacore™ -analyse. Figur 8 illustrerer et representativt resultat for de fire foretrukne humaniserte variantene og for H1L1 og Tabell 13 oppsummerer resultatene av disse forsøkene alle utført med samme protein batch-materiale avledet fra CHOe1a-celler.

Tabell 13: IC50-verdier for nøytralisering av rekombinant human IL18 i KG-1 bioanalyse ved anvendelse av 4 eller 5 valgte humaniserte varianter

	Gjennom snitt 2C10 IC50	(H1L1)	(H1L2)	(H1L3)	(H3L2)	(H3L3)	IL-18 bp
Forsøk 1	0,046	n.d.	0,062	0,064	0,064	0,057	n.d.
Forsøk 2	no fit	n.d.	ingen til- pasning	ingen til- pasning	ingen til- pasning	ingen til- pasning	n.d.
Forsøk 3 Plate 1	0,074	n.d.	0,109	0,144	0,090	0,091	n.d.
Forsøk 3 Plate 2	0,075	n.d.	0,173	0,156	0,128	0,115	n.d.
Forsøk 4	0,017	0,091	0,017	0,044	no fit	0,016	ingen til- pasning
Forsøk 5 (Est. EC80)	0,075	0,757	0,122	0,085	0,072	0,056	0,054
Forsøk 5 (Est. EC50)	0,044	0,180	0,047	0,046	0,039	0,038	0,034
Forsøk 6 (Est. EC80)	ingen til- pasning	0,078	0,023	0,021	ingen til- pasning	0,013	0,007
Forsøk 6 (Est. EC50)	0,020	0,069	0,019	0,019	0,015	0,016	0,01

I tilfeller hvor H1L1 ble sammenlignet med andre humaniserte varianter, viste H1L1 lavere potens sammenlignet med de andre fire humaniserte konstruksjonene testet og også sammenlignet med 2C10 parental MAb.

- 5 Videre analyse ble utført med de fire foretrukne monoklonale antistoffene, som ble sammenlignet med hensyn til kapasiteten til å hemme IL-18-stimulert INF γ -frigjøring ved KG-1-celler: 2C10 og de humaniserte variantene avledet fra 2C10 (H1L1, H1L2 og H1L3). KG-1 bioanalysen ble utført i 96-brønns plater ved inkubering av 50 ng/ml rekombinant human IL-18 og forskjellige konsentrasjoner
10 av antistoffene spesifikke for IL18 (i området fra 2 μ g/ml til 7,8 ng/ml, i dobbelte fortynnninger) eller en negativ isotype-kontroll (Synagis, anti-RSV antistoff) i 1 time ved 37°C og 5%CO₂, fulgt av tilsetning av 3,10⁵ KG-1-celler pr. brønn. Platene ble til slutt inkubert i 20-24 timer ved 37°C, 5%CO₂. Supernatanten ble høstet og IFN γ -produksjon ble bestemt ved anvendelse av et kommersielt human IFN γ
15 ELISA kit (Biosource AHC4432; AHC4539).

- Tre forsøk har blitt utført. Resultatene for hemning av IL-18-stimulert IFN γ -produksjon ble normalisert til den negative kontrollen. Den statistiske analysen hadde til formål å oppnå et IC₅₀ estimat for hver mAb ved hvert forsøk etter
20 justering for enhver Synagis-respons. IC₅₀-estimatene ble deretter statistisk analysert for å frembringe et totalt estimat av IC₅₀ for hver mAb med et 95% konfidensintervall (dvs. statistisk rimelig område). Hver humaniserte variant ble til slutt sammenlignet tilbake til 2C10 ved anvendelse av Dunnett's test.

- 25 Figur 12 illustrerer et representativt forsøk. Tabell 14 og Figur 13 viser et totalt estimat av IC₅₀ for hvert monoklonalt antistoff med et 95% konfidensintervall og % endring fra rotte 2C10 med p-verdier og konfidensintervaller.

Tabell 14: IC₅₀-verdier for nøytralisering av IL18-stimulert INF γ -produksjon i KG-1 bioanalyse

30

Monoklonalt antistoff	Gjennomsnittlig IC ₅₀ μ g/ml (95% CI)	% forandring versus 2C10 (95%CI)	Dunnett p-verdi
-----------------------	--	----------------------------------	-----------------

2C10	0,095 (0,071,0,127)	-	-
H1L1	0,352 (0,264,0,470)	269,4 (117,2,528,2)	0,0001
H1L2	0,154 (0,112,0,211)	61,5 (-7,6,182,0)	0,0968
H1L3	0,164 (0,121,0,221)	71,6 (-0,4,195,8)	0,0519

H1L1 er statistisk signifikant mindre potent enn 2C10 ($p < 0,001$).

De andre humaniserte variantene er ikke betydelig forskjellig fra 2C10, selv om sammenligningen for H1L3 versus 2C10 er grenselinje.

5

8.6.2 Aktivitet av H1L2 ved nøytralisering av IFN- γ -frigjøring i stimulerede humane PBMCer

10

Human PBMC fra tre donorer ble stimulert med rekombinant human IL18 og anti-CD3 antistoff og effekten av tilsetning av en fortynningsserie av de fire valgte humaniserte antistoff-variantene studert. For hver donor ble parentalt 2C10-antistoff og IL18bp inkludert for sammenligning. For to av de tre donorene var IL18 og anti-CD3 stimulering mislykket og ingen IFN- γ ble detektert. For den gjenværende donoren var resultater svært variable i lave konsentrasjoner men en fullstendig hemning av IL18-indusert IFN- γ produksjon kunne oppnås ved tilsetning av forskjellige anti-IL18 antistoffer inkludert humaniserte varianter. Se Figur 14.

15

20

Forsøk ble også utført med LPS-stimulerte humane PBMCer hvilket resulterer i IL18-produksjon og assosiert IFN γ -frigjøring. IFN γ -produksjon ble indusert ved LPS på en konsentrasjonsavhengig måte og tilsetning av 2C10 parentalt monoklonalt antistoff ved en fastsatt konsentrasjon på 1 μ g/ml hemmet denne stimuleringen fullstendig, hvilket indikerer at effekten er IL18-mediert og at endogen IL18 kan nøytraliseres (data ikke vist). Dette kunne også demonstreres i fullblod men hemningseffekten med 2C10, skjønt doseavhengig, var mindre åpenbar (data ikke vist). Figur 9 illustrerer resultater fra et forsøk med 3 uavhengige donorer og hemning med parental rotte monoklonal 2C10, H1L2 og IL18bp. Donor 1 og 3 ga lignende resultater mens donor 2 ikke viste noen IFN γ -frigjøring ved stimulering med LPS (ikke vist). IL18-mediert IFN γ -frigjøring kan bli fullstendig hemmet i nærvær av 10% eller 25% av humant serum ved tilsetning av >1 μ g/ml antistoff eller IL18bp. Hemning kan allerede observeres ved 10ng/ml og

25

30

over og IC50-verdier for denne hemningen i nærvær av 10% eller 25% humant serum er vist i Tabell 11.

5 **Tabell 11: IC50-verdier for hemning av LPS-stimulert IFN γ -frigjøring forårsaket av endogen IL18-nøytralisering ved anvendelse av 2C10, H1L2 eller IL18bp i nærvær av humant serum**

	IL18bp	H1L2	2C10
Donor 1 10% serum	0,024	0,102	0,023
Donor 1 25% serum	0,064	0,113	0,069
Donor 3 10% serum	0,032	0,042	0,033
Donor 3 25% serum	0,046	0,108	0,086

8.6.3 Oppsummering av binding til IL18 ortologer

10 Binding av antistoff med IL18 fra andre arter ble undersøkt ved anvendelse av ELISA og Biacore og også KG-1 celle bioanalyse. Dette ble initielt utført ved anvendelse av parental 2C10 og kimær 2C10c for rhesus/cynomolgus IL18 men ble gjentatt med noen av de humaniserte variantene. Parental 2C10 ble testet for binding til gris, mus og rotte IL18 og de 4 beste humaniserte variantene ble testet for binding til rhesus/cynomolgus og hund IL18 ved anvendelse av Biacore og

15 ELISA. KG-1 bioanalyse ble utført med rhesus/cynomolgus IL18 og tre monoklonale antistoffer, 2C10 kimær og representativt for de humaniserte variantene, H3L3. Gitt likheten av alle humaniserte varianter er dette sannsynligvis representativt for andre varianter dannet omfattende H1L2 (se Tabell 15, Figur 8).

20 **Tabell 15: Oversikt over ortolog binding av 2C10 parental rotte MAb, rotte-humane kimærer 2C10c og valgt samling av 4 humaniserte varianter**

	Rhesus/Cynomolgus IL18	Hund IL18	Mus & Rotte IL18	Gris IL18
2C10 rotte MAb	ELISA (+) KG-1 (+)	ELISA (-)	ND	ND

2C10 kimær (rotte/human)	ELISA (+)	ELISA (-)	ELISA (-)	ELISA (-)
	KG-1 (+)	Biacore™ (-)	Biacore™ (-)	Biacore™ (-)
	Biacore™ (+)			
Humanisert (H1L2, H1L3, H3L1, H3L3)	ELISA (+)	ELISA (-)	ELISA (-)	ELISA (-)
	KG-1 (+) kun H3L3 testet			
	Biacore™ (+)			

ND ikke bestemt; + detekterbar binding

8.7 Sirkulær dikroisme og termisk denaturering-studier av IL18-antistoffer

5 Sirkulær dikroisme (CD)-studier ble anvendt for å undersøke de sekundære strukturelle endringene av IL18-antistoffene som en funksjon av temperatur, spesielt fra 25°C til 37°C. Termisk denaturering-studier av disse samme antistoffene ble utført for å bestemme deres termiske stabilitet og deres smeltetemperaturer (T_m.)

10

CD Metode: CD-spektra ble oppnådd i et Applied Photophysics Chirascan spektrometer ved scanning fra 180nm-280nm i trinn på 0,5nm og båndbredde på 1nm. Akkvisisjon tiden pr. punkt var 5s. Prøvene ble fortynnet til ~ 0,2 mg/ml i PBS og plassert i en 1mm bane lengde celle. Spektra for hvert protein ble tatt med det

15 termostatiske badet innstilt ved 4°C, 25°C og 37°C. De nøyaktige temperaturene av prøvene ble bestemt ved en sonde plassert i hoveddelen av væsken inne i cellen og var innenfor ~3°C av den innstilte temperaturen.

15

T_m-metode: Alle proteiner ble fortynnet til 0,2 mg/ml i 1:1000 Sypro oransje i

20 fosfatbufret saltoppløsning (PBS). Fluorescensemisjonen ble målt ved 620nm (eksitasjon ved 490nm) ved anvendelse av et Bioneer Exicycler instrument ved hvert 0,5°C intervall mens prøvetemperaturen ble økt fra 10°C til 95°C med ventetid 10s ved hvert temperaturpunkt. Denaturerings kurvene ble tilpasset til en standard smelte isoterm ved anvendelse av Grafit.

20

25

Som forventet viste sammenligning av formen av CD-spektrene fra alle fire antistoffene at deres struktur er høyst beta sheet og av hovedsakelig samme oppbygning. I temperaturområdet fra 4°C-37°C viser de tre antistoffene:

H1L1

5

H1L2

H1L3

ingen signifikante endringer i deres sekundærstruktur, som vist ved CD. Imidlertid viste 2C10 antistoff kimærene en svak reduksjon i struktur i dette temperaturområdet. Dette er i overensstemmelse med termisk stabilitet-tendensen gitt i Tabell 16 nedenfor.

10

Tabell 16: Termisk denaturering av IL18-antistoffer

Antistoff	H1L1	H1L2	H1L3	kimærer
T _m	73°C	70°C	67°C	65°C

T_m = denaturering/smeltetemperatur

15

H1L1, H1L2 og H1L3 er tydelig stabil langt utover 37°C uten tegn på noen denaturering ved kroppstemperatur. Det er derfor usannsynlig at deres forskjell i termisk stabilitet gir noen differensierte fordeler ved normal kropps- og omgivelsestemperatur.

20

SEKVENSER

SEQ. I. D. NO: 1

GYYPH

25

SEQ. I. D. NO: 2

RIDPEDDSTKYAERFKD

SEQ. I. D. NO: 3

30

WRIYRDSSGRPFYVMDA

SEQ. I. D. NO: 4

LASEDIYTYLT

SEQ. I. D. NO: 5

GANKLQD

5 SEQ. I. D. NO: 6

LQGSKFPLT

SEQ. I. D. NO: 7

MAAEPVEDNCINFMVKFIDNTLYFIAEDDENLESDFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSD
 10 CRDNAPRTIFIISMYSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFQRSVPBGH
 NKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNE

SEQ. I. D. NO: 8

ATGGCTGCTGAACAGTAGAAGACAATTGCATCAACTTTGTGGCAATGAAATTTATTGACAATACGCTTTACT
 15 TTATAGCTGAAGATGATGAAAACCTGGAATCAGATTACTTTGGCAAGCTTGAATCTAAATTATCAGTCATAAG
 AAATTTGAATGACCAAGTTCTCTTCATTGACCAAGGAAATCGGCCTCTATTTGAAGATATGACTGATTCTGAC
 TGTAGAGATAATGCACCCCGGACCATATTTATTATAAGTATGTATAAAGATAGCCAGCCTAGAGGTATGGCTG
 TAACTATCTCTGTGAAGTGTGAGAAAATTTCAACTCTCTCTGTGAGAACAAAATTATTTCTTTAAGGAAAT
 GAATCCTCTGATAACATCAAGGATACAAAAGTGACATCATATTCTTTTCTAGAGAAGTGTCAGGACATGAT
 20 AATAAGATGCAATTTGAATCTTCATCATACGAAGGATACTTTCTAGCTTGTGAAAAAGAGAGAGACCTTTT
 AACTCATTTTGAAAAAGAGGATGAATTGGGGGATAGATCTATAATGTTCACTGTTCAAACGAAGACTAG

SEQ. I. D. NO: 9

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGEISTGYFHWVRQAPGKGLEWMGRIDPEDDSTKYAERFKDRVMTMED
 25 TSTDYAMELSSLRSEDYAVYYCTTWRIYRDSSGRPFYVMDAWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
 GTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
 VDCKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDLNGLKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH
 30 EALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ. I. D. NO: 10

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGCGCCAGCGTCAAGGTGTCCTGTAAGGTGT
 CCGGCGAGATCAGCACCGGCTACTACTTCCACTGGGTGAGGCAGGCCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGATGGG
 35 CAGAATCGACCCCGAGGACGACAGCACCAAGTACGCCGAGCGGTTCAAGGACAGGGTGACCATGACCGAGGAC
 ACCAGCACCGATACCGCCTACATGGAGCTGTCCAGCCTGAGAAGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTACCA
 CCTGGCGGATCTACAGAGACAGCAGCGGCAGACCCTTCTACGTGATGGATGCCTGGGGCCAGGGCACACTAGT
 GACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTTGGCCCCAGCAGCAAGAGCACCGCGGC
 GGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAG
 40 CCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGT

GACCGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAG
 GTGGACAAGAAGGTGGAGCCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGC
 TGGGAGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGT
 GACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
 5 GTGACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCG
 TGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCTAT
 CGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGAT
 GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
 GGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAATAACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTT
 10 CCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCTCCGTGATGCAC
 GAGGCCCTGCACAATCACTACACCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAGTGA

SEQ. I. D. NO: 11

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGEISTGYFHWVRQAPGKLEWMGRIDPEDDSTKYAERFKDRVMTMED
 15 TSTDYAMELSSLRSEDYAVYYCTTWRIYRDSSGRPFYVMDAWGQGTLLTVSS

SEQ. I. D. NO: 12

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGCGCCAGCGTCAAGGTGTCTGTAAAGGTGT
 CCGGCGAGATCAGCACCGGCTACTACTTCCACTGGGTGAGGCAGGCCCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGG
 20 CAGAATCGACCCCCGAGGACGACAGCACCAAGTACGCCGAGCGGTTCAAGGACAGGGGTGACCATGACCGAGGAC
 ACCAGCACCGATACCGCCTACATGGAGCTGTCCAGCCTGAGAAGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTACCA
 CCTGGCGGATCTACAGAGACAGCAGCGGCAGACCCTTCTACGTGATGGATGCCTGGGGCCAGGGCACACTAGT
 GACCGTGTCCAGC

SEQ. I. D. NO: 13

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCLASEDIYTYLTWYQQKPGKAPKLLIYGANKLQDGVPSRFSGSGSGTDYTL
 TISSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ. I. D. NO: 14

GATATCCAGATGACCCAGTCCCCCAGCAGCGTGTCCGCCTCTGTGGGCGATAGAGTGACCATCACCTGCCTGG
 CCAGCGAGGACATCTACACCTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTA
 CGGCGCCAACAAGCTGCAGGACGGCGTGCCAGCAGATTACGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACACCCTG
 ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTTGCCACCTACTACTGCCTGCAGGGCAGCAAGTTCCCCCTGACCT
 35 TCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCAGCGA
 TGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAATTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTG
 CAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACT
 CCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGA
 GGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

SEQ. I. D. NO: 15

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCLASEDIYTYLTWYQQKPGKAPKLLIYGANKLQDGVPSRFSGSGSGTDYTL
TISSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKLEIK

5 SEQ. I. D. NO: 16

GATATCCAGATGACCCAGTCCCCCAGCAGCGTGTCCGCCTCTGTGGGCGATAGAGTGACCATCACCTGCCTGG
CCAGCGAGGACATCTACACCTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTA
CGGCGCCAACAAGCTGCAGGACGGCGTGCCAGCAGATTAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACACCTG
ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTTGCCACCTACTACTGCCTGCAGGGCAGCAAGTTCCCCCTGACCT
10 TCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

SEQ. I. D. NO: 17

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGEISTGYYFHWVRRRPGKLEWMGRIDPEDDSTKYAERFKDRVMTED
TSTDYAYMELSSLRSEDTAVYYCTTWRIYRDSSGRPFYVMDAWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
15 GTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

20 SEQ. I. D. NO: 18

CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGTTT
CCGGAGAAATAAGTACTGGATACTATTTCCACTGGGTGCGACGAAGGCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGG
AAGGATTGATCCTGAGGATGATAGTACTAAATATGCTGAGAGGTTCAAAGACAGAGTCACCATGACCGAGGAC
25 ACATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTACCA
CATGGCGGATATACCGAGATAGTTCTGGCCGCCCTTCTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACACTAGT
CACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG
GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCG
CCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT
30 GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG
GTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCC
TGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTACCG
35 TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCAT
CGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAT
GAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
40 GAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA

SEQ. I. D. NO: 19

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGEISTGYIFHWVRRRPGKGLEWMGRIDPEDDSTKYAERFKDRVTMTED
TSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCTTWRIYRDSSGRPFYVMDAWGQGTLVTVSS

5

SEQ. I. D. NO: 20

CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGTTT
CCGGAGAAATAAGTACTGGATACTATTTCCACTGGGTGCGACGAAGGCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGG
AAGGATTGATCCTGAGGATGATAGTACTAAATATGCTGAGAGGTTCAAAGACAGAGTCACCATGACCGAGGAC
10 ACATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTACCA
CATGGCGGATATACCGAGATAGTTCTGGCCGCCCTTCTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACACTAGT
CACAGTCTCCTCA

SEQ. I. D. NO: 21

15 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGEISTGYIFHFVRRRPGKGLEWMGRIDPEDDSTKYAERFKDRVTMTAD
TSTD TAYMELSSLRSED TATYFCTTWRIYRDSSGRPFYVMDAWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
20 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ. I. D. NO: 22

CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGTTT
25 CCGGAGAAATAAGTACTGGATACTATTTCCACTTTGTGCGACGAAGGCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGG
AAGGATTGATCCTGAGGATGATAGTACTAAATATGCTGAGAGGTTCAAAGACAGAGTCACCATGACCGCAGAC
ACATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCACTTATTTTTGTACCA
CATGGCGGATATACCGAGATAGTTCTGGCCGCCCTTCTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACACTAGT
CACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG
30 GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCG
CCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT
GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG
GTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCC
TGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
35 CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCG
TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCAT
CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAT
GAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
40 GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT

CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ. I. D. NO: 23

5 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGEISTGYFHFVRRRPGKGLEWMGRIDPEDDSTKYAERFKDRVMTAD
TSTD TAYMELSSLRSED TATYFCTTWRIYRDSSGRPFYVMDAWGQGT LVTVSS

SEQ. I. D. NO: 24

10 CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGTTT
CCGGAGAAATAAGTACTGGATACTATTTCCACTTTGTGCGACGAAGGCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGG
AAGGATTGATCCTGAGGATGATAGTACTAAATATGCTGAGAGGTTCAAAGACAGAGTCACCATGACCGCAGAC
ACATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCACTTATTTTTGTACCA
CATGGCGGATATACCGAGATAGTTCTGGCCGCCCTTCTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACACTAGT
CACAGTCTCCTCA

15

SEQ. I. D. NO: 25

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCLASEDIYTYLTWYQQKPGKAPKLLIYGANKLQDGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

20

SEQ. I. D. NO: 26

25 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCTGG
CAAGTGAGGACATATACACTTATTTAACATGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTA
TGGTGCAAATAAGTTGCAAGATGGGGTCCCATCAAGGTTTCAAGGTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC
ACTATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCTACAGGGTTCCAAGTTTCCGCTCACGT
TTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA
TGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA
CAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA
GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA
30 AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ. I. D. NO: 27

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCLASEDIYTYLTWYQQKPGKAPKLLIYGANKLQDGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKLEIK

35

SEQ. I. D. NO: 28

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCTGG
CAAGTGAGGACATATACACTTATTTAACATGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTA
TGGTGCAAATAAGTTGCAAGATGGGGTCCCATCAAGGTTTCAAGGTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC

ACTATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCTACAGGGTTCCAAGTTTCCGCTCACGT
TTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

SEQ. I. D. NO: 29

5 DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCLASEDIYTYLTWYQQKPGKAPQLLIYGANKLQDGVPSRFSGSGSGTDYTL
TISSLQPEDEGDYYCLQGSKFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ. I. D. NO: 30

10 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCTGG
CAAGTGAGGACATATACACTTATTTAACATGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTCAACTCCTGATCTA
TGGTGCAAATAAGTTGCAAGATGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTATACTCTC
ACTATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGAAGGGGATTACTATTGTCTACAGGGTTCCAAGTTTCCGCTCACGT
TTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA
15 TGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA
CAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA
GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA
AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

20 SEQ. I. D. NO: 31

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCLASEDIYTYLTWYQQKPGKAPQLLIYGANKLQDGVPSRFSGSGSGTDYTL
TISSLQPEDEGDYYCLQGSKFPLTFGQGTKLEIK

SEQ. I. D. NO: 32

25 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCTGG
CAAGTGAGGACATATACACTTATTTAACATGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTCAACTCCTGATCTA
TGGTGCAAATAAGTTGCAAGATGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTATACTCTC
ACTATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGAAGGGGATTACTATTGTCTACAGGGTTCCAAGTTTCCGCTCACGT
TTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

30

SEQ. I. D. NO: 33

EVQLQQSGAELVRPGTSVKLSCKVSGEISTGYFHFVRRRPGQGLEWIGRIDPEDDSTKYAERFKDRATLTAQ
TSSNTAYLNLSSTSEDATYFCTTWRIYRDSSGRPFYVMDAWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
35 VDCKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

40 SEQ. I. D. NO: 34

GAGGTCCAGCTACAGCAGTCTGGGGCTGAGCTTGTGAGACCTGGGACCTCTGTGAAGTTATCTTGCAAAGTTT
 CTGGCGAAATAAGTACAGGATACTATTTCCACTTTGTGAGGCGAAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATAGG
 AAGGATTGATCCTGAGGATGATAGTACTAAATATGCTGAGAGGTTCAAAGACAGGGCGACGCTCACTGCACAA
 ACATCCTCCAACACAGCCTACCTGAACCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACACTGCAACTTATTTTTGTACCA
 5 CATGGCGGATATACCGAGATAGTTCTGGCCGCCCTTCTATGTTATGGATGCCTGGGGTCAAGGAACACTAGT
 CACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCCAAGAGCACCTCTGGG
 GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCG
 CCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT
 GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG
 10 GTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCC
 TGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
 CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
 GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCGTCTCACCG
 TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCAT
 15 CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAT
 GAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
 GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
 CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
 GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

20

SEQ. I. D. NO: 35

DIQMTQSPASLSASLGETVSIIECLASEDIYTYLTWYQQKPGKSPQLLIYGANKLQDGVPSRFSGSGSGTQYSL
 KISGIQPEDEGDYFCLQGSKFPLTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

25

SEQ. I. D. NO: 36

GACATTCAAATGACCCAGTCTCCAGCTTCCCTGTCTGCATCTCTGGGAGAACTGTCTCCATCGAATGTCTGG
 CAAGTGAGGACATATACACTTATTTAACATGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTCAACTCCTGATCTA
 TGGTGCAAATAAGTTGCAAGATGGGGTCCCATCACGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGCACACAGTATTCTCTC
 30 AAGATCAGCGGCATACAACCTGAAGATGAAGGGGATTATTTCTGTCTACAGGGTTCCAAGTTTCCGCTCACGT
 TCGGTTCTGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA
 TGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA
 CAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA
 GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA
 35 AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ. I. D. NO: 37

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTED
 TSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCAT

SEQ.I.D.NO: 38

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQANSFP

5

SEQ.I.D.NO: 39

WGQGTLLVTVSS

SEQ.I.D.NO: 40

10

FGQGTKLEIK

P A T E N T K R A V

1. Humanisert anti-interleukin-18 antistoff,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en tung kjede variabel region som angitt i SEKV ID NR:11 og en lett kjede variabel region som angitt i SEKV ID NR:15.
2. Humanisert anti-interleukin-18 antistoff ifølge krav 1, som omfatter en tung kjede som angitt i SEKV ID NR: 9 og lett kjede som angitt i SEKV ID NR: 13.
3. Farmasøytisk sammensetning,
10 k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter et anti-interleukin-18 antistoff ifølge krav 1 eller 2 og en farmasøytisk akseptabel bærer.
4. Antistoff ifølge krav 1 eller 2 for anvendelse som et medikament.
5. Antistoff ifølge krav 4, hvor medikamentet er for anvendelse i behandling av en autoimmun sykdom.
- 15 6. Antistoff ifølge krav 5, hvor den autoimmune sykdommen er valgt fra gruppen bestående av multippel sklerose, artrittiske sykdommer slik som revmatoid artritt, Type 1 diabetes, inflammatorisk tarmsykdom (IBD) og psoriasis.
7. Anvendelse av et antistoff ifølge krav 1 eller 2 ved fremstilling av et medikament for behandling av en autoimmun sykdom.
- 20 8. Polynukleotid,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det koder for en tung kjede variabel region og en lett kjede variabel region som definert i krav 1.
- 25 9. Polynukleotid,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det koder for en antistoff tung kjede og en antistoff lett kjede som definert i krav 2.
10. Vektor,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den koder for den tunge kjeden og den lette kjeden av et antistoff ifølge krav 1 eller 2.

5 11. Stabilt transformert vertscelle,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en vektor ifølge krav 10.

10 12. Stabilt transformert vertscelle,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en første vektor som koder for den lette kjeden og en andre vektor som koder for den tunge kjeden av et antistoff ifølge krav 1 eller 2.

15 13. Fremgangsmåte for fremstilling av et antistoff ifølge krav 1 eller krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter dyrking av en vertscelle transformert eller transfektert med en vektor eller vektorer som koder for antistoffet under betingelser som er permissive for ekspresjonen av antistoffet.

20 14. Fremgangsmåte ifølge krav 13, hvor polynukleotidet som koder for den lette kjede og polynukleotidet som koder for den tunge kjeden av antistoffet settes inn i den samme vektor og introduseres i vertscellen.

25 15. Fremgangsmåte ifølge krav 13, hvor polynukleotidet som koder for den lette kjeden og polynukleotidet som koder for den tunge kjeden av antistoffet settes inn i separate vektorer og introduseres i den samme vertscellen samtidig eller i rekkefølge.

117255 EH**SEKVENSER**SEQ.I.D.NO:1

GYYPH

SEQ.I.D.NO:2

RIDPEDDSTKYAERFKD

SEQ.I.D.NO:3

WRIYRDSSGRPFYVMDA

SEQ.I.D.NO:4

LASEDIYTYLT

SEQ.I.D.NO:5

GANKLQD

SEQ.I.D.NO:6

LQGSKFPLT

SEQ.I.D.NO:7

MAAEPVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENLESDYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGN
RPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNP
PDNIKDTKSDIIFQRSVPGHDNKMQFESSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIM
FTVQNE

SEQ.I.D.NO:8

ATGGCTGCTGAACCAGTAGAAGACAATTGCATCAACTTTGTGGCAATGAAATTTATTGACAA
TACGCTTTACTTTATAGCTGAAGATGATGAAAACCTGGAATCAGATTACTTTGGCAAGCTTG
AATCTAAATTATCAGTCATAAGAAATTTGAATGACCAAGTTCTCTTCATTGACCAAGGAAAT
CGGCCTCTATTTGAAGATATGACTGATTCTGACTGTAGAGATAATGCACCCCGGACCATATT
TATTATAAGTATGTATAAAGATAGCCAGCCTAGAGGTATGGCTGTAACCTATCTCTGTGAAGT
GTGAGAAAATTTCAACTCTCTCCTGTGAGAACAAAATTATTTCCCTTTAAGGAAATGAATCCT
CCTGATAACATCAAGGATACAAAAAGTGACATCATATTCTTTCAGAGAAGTGTCCCAGGACA
TGATAATAAGATGCAATTTGAATCTTCATCATACGAAGGATACTTTCTAGCTTGTGAAAAAG
AGAGAGACCTTTTTAACTCATTTTGAAAAAGAGGATGAATTGGGGGATAGATCTATAATG
TTCCTGTTCAAAACGAAGACTAG

SEQ.I.D.NO:9

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGEISTGYFHWVRQAPGKGLEWMGRIDPEDDSTKYAE
RFKDRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCTTWRIYRDSSGRPFYVMDAWGQGTLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ.I.D.NO:10

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGCGCCAGCGTCAAGGTGTC
CTGTAAGGTGTCCGGCGAGATCAGCACCGGCTACTACTTCCACTGGGTGAGGCAGGCCCTG
GCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAGAATCGACCCCGAGGACGACAGCACCAAGTACGCCGAG
CGGTTCAAGGACAGGGTGACCATGACCGAGGACACCAGCACCGATACCGCCTACATGGAGCT
GTCCAGCCTGAGAAGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTACCACCTGGCGGATCTACAGAG
ACAGCAGCGGCAGACCCCTTCTACGTGATGGATGCCTGGGGCCAGGGGCACACTAGTGACCGTG
TCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAG

CGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGT
CCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGC
GGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTA
CATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGA
GCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGC
GTGTTCTGTGTTCCCCCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGAC
CTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACG
GCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGG
GTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTA
GGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGC
CCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA
CGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCT
TCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTACGTGC
TCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGG
CAAGTGA

SEQ.I.D.NO:11

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGEISTGYFHWVRQAPGKGLEWMGRIDPEDDSTKYAE
RFKDRVMTMEDTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCTTWRIYRDSSGRPFYVMDAWGQGLVTV
SS

SEQ.I.D.NO:12

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGCGCCAGCGTCAAGGTGTC
CTGTAAGGTGTCCGGCGAGATCAGCACCGGCTACTACTTCCACTGGGTGAGGCAGGCCCTG
GCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCAGAATCGACCCCGAGGACGACAGCACCAAGTACGCCGAG
CGGTTCAAGGACAGGGTGACCATGACCGAGGACACCAGCACCGATACCGCCTACATGGAGCT
GTCCAGCCTGAGAAGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTACCACCTGGCGGATCTACAGAG
ACAGCAGCGGCAGACCCTTCTACGTGATGGATGCCTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTG
TCCAGC

SEQ.I.D.NO:13

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCLASEDIYTYLTWYQQKPGKAPKLLIYGANKLQDGVPSRF
SGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ.I.D.NO:14

GATATCCAGATGACCCAGTCCCCCAGCAGCGTGTCCGCCTCTGTGGGCGATAGAGTGACCAT
CACCTGCCTGGCCAGCGAGGACATCTACACCTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCA
AGGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAACAAGCTGCAGGACGGCGTGCCCAGCAGATTC
AGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTT
CGCCACCTACTACTGCCTGCAGGGCAGCAAGTTCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGC
TGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAG
CTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAA
GGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGC
AGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTAC
GAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAA
GAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

SEQ.I.D.NO:15

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCLASEDIYTYLTWYQQKPGKAPKLLIYGANKLQDGVPSRF
SGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKLEIK

SEQ.I.D.NO:16

GATATCCAGATGACCCAGTCCCCCAGCAGCGTGTCCGCCTCTGTGGGCGATAGAGTGACCAT
CACCTGCCTGGCCAGCGAGGACATCTACACCTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCA
AGGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAACAAGCTGCAGGACGGCGTGCCCAGCAGATTC
AGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTT

CGCCACCTACTACTGCCTGCAGGGCAGCAAGTCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGC
TGGAGATCAAG

SEQ.I.D.NO:17

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGEISTGYFHWVRRRPGKGLEWMGRIDPEDDSTKYAE
RFKDRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCTTWRIYRDSSGRPFYVMDAWGQGTLLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ.I.D.NO:18

CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTC
CTGCAAGGTTTCCGGAGAAATAAGTACTGGATACTATTTCCACTGGGTGCGACGAAGGCCTG
GAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGGATTGATCCTGAGGATGATAGTACTAAATATGCTGAG
AGGTTCAAAGACAGAGTCACCATGACCGAGGACACATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCT
GAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTACCACATGGCGGATATACCGAG
ATAGTTCTGGCCGCCCCCTTCTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTC
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTC
TGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT
CGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTA
CATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAAAT
CTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCA
GTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC
ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG
GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT
GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGC
CCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTC

AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA
TGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT
TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGG
TAAA

SEQ.I.D.NO:19

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGEISTGYFHWVRRRPGKGLEWMGRIDPEDDSTKYAE
RFKDRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDYAVYYCTTWRIYRDSSGRPFYVMDAWGQGTLVTV
SS

SEQ.I.D.NO:20

CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTC
CTGCAAGGTTTCCGGAGAAATAAGTACTGGATACTATTTCCACTGGGTGCGACGAAGGCCTG
GAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGGATTGATCCTGAGGATGATAGTACTAAATATGCTGAG
AGGTTCAAAGACAGAGTCACCATGACCGAGGACACATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCT
GAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTACCACATGGCGGATATACCGAG
ATAGTTCTGGCCGCCCCTTCTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTC
TCCTCA

SEQ.I.D.NO:21

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGEISTGYFHFVRRRPGKGLEWMGRIDPEDDSTKYAE
RFKDRVTMTADTSTDTAYMELSSLRSEDYATYFCTTWRIYRDSSGRPFYVMDAWGQGTLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSIVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ.I.D.NO:22

CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTC
CTGCAAGGTTTCCGGAGAAATAAGTACTGGATACTATTTCCACTTTGTGCGACGAAGGCCTG
GAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGGATTGATCCTGAGGATGATAGTACTAAATATGCTGAG
AGGTTCAAAGACAGAGTCACCATGACCGCAGACACATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCT
GAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCACTTATTTTTGTACCACATGGCGGATATACCGAG
ATAGTTCTGGCCGCCCTTCTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTC
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTC
TGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT
CGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTA
CATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAAAT
CTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCA
GTCTTCCTCTTCCCCCCTTCCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC
ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG
GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT
GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGC
CCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTC
AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA
TGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT
TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGG
TAAA

SEQ.I.D.NO:23

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGEISTGYFHFVRRRPGKGLEWMGRIDPEDDSTKYAE
RFKDRVTMTADTSTDTAYMELSSLRSEDATYFCTTWRIYRDSSGRPFYVMDAWGQGLVTV
SS

SEQ.I.D.NO:24

CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTC
CTGCAAGGTTTCCGGAGAAATAAGTACTGGATACTATTTCCACTTTGTGCGACGAAGGCCTG
GAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGGATTGATCCTGAGGATGATAGTACTAAATATGCTGAG
AGGTTCAAAGACAGAGTCACCATGACCGCAGACACATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCT
GAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCACTTATTTTTGTACCACATGGCGGATATACCGAG
ATAGTTCTGGCCGCCCTTCTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTC
TCCTCA

SEQ.I.D.NO:25

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCLASEDIYTYLTWYQQKPGKAPKLLIYGANKLQDGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ.I.D.NO:26

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT
CACTTGTCTGGCAAGTGAGGACATATACTTATTTAACATGGTATCAGCAGAAACCAGGGA
AAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCAAATAAGTTGCAAGATGGGGTCCCATCAAGGTTC
AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACTATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTT
TGCAACTTACTATTGTCTACAGGGTTCCAAGTTTCCGCTCACGTTTGGCCAGGGGACCAAGC
TGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAG
TTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA
AGTACAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGC
AGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC
GAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA
GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ.I.D.NO:27

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCLASEDIYTYLTWYQQKPGKAPKLLIYGANKLQDGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKLEIK

SEQ.I.D.NO:28

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT
CACTTGTCTGGCAAGTGAGGACATATACACTTATTTAACATGGTATCAGCAGAAACCAGGGA
AAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCAAATAAGTTGCAAGATGGGGTCCCATCAAGGTTC
AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACTATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTT
TGCAACTTACTATTGTCTACAGGGTTCCAAGTTTCCGCTCACGTTTGGCCAGGGGACCAAGC
TGGAGATCAAA

SEQ.I.D.NO:29

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCLASEDIYTYLTWYQQKPGKAPQLLIYGANKLQDGVPSRF
SGSGSGTDYTLTISSLQPEDEGDYYCLQGSKFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ.I.D.NO:30

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT
CACTTGTCTGGCAAGTGAGGACATATACACTTATTTAACATGGTATCAGCAGAAACCAGGGA
AAGCCCCCTCAACTCCTGATCTATGGTGCAAATAAGTTGCAAGATGGGGTCCCATCAAGGTTC
AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTATACTCTCACTATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGA
AGGGGATTACTATTGTCTACAGGGTTCCAAGTTTCCGCTCACGTTTGGCCAGGGGACCAAGC
TGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAG
TTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA
AGTACAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGC
AGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC
GAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA
GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ.I.D.NO:31

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCLASEDIYTYLTWYQQKPGKAPQLLIYGANKLQDGVPSRF
SGSGSGTDYTLTISSLQPEDEGDYYCLQGSKFPLTFGQGTKLEIK

SEQ.I.D.NO:32

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT
CACTTGTCTGGCAAGTGAGGACATATACACTTATTTAACATGGTATCAGCAGAAACCAGGGA
AAGCCCCCTCAACTCCTGATCTATGGTGCAAATAAGTTGCAAGATGGGGTCCCATCAAGGTTC
AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTATACTCTCACTATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGA
AGGGGATTACTATTGTCTACAGGGTTCCAAGTTTCCGCTCACGTTTGGCCAGGGGACCAAGC
TGGAGATCAAA

SEQ.I.D.NO:33

EVQLQQSGAELVRPGTSVKLSCKVSGEISTGYFHFVRRRPGQGLEWIGRIDPEDDSTKYAE
RFKDRATLTAQTSSNTAYLNLSSLTSEDATYFCTTWRIYRDSSGRPFYVMDAWGQGTLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ.I.D.NO:34

GAGGTCCAGCTACAGCAGTCTGGGGCTGAGCTTGTGAGACCTGGGACCTCTGTGAAGTTATC
TTGCAAAGTTTCTGGCGAAATAAGTACAGGATACTATTTCCACTTTGTGAGGCGAAGGCCTG
GACAGGGTCTGGAATGGATAGGAAGGATTGATCCTGAGGATGATAGTACTAAATATGCTGAG

AGGTTCAAAGACAGGGCGACGCTCACTGCACAAACATCCTCCAACACAGCCTACCTGAACCT
CAGCAGCCTGACCTCTGAGGACACTGCAACTTATTTTTGTACCACATGGCGGATATACCGAG
ATAGTTCTGGCCGCCCCCTTCTATGTTATGGATGCCTGGGGTCAAGGAACACTAGTCACAGTC
TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTC
TGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT
CGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTA
CATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAAT
CTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCA
GTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC
ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG
GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT
GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGC
CCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTC
AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA
TGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT
TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGG
TAAA

SEQ.I.D.NO:35

DIQMTQSPASLSASLGETVSI ECLASEDIYTYLTWYQQKPGKSPQLLIYGANKLQDGVPSRF
SGSGSGTQYSLKISGIQPEDEGDYFCLQGSKFPLTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ.I.D.NO:36

GACATTCAAATGACCCAGTCTCCAGCTTCCCTGTCTGCATCTCTGGGAGAACTGTCTCCAT
CGAATGTCTGGCAAGTGAGGACATATACACTTATTTAACATGGTATCAGCAGAAACCAGGGA
AATCTCCTCAACTCCTGATCTATGGTGCAAATAAGTTGCAAGATGGGGTCCCATCACGGTTC
AGTGGCAGTGGATCTGGCACACAGTATTCTCTCAAGATCAGCGGCATACAACCTGAAGATGA
AGGGGATTATTTCTGTCTACAGGGTTCCAAGTTTCCGCTCACGTTCGGTTCTGGGACCAAGC
TGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAG
TTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA
AGTACAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGC
AGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC
GAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA
GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ.I.D.NO: 37

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQ
KFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCAT

SEQ.I.D.NO: 38

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFP

SEQ.I.D.NO: 39

WGQGTLVTVSS

SEQ.I.D.NO: 40

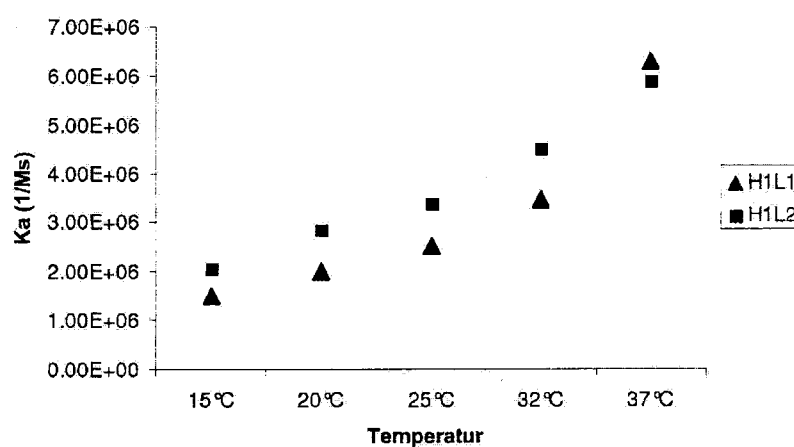
FGQGTKLEIK

1/19

Figur 1. Effekt av temperatur på on-rate (ka) for H1L1 og H1L2

Ka for H1L1 & H1L2 Vs Hu IL18 ved forskjellige temperaturer

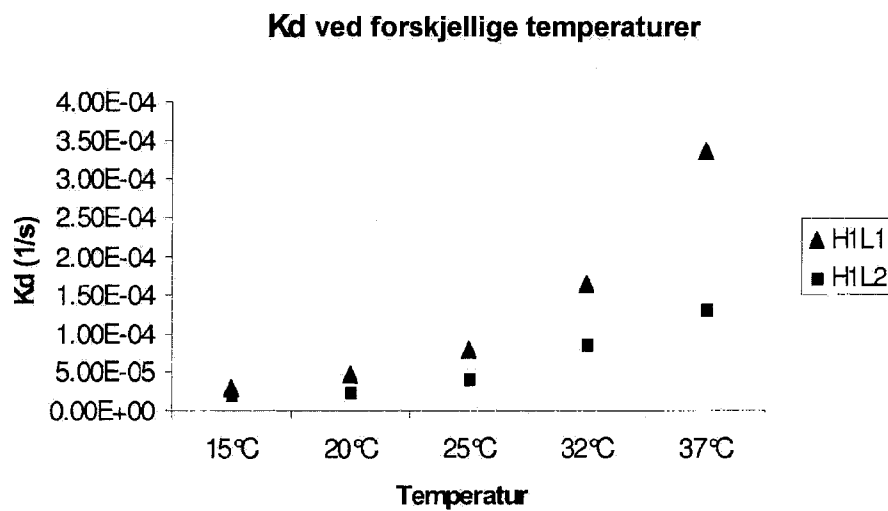
Ka ved forskjellige temperaturer



2/19

Figur 2. Effekt av temperatur på Off-Rate (kd)

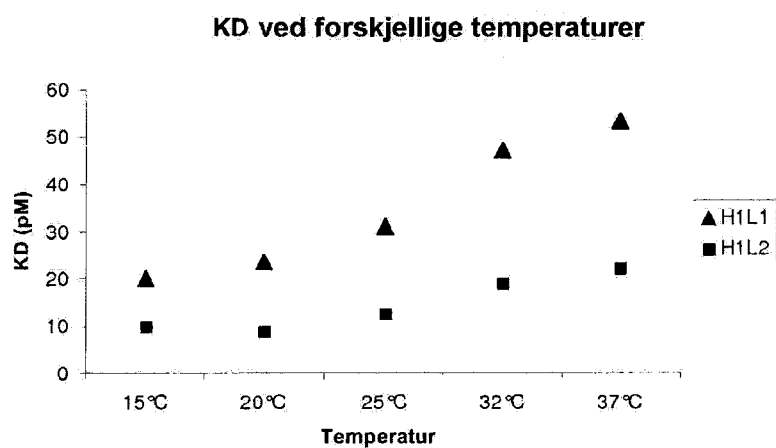
Kd for H1L1 & H1L2 Vs Hu IL18 ved forskjellige temperaturer



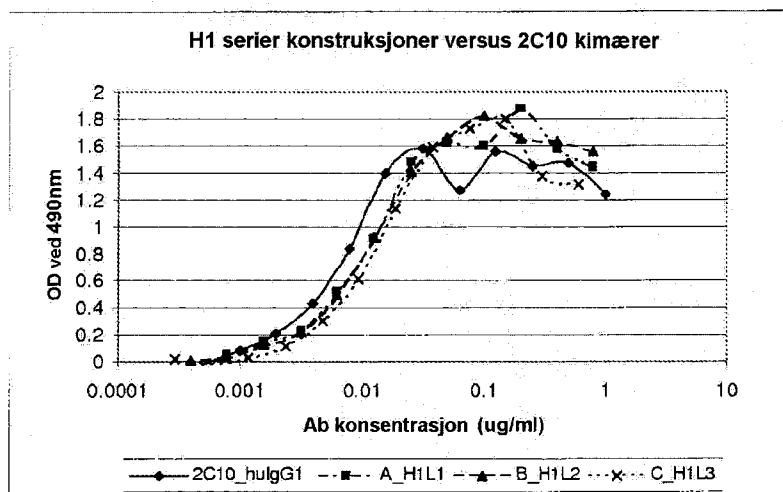
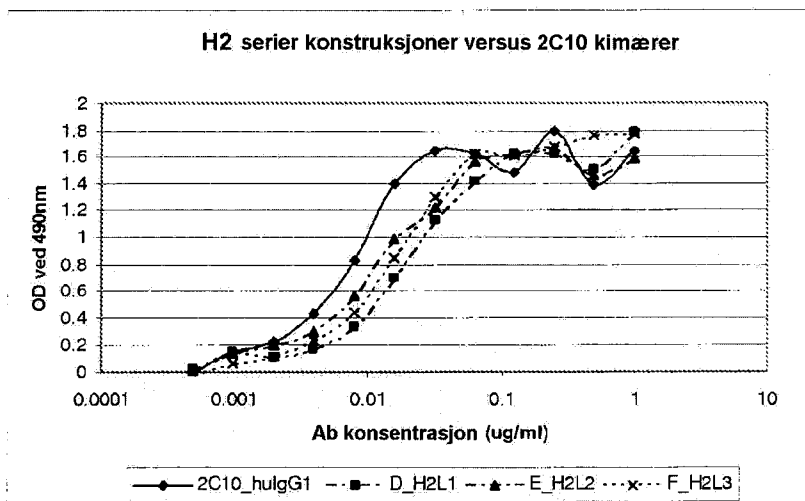
3/19

Figur 3. Effekt av temperatur på likevektskonstant (KD)

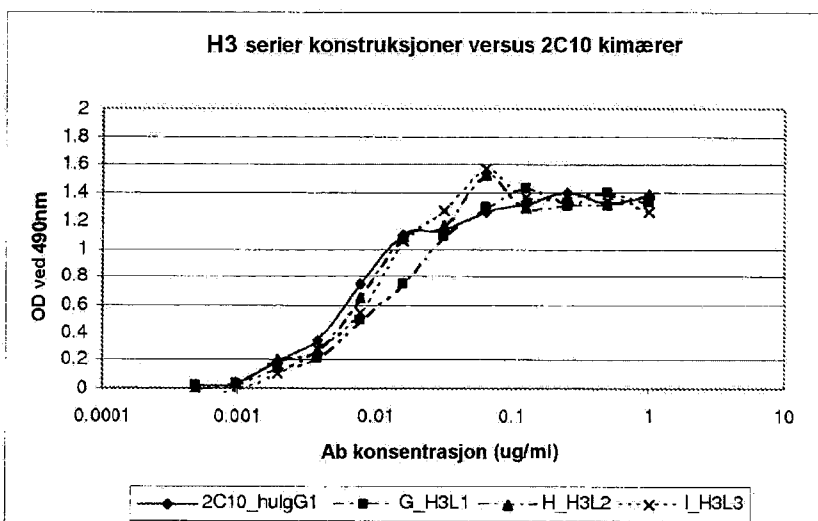
KD for H1L1 & H1L2 Vs Hu IL18 ved forskjellige temperaturer



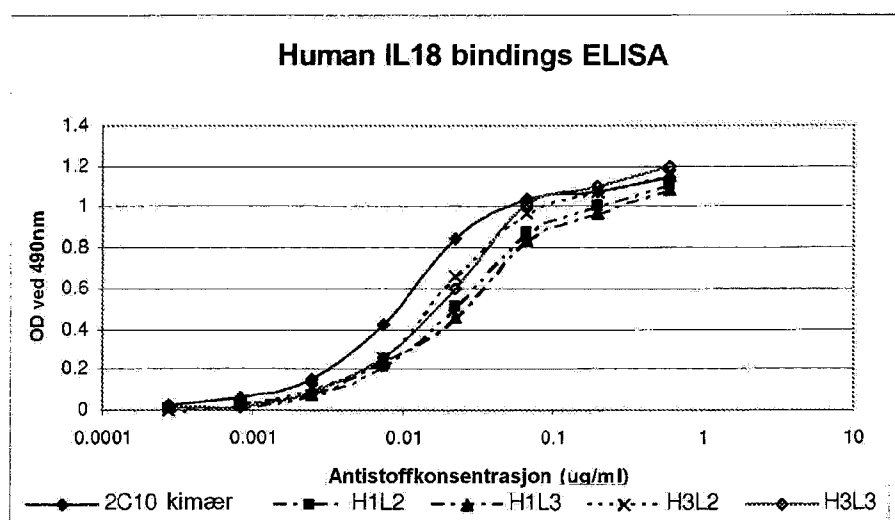
4/19

Figur 4:**A****B**

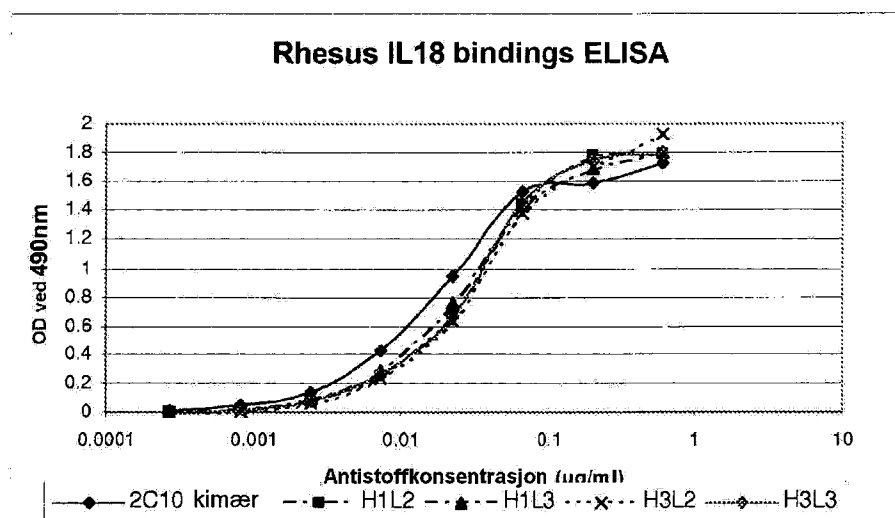
5/19

Figur 4C

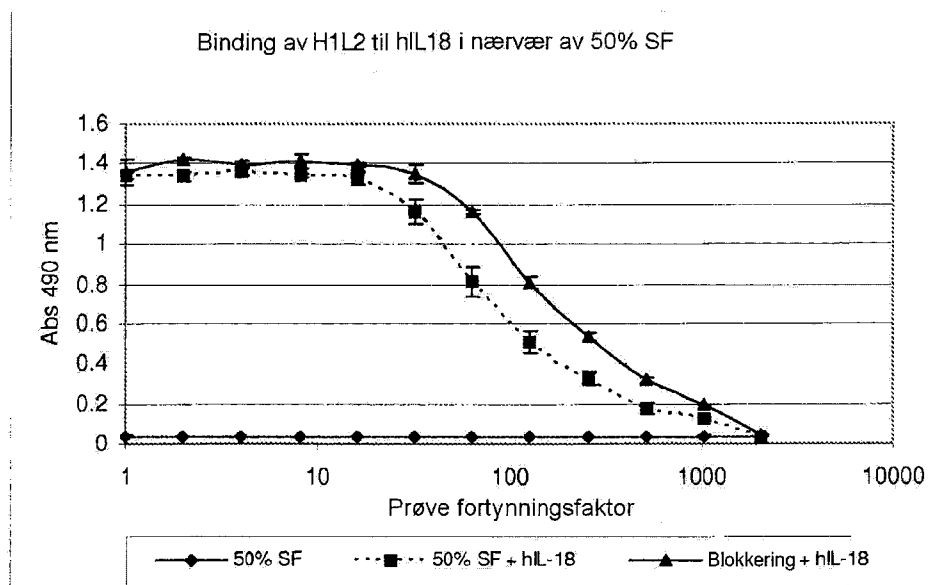
6/19

Figur 5

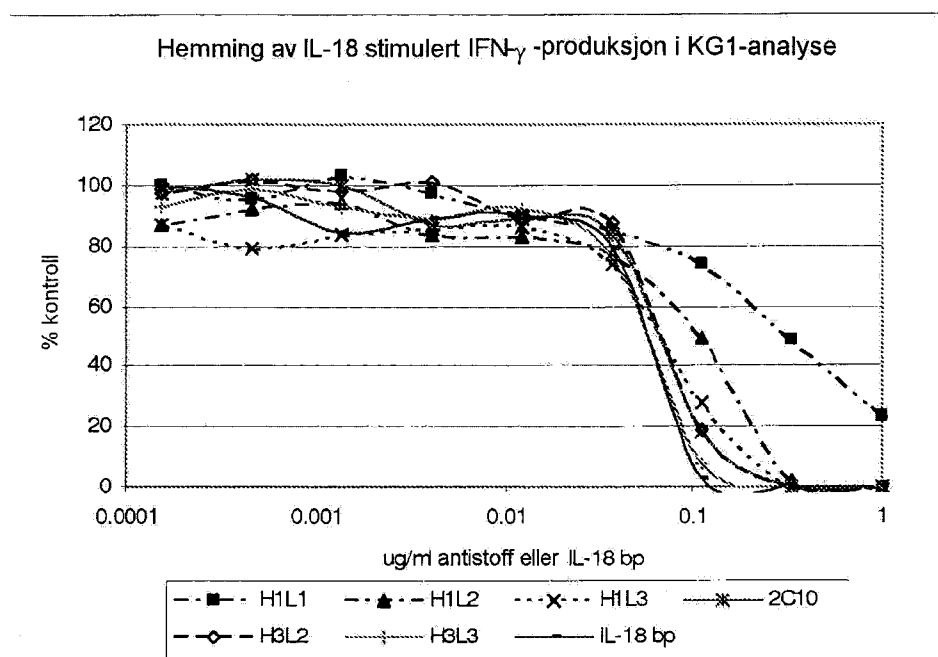
7/19

Figur 6:

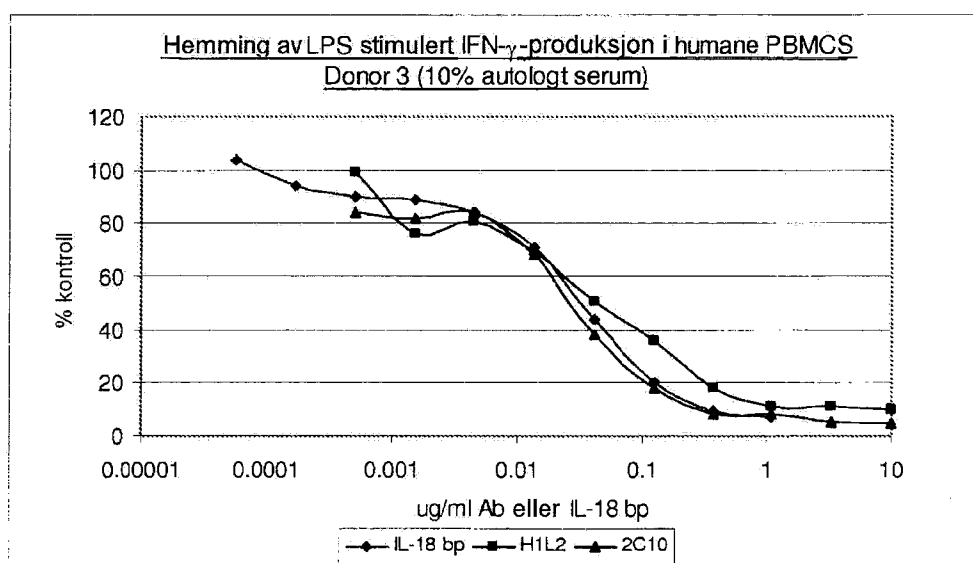
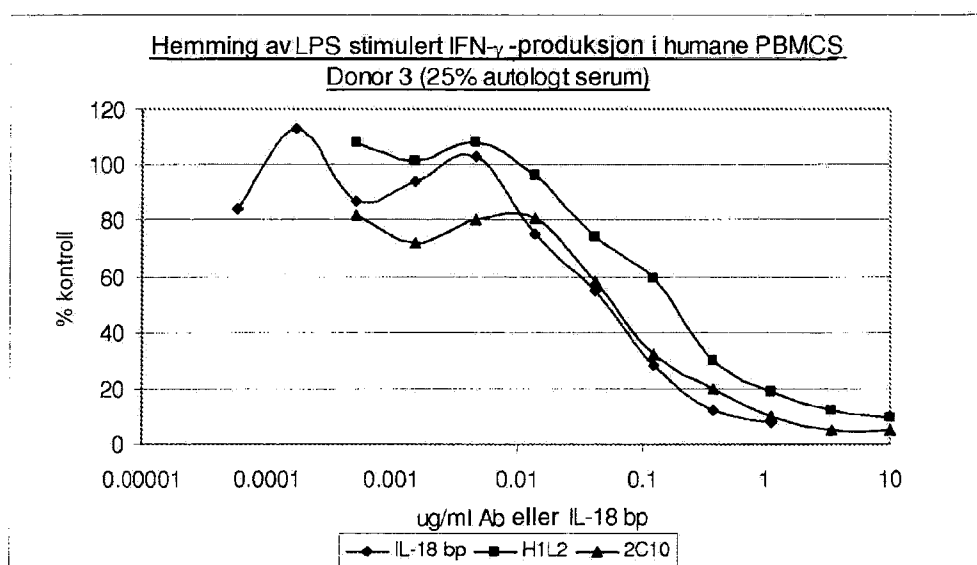
8/19

Figur 7

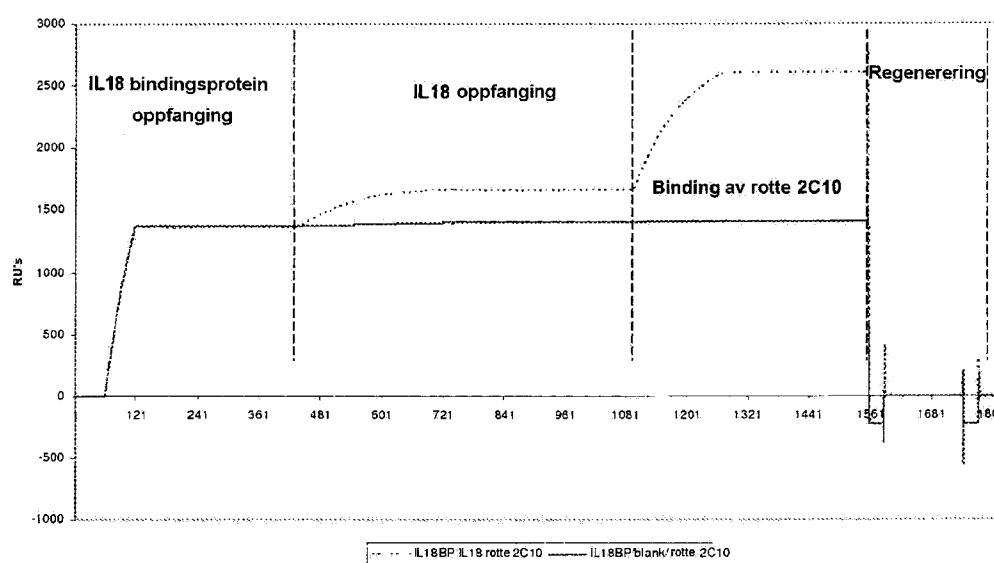
9/19

Figur 8

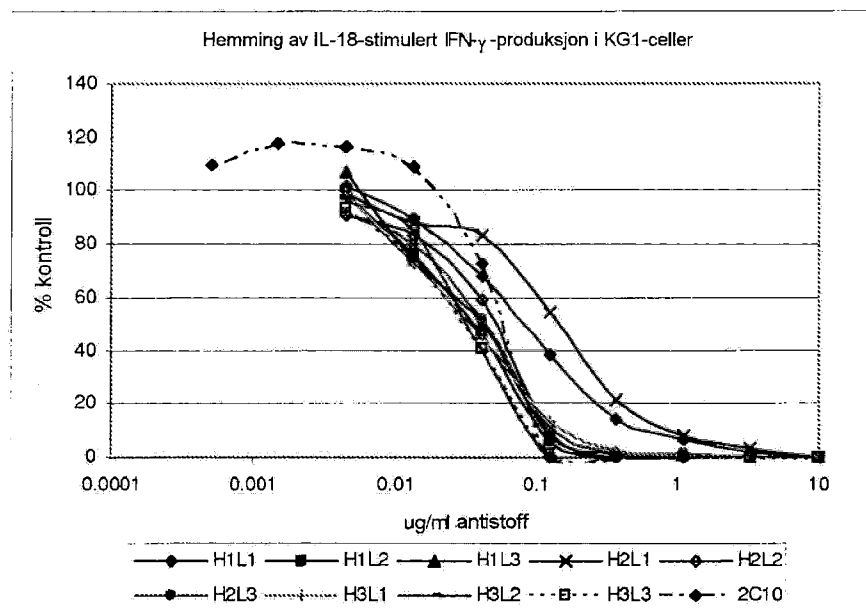
10/19

Figur 9**A****B**

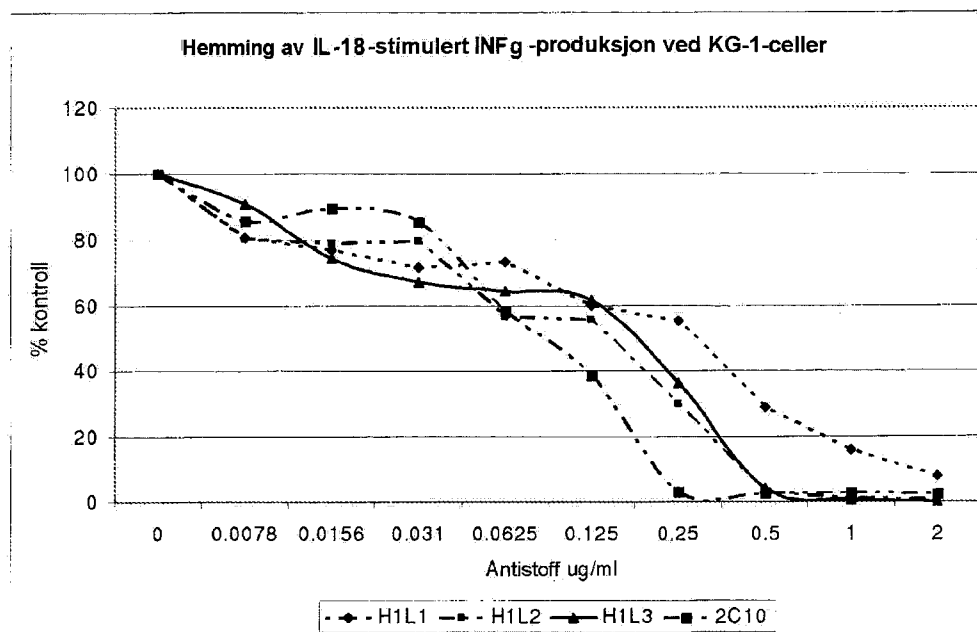
11/19

Figur 10

12/19

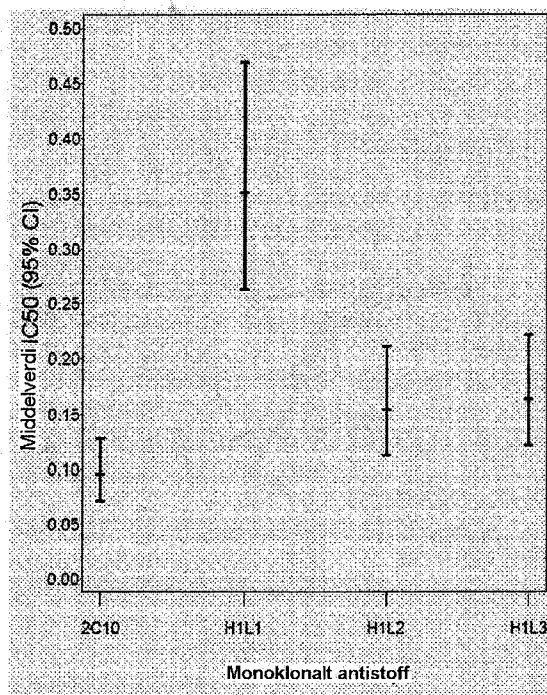
Figur 11

13/19

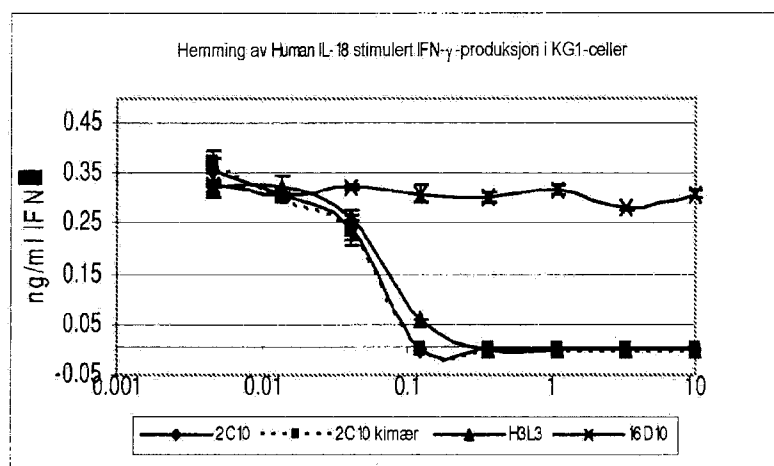
Figur 12

14/19

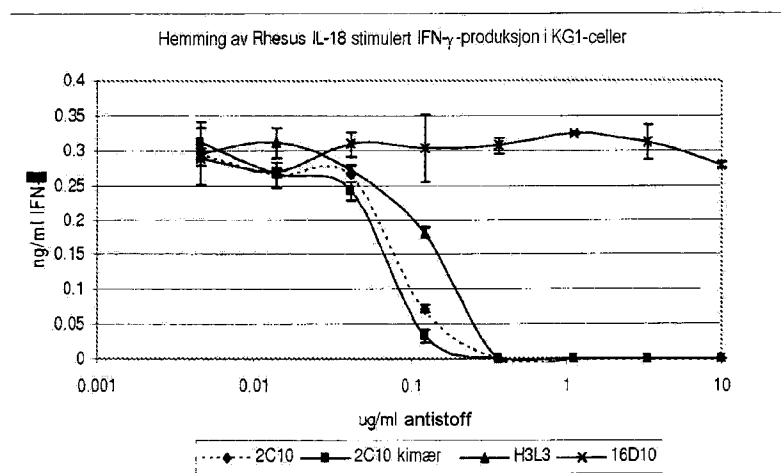
Figur 13 - IC50-verdier ($\mu\text{g/ml}$) for hvert monoklonalt antistoff med et 95% konfidensintervall



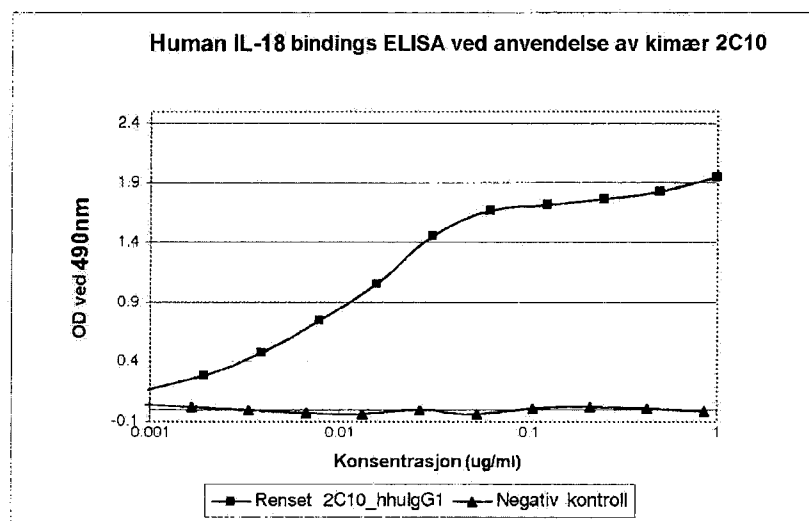
15/19

Figur 14

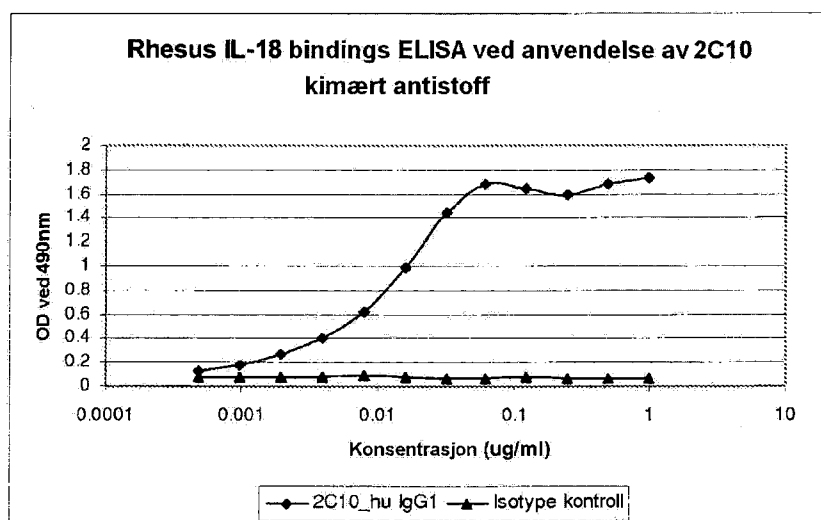
16/19

Figur 15

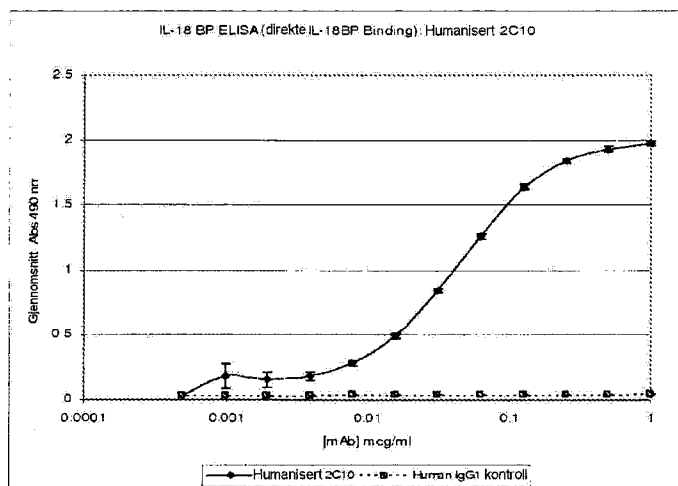
17/19

Figur 16

18/19

Figur 17

19/19

Figur 18A og 18B**A)****B)**