

(12) **PATENT**

(11) 341793

(13) **B1**

(19) NO

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20076404	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2006.05.26 PCT/US2006/020688
(22)	Inng.dag	2007.12.12	(85)	Videreføringsdag	2007.12.12
(24)	Løpedag	2006.05.26	(30)	Prioritet	2005.05.26, US, 60/684,853
(41)	Alm.tilgj	2008.02.13			
(45)	Meddelt	2018.01.22			
(73)	Innehaver	Genentech Inc., 1 DNA Way, US-CA94080-4990 SOUTH SAN FRANCISCO, USA			
		Seattle Genetics Inc, 21823 30th Drive SE, US-WA98021 BOTHELL, USA			
(72)	Oppfinner	Leonard G Presta, 1900 Gough Street, Apt 206, US-CA94109 SAN FRANCISCO, USA			
		Lori Y O'Connell, 1 DNA Way, US-CA94080 SOUTH SAN FRANCISCO, USA			
		Svetlana O Doronina, 10910 198th Place S E, US-WA98296 SNOHOMISH, USA			
(74)	Fullmektig	Zacco Norw ay AS, Postboks 2003 Vik a, 0125 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Hum aniserte anti-CD40 antistoffer eller antigenbindende fragment, far masøytisk sammensetning, is olert polynukleotid og kit			
(56)	Anførte publikasjoner	TAY Y-T et al., Mechanisms by w hich SGN-40, a humanized anti-CD40 antibody, induces cytotoxicity in human multiple myeloma cells: clinical implications, Cancer Research, 2004, Vol. 64(8), side 2846-2852, WO 99/42075 A, FRANCISCO J A et al., Agonistic Properties and in vivo antitumor Activity of the anti-CD40 antibody SGN-14, Cancer Research, 2000, Vol. 60(12), side 3225-3231			
(57)	Sammendrag				

Tilveiebrakt er humaniserte anti-CD40-antistoffer og antigen-bindende fragmenter og fremgangsmåter for behandling av sykdom kjennetegnet ved ekspresjon av CD40antigen.

[illegible]

BAKGRUNN

Denne oppfinnelsen er generelt relatert til humaniserte anti-CD40-antistoffer for
5 diagnostisk og terapeutisk anvendelse. Humaniserte anti-CD40-antistoffer og
fremgangsmåter for anvendelse for behandlingen av ulike sykdommer eller lidelser
karakterisert ved celler som uttrykker CD40 er angitt. Farmasøytiske sammensetninger og
artikler for fremstilling slik som sett omfattende det humaniserte anti-CD40-antistoffet er
også angitt.

10 CD40-er et type I integral membran glykoprotein og et medlem av tumornekrosefaktor
(TNF) reseptorsuperfamilien. CD40-er uttrykt på et utvalg av celletyper inkluderende
normale og neoplastiske B-celler, interdigitasjonsceller, basale epitelceller og
karcinomer. Det er også tilstede på monocytter, makrofager, noen endotelceller og
15 folliculare dendrittceller. CD40-er uttrykt tidlig i B-celleontogeni, viser seg på B-
celleforløpere påfølgende tilsynekomsten av CD10 og CD19, men før ekspresjon av
CD21, CD23, CD24, og tilsynekomst av overflateimmunoglobulin M (sIgM) (Uckun et
al., 1990, *Blood* 15:2449). Selv om tidligere rapporter indikerer at CD40-ble tapt ved
terminal differensiering av B-celler til plasmaceller, har CD40-blitt detektert på tonsil og
20 beinmarg-deriverte plasmaceller (Pellat-Decounynck et al., 1994, *Blood* 84:2597).

Interaksjonen av CD40-med sin ligand og motreseptor, CD40L (også referert til som
CD154, gp39 og TRAP), induserer både humorale og cellemedierte immunresponser.
CD40L er et transmembranprotein uttrykt hovedsakelig på aktiverte lymfocytter. CD40⁺ T-
25 celler. Lignende andre proteiner i TNF-familien er strukturen av CD40L den av en ikke-
kovalent trimer. CD40-mediert signalering viser seg å være nødvendig for B-celle
proliferasjon, immunoglobulin (Ig) isotypebyting, germinal senterformulering og
hukommelse B-celleengasjement i respons til T-celleavhengig antigen. CD40-bindende
av CD40L resulterer i CD40-multimerisering, genereringen av aktiviseringssignaler for
30 antigen presenterende celler slik som dendrittceller, monocytter og B-celler, og
genereringen av vekst og differensieringssignaler for cytokinaktiverte fibroblaster og
epitelceller. Mens signaleringsveiene gjennom hvilke CD40-molekyler fungerer i celle
differensiering, har ikke blitt fullstendig forklart, CD40-signaler er omformet fra den
multimeriserte reseptoren via rekruttering av en serie av TNF-reseptorassosierte faktorer
35 ("TRAFer") (Kehry, 1996, *J. Immunol.* 156:2345-2348). Delmengder av TRAFer
interagerer differentielt med TNF-reseptorfamiliemedlemmer, inkluderende CD40, som

tilveiebringer stimuli til et bredt utvalg av nedstrømsveier. TRAF1 og TRAF2 er implisert i moduleringen av apoptose (Speiser et al., 1997, *J. Exp. Med.* 185:1777-1783; Yeh et al., 1997, *Immunity* 7:715-725). TRAFer 2, 5 og 6 deltar i proliferasjon og aktiveringsbegivenheter. I normale B-celler rekrutterer bindende av CD40-til CD40L
 5 TRAF2 og TRAF3 til reseptorkomplekset og induserer nedregulering av andre TRAFer (Kuhne et al., 1997, *J. Exp. Med.* 186:337-342).

Apoptose og CD40-mediert signalering er nært forbundet under B-celleutvikling og differensiering. En primær funksjon av apoptose i B-celler er den klonale delesjonen av
 10 umodne B-celler, som er tenkt til å resultere fra utstrakt kryssforbindende av overflate Ig i umodne B-celler. Skjebnen av modne B-celler er også modulert ved en kombinasjon av signalering via overflate Ig og signaler derivert fra aktiverte T-celler, formodentlig mediert ved CD40L-molekyler. En kombinasjon av signaler fra overflate Ig og CD40-kan
 15 overskygge den apoptotiske reaksjonsveien og opprettholde germinal senter B-celle overlevelse. Denne bergingen fra apoptose i germinale sentre er kritisk for utviklingen av affinitet antistoff-produkerende hukommelse B-celler.

I både T- og B-cellemaligniteter resulterer antitumoreffekter (vekstarrestering med eller uten apoptose) ofte når maligne celler er eksponert for stimuli som fører til aktivering av
 20 normale lymfocytter. Denne aktiveringsinduserte vekstarresteringen har blitt observert med signaler gjennom enten antigenreseptorer eller kostimulatoriske reseptorer (Ashwell et al., 1987, *Science* 237:61; Bridges et al., 1987, *J. Immunol.* 139:4242; Page and Defranco, 1988 *J. Immunol.* 140:3717; og Beckwith et al., 1990, *J. Natl. Cancer Inst.* 82:501). CD40-stimulering ved enten anti-CD40-antistoff eller løselig CD40L inhiberer
 25 direkte B-cellelymfomvekst (Funakoshi et al., 1994, *Blood* 83:2787-2784).

Flere murine monoklonale antistoffer (mAbs) rettet mot CD40-har blitt beskrevet (Katira et al. 1995, "CD40-Workshop Panel Report"; In: *Leukocyte Typing V*, Schlossman et al., (eds) 1995, 1:547-550). For eksempel ble to mAb'er, CD40.7 (M2) og CD40.8 (M3), vist
 30 til å inhibere bindingen av CD40-til CD40L (Fanslow et al., 1995, In: *Leukocyte Typing V*, Schlossman et al., (eds) 1995, 1:555-556). CD40-stimulering ved mAb'er M2 og M3 inhiberer vekst av flere humane B-cellelymfomer og indusert regresjon av etablerte tumorer *in vivo* (Funakoshi et al., 1994, *Blood* 83:2787-2794; Funakoshi et al., 1996, *J. Immunol.* 19:93-101). US patent nr. 5.182.368 angir et anti-CD40-murint mAb, G28-5,
 35 som kan forsterke B-celleproliferasjon. Et enkelt-kjede immunotoksin basert på den enkel-kjede Fv regionen av G28-5 drepte selektivt humane CD40-uttrykkende

hematologiske maligne cellelinjer *in vitro* (Francisco et al., 1997, *J Biol. Chem.* 39:24165-24169). Imidlertid forsterker G28-5 ikke aktivering av B-celler i nærværet av CD40L, og potentierer ikke bindingen av CD40-og CD40L. US patent nr. 6.838.261 (og relaterte US patenter nr. 6.946.129 og 6.843.989) beskriver en klasse av varierte former av det anti-CD40-murine mAb, S2C6, og dets anvendelse i behandlingen av ulike sykdommer, inkluderende cancer og immunologiske og inflammatoriske sykdommer. I tillegg til å forsterke CD40L-mediert stimulering, viste et anti-CD40-antistoff beskrevet i US patent nr. 6.838.261 forsterkning av interaksjonen mellom CD40-og CD40L, og *in vivo* anti-neoplastisk aktivitet. Selv om S2C6 ved seg selv vil stimulere B-celle-proliferasjon på en måte lignende G28-5, er S2C6 skjelnet fra G28-5 ved dets evne til å øke CD40L-bindende og den påfølgende størrelsesordenen av det CD40L-medierte aktiveringssignalet.

Andre murine anti-CD40-mAber, for eksempel, beskrevet i Internasjonal pulikasjon nr. WO 95/17202, binder CD40-og viser yteevne i behandlingen og forebyggingen av sykdom karakterisert ved neoplastiske celler som uttrykker CD40. Selv om murine anti-CD40-antistoffer har potensiell anvendbarhet som terapeutiske midler i behandlingen av CD40-relaterte sykdommer i mennesker, presenterer deres immunogenisitet muligheten av en neutraliserende antistoffrespons, for eksempel, en human anti-mus antistoff (HAMA) respons som vil begrense deres verdi.

Tay Y-T et al., *Cancer Research*, 2004, Vol. 64(8), side 2846-2852 angir terapeutisk anvendelse av humanisert anti-CD40 mAb SGN-40 for behandling av multippelt myelom.

WO 99/42075 A beskriver generasjoner av mAb anti CD40.

Francisco J A et al., *Cancer Research*, 2000, Vol. 60(12), side 3225-3231 beskriver SGN-14 (også kalt S2C6) for behandling av tumor og multippelt myelom.

Det er derfor et behov for humaniserte anti-CD40-antistoffer som spesifikt binder definerte CD40-epitoper og som viser den antigen-bindende spesifisiteten, affiniteten og andre ønskede funksjonelle egenskaper av det analoge ikke-humane anti-CD40-antistoffet.

KORT OPPSUMMERING

Foreliggende oppfinnelse omfatter antistoff eller antigen-bindende fragment som spesifikt binder til human CD40, kjennetegnet ved at det omfatter et humanisert tung kjede variabelt domene og et humanisert lett kjede variabelt domene, der det tung kjede variable domene og det humaniserte lett kjede variable domene omfatter aminosyresekvensene til henholdsvis SEQ ID NO:10 og SEQ ID NO:16.

Antistoffet er kjennetegnet ved at det omfatter henholdsvis tung kjede og lett kjede aminosyresekvensene presentert i SEQ ID NO:19 og SEQ ID NO:22

Foreliggende oppfinnelse omfatter videre sett, kjennetegnet ved at det omfatter i en beholder antistoffet eller det antigen bindende fragmentet ifølge ethvert av kravene 1-12, og eventuelt instruksjoner for å benytte antistoffet for å detektere CD40-protein i en biologisk prøve.

Omfattet av foreliggende oppfinnelse er også farmasøytisk sammensetning, kjennetegnet ved at den omfatter:

- (i) antistoffet eller det antigen-bindende fragmentet ifølge et hvilket som helst av kravene 1-12; og
- (ii) en farmasøytisk akseptabel tilsetning.

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse isolert polynukleotid, kjennetegnet ved at polynukleotidet koder for tung kjede variabelt domene aminosyresekvensen og/eller lett kjede variabelt domene aminosyresekvensen av henholdsvis SEQ ID NO:10 og SEQ ID NO:16.

Den foreliggende oppfinnelsen omfatter humaniserte anti-CD40-antistoffer og antigen-bindende fragmenter derav. Det beskrives videre fremgangsmåter for å anvende slike humaniserte anti-CD40-antistoffer og fragmenter for behandlingen av sykdommer og lidelser karakterisert ved celler som uttrykker CD40-overflateantigenet. Også inkludert er sett og det beskrives artikler for fremstilling omfattende et humanisert anti-CD40-antistoff.

Antistoffet eller det antigen-bindende fragmentet kan inkludere en human IgG konstant region, slik som, for eksempel, en IgG konstant region av isotype IgG1, IgG2, IgG3 eller IgG4. Antistoffet eller det antigen-bindende fragmentet kan inkludere et lett kjede konstant domene, slik som, for eksempel, et kappa konstant domene.

I noen utførelsesformer er antistoffet , hu sgn-26. I noen utførelsesformer konkurrerer antistoffet eller det antigen-bindende fragmentet for binding med monoklonalt antistoff S2C6 som er utskilt ved en hybridom som har ATCC anbringingsnr. PTA-110.

5 Antistoffet kan også være et antigen-bindende fragment, slik som en Fab, en Fab', en F(ab')₂, et Fv fragment, en diabody, et enkel-kjede antistoff, et scFv fragment eller en scFv-Fc. Antistoffet eller det antigen-bindende fragmentet kan eventuelt være merket eller konjugert til et kjemoterapeutisk middel, slik som et auristatin (for eksempel MMAE eller MMAF).

10 Også tilveiebrakt er et sett inkluderende et anti-CD40-antistoff eller antigen-bindende fragment i en beholder. Settet kan eventuelt inkludere en ytterligere komponent(er), slik som instruksjoner for å benytte antistoffet for å detektere CD40-protein i en biologisk prøve.

15 Farmasøytiske sammensetninger omfattende et anti-CD40-antistoff eller antigen-bindende fragment derav og en farmasøytisk akseptabel tilsetning(er) er også tilveiebrakt.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer et isolert polynukleotid som koder for den tunge
20 kjede variable domene aminosyresekvensen og den lett kjede variable domene aminosyresekvensen av henholdsvis SEQ ID NO:10 og SEQ ID NO:16

Fremgangsmåter for inhibering av veksten av celler som uttrykker humant CD40-antigener beskrevet. Fremgangsmåtene inkluderer å administrere et anti-CD40-antistoff
25 eller et antigen-bindende fragment til cellene, hvor antistoff eller antigen-bindende fragment binder til det humane celleoverflate CD40-antigenet. Bindingen av antistoffet eller det antigen-bindende fragmentet til CD40-antigen inhiberer veksten eller differensieringen av cellene.

30 Det er beskrevet fremgangsmåter for behandling av et individ som har en CD40-assosiert lidelse. Fremgangsmåtene inkluderer å administrere til individet et anti-CD40-antistoff eller et antigen-bindende fragment, hvor antistoff eller det antigen-bindende fragmentet binder til humant CD40. Bindingen av antistoffet eller det antigen-bindende fragmentet til CD40-inhiberer veksten eller differensieringen av celler av den CD40-assosierte
35 lidelsen. Den CD40-assosierte lidelsen kan for eksempel være kronisk lymfocytisk

leukemi, Burkitts lymfom, multippel myelom, en T-cellelymfom, Ikke-Hodgkins Lymfom, Hodgkins sykdom, Waldenstrøms makroglobulinjemi eller Kaposis sarkom.

Fremgangsmåter for å indusere utarming av perifere B- cellerer også beskrevet.

- 5 Fremgangsmåtene inkluderer å administrere til cellene et anti-CD40-antistoff eller et antigen-bindende fragment, hvor antistoff eller antigen-bindende fragment binder til et humant celleoverflate CD40-antigen. Bindingen av antistoffet eller det antigen-bindende fragmentet til CD40-antigenet induserer utarming av cellene. De perifere B- cellene kan, for eksempel, vise autoimmun reaktivitet i et individ.

10

Oppfinnelsen vil bli best forstått ved referanse til den følgende detaljerte beskrivelsen inkluderende de foretrukne utførelsesformene, tatt sammen med de vedlagte figurene og sekvenslisten.

15 **Kort beskrivelse av tegningene**

Figur 1A og 1B viser polypeptidet (SEQ ID NO:18) og kodende (SEQ ID NO:17) og komplementære DNA sekvenser av den tunge kjeden av et humanisert anti-CD40-

- 20 antistoff. Polypeptidsekvensen er kommentert til å indikere posisjonen av ledersekvensen, den variable regienn og den humane IgG₁ konstantregionen. Figur 1C viser polypeptidet (SEQ ID NO:21) og kodende (SEQ ID NO:20) og de komplementære DNA sekvensene av den lette kjeden av et humanisert anti-CD40-antistoff. Polypeptidsekvensen er kommentert til å indikere posisjonen av ledersekvensen, den variable regionen og den humane kappa konstantregionen.

25

Figur 2 viser effekten av behandling med et kontrollantistoff, et murint anti-CD40-antistoff, og et humanisert anti-CD40-antistoff på tumorvolum målt over en to-ukers periode, hvor behandling starter 13 dager etter tumortransplantering.

- 30 Figur 3 viser effekten av behandling med et kontrollantistoff, et murint anti-CD40-antistoff, og et humanisert anti-CD40-antistoff, på overlevelse av tumor-bærende mus.

Detaljert beskrivelse

- 35 For klarhet av redegjørelsen, og ikke som begrensning, er den detaljerte beskrivelsen av oppfinnelsen delt inn i underavsnittene som følger.

Når varenavn er benyttet her, refererer varenavnet også til varenavnproduktformuleringen, generiske medikamentet og den/de aktive farmasøytiske ingrediensen(e) av varenavnproduktet, med mindre enn på annen måte indikert ved sammenheng.

5

Med mindre enn definert på annen måte har alle tekniske og forskningsmessige betegnelser benyttet her, de samme betydningene som alminnelig forstått ved fagpersonen i feltet relevant for fremgangsmåtene og sammensetningene beskrevet.

10 **Definisjoner**

Betegnelsene “CD40” og “CD40-overflateantigen” refererer til et 50 kD glykoprotein uttrykt på overflaten av normale og neoplastiske B-celler, som virker som en reseptor for signaler involvert i cellulær proliferasjon og differensiering, og er noen ganger referert til som Bp50 (Ledbetter et al., 1987, *J. Immunol.* 138:788-785). Et cDNA molekyl kodende for CD40 har blitt isolert fra et bibliotek preparert fra Burkitt lymfomcellelinjen Raji (Stamenkovic et al., 1989, *EMBO J.* 8:1403). En celle som uttrykker CD40 er enhver celle karakterisert ved overflateekspresjonen av CD40, inkluderende, men ikke begrenset til, normale og neoplastiske B-celler, interdigitasjonsceller, basale epitelceller, karcinom celler, makrofager, endotelceller, follikulære dendrittceller, tonsilceller og benmarg-deriverte plasmaceller. I noen utførelsesformer er CD40-molekylet et humant CD40-molekyl.

Betegnelsene “CD40-antigen epitop” og “CD40-epitop”, som benyttet her, refererer til et molekyl (for eksempel et peptid) eller et fragment av et molekyl i stand til immunreaktivitet med et anti-CD40-antistoff og inkluderer for eksempel en CD40-antigen determinant gjenkjent ved S2C6 monoklonale antistoffet. CD40-antigen epitoper kan være inkludert i proteiner, proteinfragmenter, peptider eller lignende. Epitopene er for det meste alminnelige proteiner, korte oligopeptider, oligopeptidetterlignere (dvs. organiske forbindelser som etterligner antistoff-bindende egenskaper av CD40-antigenet), eller kombinasjoner derav.

Som benyttet her, refererer “spesifikk binding” og “binder spesifikt” til antistoff-binding til et på forhånd bestemt antigen. Vanligvis binder antistoffet med en affinitet på minst omkring $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, og binder til det på forhånd bestemte antigenet med en affinitet som er minst to ganger større enn dets affinitet for binding til et ikke-spesifikt antigen (for

35

eksempel BSA, kasein) annet enn det på forhånd bestemte antigenet eller et nært beslektet antigen.

- “Native antistoffer” og “native immunglobuliner” er definert her som heterotetramere glykoproteiner, vanligvis på omtrent 150.000 dalton, bestående av to identiske lette (L) kjeder og to identiske tunge (H) kjeder. Hver lette kjede er kovalent forbundet til en tung kjede ved en disulfidbinding for å danne en heterodimer. Heterotetrameren er dannet ved kovalent disulfidforbindelse mellom de to identiske tunge kjedene av slike heterodimerer. Selv om de lette og tunge kjedene er forbundet sammen ved en disulfidbinding, varierer antallet av disulfidbindinger mellom de to tunge kjedene ved immunglobulin isotype. Hver tunge og lette kjede har også regelmessige plasserte intrakjededisulfidbroer. Hver tunge kjede har ved den amino-terminale et variabelt domene (V_H), etterfulgt ved tre eller fire konstant domeneer (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} og C_{H4}), så vel en hengselregion mellom C_{H1} og C_{H2} . Hver lette kjede har to domener, et amino-terminalt variabelt domene (V_L) og et karboksy-terminalt konstant domene (C_L). V_L domenet assosierer ikke-kovalent med V_H domenet, imens C_L domenet alminnelig er kovalent forbundet til C_{H1} domenet via en disulfidbinding. Bestemte aminosyreresiduer er trodd til å danne en grenseflate mellom de lett og tung kjede variable domenene (Chothia et al., 1985, *J. Mol. Biol.* 186:651-663.)
- Betegnelsen “hypervariabel” refererer til det faktum at enkelte sekvenser innenfor de variable domenene varierer utstrakt i sekvens blant antistoffer og inneholder residuer som er direkte involvert i bindingen og spesifisiteten av hvert bestemte antistoff for dets spesifikke antigendeterminant. Hypervariabilitet, både i de lett kjede og tung kjede variable domenene, er konsentrert i tre segmenter kjent som komplementaritetsbestemmende regioner (CDRs) eller hypervariable løkker (HVLs). CDRer er definert ved sekvenssammenligning i Kabat et al., 1991, I: *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5. utg. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., mens HVLer er strukturelt definert i henhold til den tre-dimensjonale strukturen av det variable domenet, som beskrevet ved Chothia og Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917. Hvor disse to fremgangsmåtene resulterer i lett forskjellige identifiseringer av en CDR, er den strukturelle definisjonen foretrukket. Som definert ved Kabat, er CDR-L1 posisjonert ved omkring residuer 24-34, CDR-L2, ved omkring residuer 50-56 og CDR-L3, ved omkring residuer 89-97 i lett kjede variable domenet; CDR-H1 er posisjonert ved omkring residuer 31-35, CDR-H2 ved omkring residuer 50-65, og CDR-H3 ved omkring residuer 95-102 i tung kjede variable domenet.

De tre CDREne i hver av de tunge og lette kjedene er separert ved rammeverksregioner (FR), som inneholder sekvenser som tenderer til å være mindre variable. Fra den amino-terminale enden til den karboksyterminale enden av de tung og lett kjede variable domenene, er FRene og CDREne arrangert i rekkefølgen: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 og FR4. Den overveiende β -ark konfigurasjonen av FRene bringer CDREne i hver av kjedene til umiddelbar nærhet til hverandre så vel som til CDREne fra den andre kjeden. Den resulterende konformasjonen bidrar til det antigen-bindende setet (se Kabat et al., 1991, NIH Publ. Nr. 91-3242, Vol. I, s. 647-669), selv om ikke alle CDR-residuer nødvendigvis er direkte involvert i antigen-binding.

FR-residuer og Ig-konstante domener er ikke direkte involvert i antigen-binding, men bidrar til antigen-binding og/eller medierer antistoff-effektorfunksjon. Noen FR-residuer kan ha en signifikant effekt på antigen-binding på minst tre måter: ved ikke-kovalent binding direkte til en epitop, ved interaksjon med en eller flere CDR-residuer, og ved å påvirke grenseflaten mellom de tunge og lette kjedene. De konstante domenene er ikke direkte involvert i antigen-binding, men medierer ulike Ig-effektorfunksjoner, slik som deltagelse av antistoffet i antistoff-avhengig cellulær cytotoxicitet (ADCC), komplement avhengig cytotoxicitet (CDC) og antistoff-avhengig cellulær fagocytose (ADCP).

De lette kjedene av virveldyrimmunoglobuliner er anvist til en av to tydelig distinkte klasser, kappa (κ) og lambda (λ), basert på amino-syresekvensen av det konstante domenet. Ved sammenligning er de tunge kjedene av pattedyrske immunoglobuliner anvist til en av fem hovedklasser, i henhold til sekvensen av de konstante domenene: IgA, IgD, IgE, IgG og IgM. IgG og IgA er ytterligere delt inn i underklasser (isotyper), for eksempel, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ og IgA₂. De tung kjede konstante domenene som korresponderer til de forskjellige klassene av immunoglobulinene er henholdsvis kalt α , δ , ϵ , γ og μ . Subenhetstrukturene og de tre-dimensjonale konfigurasjonene av klassene av native immunoglobuliner er godt kjente.

Betegnelsene “antistoff”, “anti-CD40-antistoff”, “humanisert anti-CD40-antistoff” og “variant av humanisert anti-CD40-antistoff” er benyttet her i den bredeste betydningen og omfatter spesifikt monoklonale antistoffer (inkluderende full lengde monoklonale antistoffer), polyklonale antistoffer, multispesifikke antistoffer (for eksempel, bispesifikke antistoffer), og antistoff-fragmenter slik som variable domener og andre deler av antistoffer som viser en ønsket biologisk aktivitet, for eksempel, CD40-binding.

Betegnelsen “monoklonalt antistoff” (mAb) refererer til et antistoff oppnådd fra en populasjon av vesentlig homogene antistoffer; det betyr at de individuelle antistoffene omfatter populasjonen er identiske med unntak for naturlig forekommende mutasjoner som kan være tilstede i mindre mengder. Monoklonale antistoffer er sterkt spesifikke, binder direkte mot en enkel antigen determinant, også referert til som en epitop.

Modifikatoren “monoklonal” indikerer en vesentlig homogen populasjon av antistoffer rettet til den identiske epitopen og er ikke ment til å omfattes som å kreve produksjon av antistoffet ved noen bestemt fremgangsmåte. Monoklonale antistoffer kan bli laget ved enhver teknikk eller metodologi kjent i fagfeltet; for eksempel, hybridometoden først beskrevet ved Köhler et al., 1975, *Nature* 256:495, eller rekombinante DNA-metoder kjent i fagfeltet (se for eksempel U.S. Patent Nr. 4.816.567). I et annet eksempel kan monoklonale antistoffer også bli isolert fra fagantistoff-bibliotek, ved å benytte teknikker beskrevet i Clackson et al., 1991, *Nature* 352: 624-628, og Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597.

I motsetning er antistoffene i et preparat av polyklonale antistoffer vanligvis en heterogen populasjon av immunoglobulinisotyper og/eller klasser og viser også et utvalg av epitop spesifisitet.

Betegnelsen “kimært” antistoff som benyttet her er en type av monoklonalt antistoff hvor en del av eller den fullstendige aminosyresekvensen i en eller flere regioner eller domener av den tunge og/eller lette kjeden er identisk med, homolog til, eller en variant av den korresponderende sekvensen i et monoklonalt antistoff fra en annen art eller som tilhører en annen immunoglobulinklasse eller isotype, eller fra en konsensus sekvens. Kimære antistoffer inkluderer fragmenter av slike antistoffer, forutsatt at antistoff-fragmentet viser den ønskede biologiske aktiviteten av dets moderantistoff, for eksempel binding til det samme epitopet (se for eksempel US Patent Nr. 4.816.567; og Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855).

Betegnelsene “antistoff-fragment”, “anti-CD40-antistoff-fragment”, “humanisert anti-CD40-antistoff-fragment”, “variant av humanisert anti-CD40-antistoff-fragment” refererer til en del av et full-lengde anti-CD40-antistoff, hvor en variabel region eller en funksjonell evne er beholdt, for eksempel, spesifikk CD40-epitop-binding. Eksempler på antistoff-fragmenter inkluderer, men er ikke begrenset til, en Fab, Fab’, F(ab’)₂, Fd, Fv, scFv og scFv-Fc fragment, en diabody, et lineært antistoff, et enkel-kjede antistoff, en

minibody, en diabody dannet fra antistoff-fragmenter, og multispesifikke antistoffer dannet fra antistoff-fragmenter.

Enkelte typer av antistoff-fragmenter kan bli generert ved enzymatisk behandling av et
 5 full-lengde antistoff. Papain-fordøyning av antistoffer produserer to identiske antigen-
 bindende fragmenter kalt “Fab” fragmenter, hvert med et enkelt antigen-bindende sete, og
 et “Fc”-restfragment, såkalt på grunn av dets evne til å krystallisere raskt. Fab-
 fragmentet inneholder også det konstante domenet av den lette kjeden og C_H1-domenet
 av den tunge kjeden. Pepsinbehandling gir et F(ab')₂ fragment som har to antigen-
 10 bindende seter og er fortsatt i stand til å kryssforbinde antigen.

Fab'-fragmenter er forskjellig fra Fab-fragmenter ved nærværet av noen få ytterligere
 residuer ved den C-terminale enden av C_H1-domenet, inkluderende et eller flere cysteiner
 fra antistoff hengselregionen. Fab-SH er betegnelsen her for en Fab' hvor
 15 cysteinresiduen(e) av de konstante domene bærer en fri tiolgruppe. F(ab')₂ antistoff-
 fragmenter er par av Fab' fragmenter forbundet ved cysteinresiduer i hengselregionen.
 Andre kjemiske koblinger av antistoff-fragmenter er også kjente.

“Fv” er et minimalt antistoff-fragment som inneholder et fullstendig antigen-
 20 gjenkjennings- og bindingssete bestående av en dimer av et tungt og et lett kjede variabelt
 domene i tett, ikke-kovalent assosiasjon. I denne konfigurasjonen interagerer de tre
 CDRe av hvert variable domene for å definere et antigen-bindende sete på overflaten
 av V_H-V_L dimeren. Samlet sett overdrar de seks CDRe antigen-bindende spesifisitet
 til antistoffet.

25 Et “enkelt-kjede Fv” eller “scFv” antistoff-fragment er en enkel-kjede Fv variant
 omfattende V_H og V_L domene av et antistoff, hvor domene er tilstede i en enkel
 polypeptidkjede og som er i stand til å gjenkjenne og binde antigen. scFv polypeptidet
 inneholder eventuelt en polypeptidlinker posisjonert mellom V_H og V_L domene som
 30 muliggjør scFv å danne en ønsket tre-dimensjonal struktur for antigen-binding (se for
 eksempel Pluckthun, 1994, I *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113,
 Rosenberg og Moore utg., Springer-Verlag, New York, s. 269-315).

Betegnelsen “diabodier” refererer til små antistoff-fragmenter som har to antigen-
 35 bindende seter. Hvert fragment inneholder et tungt kjede variabelt domene (V_H)
 sammenkjedet til et lett kjede variabel domene (V_L). Ved å benytte en linker som er for

kort til å tillate paring mellom de to domenene på den samme kjeden, er forbundede
 linkede V_H - V_L domener tvunget til par med komplementære domener av en annen kjede,
 som skaper to antigen-bindende seter. Diabodier er beskrevet mer fullstendig, for
 eksempel, i EP 404,097; WO 93/11161; og Hollinger et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.*
 5 USA 90: 6444-6448.

Betegnelsen "lineære antistoffer" refererer til antistoffer som omfatter et par av tandem
 Fd segmenter (V_H - C_{H1} - V_H - C_{H1}) som danner et par av antigen-bindende regioner.
 Lineære antistoffer kan være bispesifikke eller monospesifikke som beskrevet i, for
 10 eksempel, Zapata et al. 1995, *Protein Eng.* 8(10):1057-1062.

Et humanisert antistoff eller et humanisert antistoff-fragment inkluderer en immuno-
 globulin aminosyresekvensvariant, eller fragment derav, som er i stand til å binde til et på
 forhånd bestemt antigen, og som omfatter en eller flere FRer som har hovedsakelig
 15 aminosyresekvensen av et humant immunoglobulin og en eller flere CDRer som
 hovedsakelig har aminosyresekvensen av et ikke-humant immunoglobulin. Denne ikke-
 humane aminosyresekvensen er referert til her som en "import" sekvens, som vanligvis er
 tatt fra et "import" antistoff-domene, spesielt et variabelt domene. Generelt inkluderer et
 humanisert antistoff minst CDRene eller HVLene av et ikke-humant antistoff, satt inn
 20 mellom FRene av et humant tung eller lett kjede variabelt domene. I enkelte aspekter
 inneholder et humanisert anti-CD40-antistoff CDR og/eller HVL residuer eller sekvenser
 derivert fra det murine monoklonale antistoffet S2C6 satt inn mellom FRene av human
 konsensus sekvens tung og lett kjede variable domener.

I et aspekt omfatter et humanisert anti-CD40-antistoff hovedsakelig alle av minst et, og
 vanligvis to, variable domener (slik som, for eksempel, er i Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc og Fv
 fragmenter) hvor alle, eller hovedsakelig alle, av CDRene korresponderer til dem av et
 ikke-humant immunoglobulin og alle, eller hovedsakelig alle, av FRene er dem av en
 human immunoglobulin konsensus sekvens. I et annet aspekt inkluderer et humanisert
 30 anti-CD40-antistoff også minst en del av en immunoglobulin Fc region, vanligvis den av
 et humant immunoglobulin. Ordinært vil antistoffet inneholde både den lette kjeden så
 vel som minst det variable domenet av en tung kjede. Antistoffet kan også inkludere en
 eller flere av C_{H1} , hengsel, C_{H2} , C_{H3} og/eller C_{H4} regionene av den tunge kjeden, som
 hensiktsmessig.

Et humanisert anti-CD40-antistoff kan bli valgt fra enhver klasse av immunoglobuliner, inkluderende IgM, IgG, IgD, IgA og IgE, og enhver isotype, inkluderende IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ og IgA₂. For eksempel kan det konstante domenet være et komplement-fikserende konstant domene hvor det er ønsket at det humaniserte antistoffet viser
 5 cytotoksisk aktivitet, og isotypen er vanligvis IgG₁. Hvor slik cytotoksisk aktivitet ikke er ønsket, kan det konstante domenet være av en annen isotype, for eksempel, IgG₂. Et alternativt humanisert anti-CD40-antistoff kan omfatte sekvenser fra mer enn en immunoglobulinklasse eller isotype, og å velge bestemte konstante domener for å optimalisere ønskede effektorfunksjoner er innenfor ordinær dyktighet i fagfeltet.

10 FRene og CDRene, eller HVLene, av et humanisert anti-CD40-antistoff trenger ikke å korrespondere presist til hovedsekvensene. For eksempel kan en eller flere residuer i importert CDR, eller HVL, eller konsensus FR sekvensen bli endret (for eksempel mutagenisert) ved substitusjon, innsetting eller delesjon slik at den resulterende amino-
 15 syrerresiduen ikke lenger er identisk til den opprinnelige residuen i den korresponderende posisjonen i hver modersekvens. Slike endringer vil imidlertid vanligvis ikke være omfattende. Vanligvis vil minst 75% av de humaniserte antistoffresiduene korrespondere til det av moder-konsensus FR og import CDR sekvenser, ofte minst 90%, og mest hyppig mer enn 95%, eller mer enn 98% eller mer enn 99%.

20 Immunoglobulinresiduer som påvirker grenseflaten mellom tung og lett kjede variable regioner ("V_L -V_H grenseflaten") er dem som påvirker nærheten eller orienteringen av de to kjedene med hensyn på hverandre. Enkelte residuer som kan være involvert i inter-kjedeinteraksjoner inkluderer V_L residuer 34, 36, 38, 44, 46, 87, 89, 91, 96 og 98, og V_H
 25 residues 35, 37, 39, 45, 47, 91, 93, 95, 100 og 103 (ved å benytte nummereringssystemet presentert i Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD., 1987)). Ytterligere residuer inkluderer V_L residuer 43 og 85, og V_H residuer 43 og 60, som angitt i US Patent Nr. 6.407.213. . Mens disse residuene er indikert for bare human IgG, er de anvendbare på kryss av arter. Import
 30 antistoff-residuer som rimelig er forventet til å være involvert i interkjedeinteraksjoner er valgt for substitusjon i konsensus sekvensen.

Betegnelse "konsensus sekvens" og "konsensus antistoff" som benyttet her, refererer til en aminosyresekvens som omfatter den mest hyppig forekommende aminosyreresiduen
 35 ved hver lokalisering i alle immunoglobuliner av enhver bestemt klasse, isotype eller subenhetstruktur, for eksempel, et humant immunoglobulin variabelt domene. Konsensus

sekvensen kan være basert på immunoglobuliner av en bestemt art eller av mange arter. En “konsensus” sekvens, struktur eller antistoff er forstått til å omslutte en konsensus human sekvens som beskrevet i enkelte ut enkelte utførelsesformer, og referere til en aminosyresekvens som omfatter de mest hyppig forekommende aminosyreresiduen ved

5 hver lokalisering i alle humane immunoglobuliner av enhver bestemt klasse, isotype eller subenhetstruktur. Tilveiebrakt er konsensus humanstrukturer og konsensus strukturer som betrakter andre arter i tillegg til humane. Konsensussekvensen inneholder derfor en aminosyresekvens som har ved hver posisjon en aminosyre som er tilstede i et eller flere kjente immunoglobuliner, men som ikke eksakt kopierer den fullstendige aminosyre-

10 sekvensen av ethvert enkelt immunoglobulin. Konsensussekvensen av variabel region er ikke oppnådd fra ethvert naturlig produsert antistoff eller immunoglobulin. Nyttige konsensussekvenser inkluderer en human variabel lett kjede kappa I konsensussekvens (SEQ ID NO:13) og en human variabel tung kjede undergruppe III konsensussekvens (SEQ ID NO:2), derivert fra dataene tilveiebrakt i Kabat et al., 1991, Sequences of

15 Proteins of Immunological Interest, 5. utg. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., og varianter derav. FRene av tung og lett kjede konsensus sekvenser, og varianter derav, tilveiebringer nyttige sekvenser for fremstillingen av humaniserte anti-CD40-antistoffer. Se for eksempel US Patenter Nr. 6.037.454 og 6.054.297. I visse utførelsesformer ble FRen benyttet for å fremstille de humaniserte

20 antistoffene derivert fra konsensussekvenser for en human variabel lett kjede kappa I konsensussekvens og for en human variabel tung kjede undergruppe III konsensus sekvens.

Som benyttet her, refererer “variant”, “anti-CD40-variant”, “humanisert anti-CD40-variant” eller “variant humanisert anti-CD40” hver til et humanisert anti-CD40-antistoff som har minst en tung kjede variabel CDR eller HVL sekvens derivert fra det murine monoklonale antistoffet S2C6 og FR sekvenser derivert fra humane konsensus sekvenser. Varianter inkluderer de som har en eller flere aminosyreendringer i et eller begge lett kjede eller tung kjede variable domener, tilveiebrakt at aminosyreendringen ikke

30 vesentlig svekker binding av antistoffet til CD40. Humaniserte anti-CD40-varianter inkluderer vanligvis aminosyresubstitusjoner som tilveiebringer antistoffyteevne ved å tillate forbedret folding av antistoffmolekylet.

Et “isolert” antistoff er et som har blitt identifisert og separert og/eller utvunnet fra en

35 komponent av dets naturlige omgivelse. Kontaminerende komponenter av antistoffets naturlige omgivelse er de materialene som kan interferere med diagnostiske eller

terapeutiske anvendelser av antistoffet, og kan være enzymer, hormoner eller andre proteinøse eller ikke-proteinøse oppløste stoffer. I et aspekt vil antistoffet være renset:

- 5 (a) til mer enn 95% isolering ved vekt av antistoff som bestemt ved Lowry-metoden, og i et aspekt mer enn 99% isolering ved vekt, eller
- (b) til en grad av isolering tilstrekkelig til å oppnå minst 15 residuer av N-terminal eller innvendig aminosyresekvens ved anvendelse av en spinning cup sekvensator, eller
- 10 (c) til homogenitet ved SDS-PAGE under reduserende eller ikke-reduserende forhold som visualisert, ved å benytte Coomassie blå eller, fortrinnsvis sølvfarge.

Et isolert antistoff inkluderer et antistoff *in situ* i rekombinante celler, siden minst en komponent av antistoffets naturlige omgivelse ikke vil være tilstede. Ordinært vil
15 imidlertid et isolert antistoff bli preparert ved minst et rensetrinn.

Betegnelsen “antistoff-yteevne” refererer til faktorer som bidrar til antistoff-gjenkjenning av antigen eller effektiviteten av et antistoff *in vivo*. Endringer i aminosyresekvensen av et antistoff kan påvirke antistoffegenskaper slik som folding, og kan influere på
20 fysikalske faktorer slik som initiell hastighet av antistoff-binding til antigen (v_o), dissosiasjonskonstant av antistoffet fra antigen (K_d), affinitetskonstant av antistoffet for antigenet, konformasjon av antistoffet, proteinstabilitet og halveringstid av antistoffet.

Betegnelsen ”epitopmerket” når benyttet her, refererer til et anti-CD40-antistoff fusjonert til et “epitopmerke”. Et “epitopmerke” er et polypeptid som har et tilstrekkelig antall aminosyrer for å tilveiebringe et epitop for antistoffproduksjon, og er likevel designet slik at det ikke interfererer med den ønskede aktiviteten av det humaniserte anti-CD40-antistoffet. Epitopmerket er vanligvis tilstrekkelig unikt slik at et antistoff reist mot
25 epitopmerket ikke vesentlig kryssreagerer med andre epitoper. Egnede merkepolypeptider inneholder generelt minst 6 aminosyreresiduer og inneholder vanligvis omkring 8 til 50 aminosyreresiduer, eller omkring 9 til 30 residuer. Eksempler på epitopmerker og antistoffet som binder epitopen inkluderer flu HA merkepolypeptidet og dets antistoff 12CA5 (Field et al., 1988 *Mol. Celle. Biol.* 8: 2159-2165; c-myc merke og 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 og 9E10 antistoffer dertil (Evan et al., 1985, *Mol. Celle. Biol.*
30 5(12):3610-3616; og Herpes simplex virus glykoprotein D (gD) merke og dets antistoff (Paborsky et al. 1990, *Protein Engineering* 3(6): 547-553). I enkelte utførelsesformer er
35

epitopmerket en “bergingsreseptor-bindende epitop”. Som benyttet her, refererer betegnelsen ”bergingsreseptor-bindende epitop” til en epitop av Fc regionen av et IgG molekyl (slik som IgG₁, IgG₂, IgG₃ eller IgG₄) som er ansvarlig for å øke *in vivo* serum halveringstiden av IgG molekylet.

5

Betegnelsen “cytotoksisk middel” refererer til en substans som inhiberer eller forebygger funksjonen av celler og/eller forårsaker destruksjon av celler. Betegnelsen er ment til å inkludere radioaktive isotoper (slik som I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, og Re¹⁸⁶), kjemoterapeutiske midler, og toksiner slik som enzymatisk aktive toksiner av bakteriell, fungal, plante- eller

10 dyreopprinnelse, og fragmenter derav. Slike cytotoxiske midler kan bli koblet til et antistoff, for eksempel, et humanisert anti-CD40-antistoff, ved å benytte kjente, standard prosedyrer, og benyttet, for eksempel, å behandle en pasient indikert for terapi med antistoffet.

15 Et “kjemoterapeutisk middel” er en kjemisk forbindelse nyttig i behandlingen av cancer. Eksempler på kjemoterapeutiske midler inkluderer alkylende midler slik som tiotepa og cyklofosfamid (CYTOXANTM); alkylende sulfonater slik som busulfan, improsulfan og piposulfan; aziridiner slik som benzodopa, karboquon, meturedopa og uredopa; etyleniminer og metylamelaminer inkluderende altretamin, trietylenmelamin,

20 trietylenfosforamid, trietylentiofosforamid og trimetylolomelamin; acetogener (spesielt bullatacin og bullatacinon); kamptotecin (inkluderende den syntetiske analogen topotekan); bryostatin; callystatin; CC-1065 (inkluderende dens adozelesin, carzelesin og bizelesin syntetiske analoger); kryptofyciner (spesielt kryptofycin 1 og kryptofycin 8); dolastatin, auristatiner, (inkluderende analoger monometyl-auristatin E og monometyl-

25 auristatin F); duokarmycin (inkluderende de syntetiske analogene, KW-2189 og CBI-TMI); eleuterobin; pankratistatin; sarkodicytin; spongistatin; nitrogensenneper slik som klorambucil, klornafazin, kolofosfamid, estramustin, ifosfamid, mekloretamin, mekloretaminoksidhydroklorid, melfalan, novembikin, fenesterin, prednimustin; trofosfamid, uracilsennep; nitrosureaer slik som karmustin, klorzotocin, fotemustin,

30 lomustin, nimustin, ranimustin; antibiotika slik som enediynantibiotikaene (for eksempel kalikeamicin, spesielt kalikemicin gammaII og kalikeamicin phiII, se for eksempel Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186; dynemicin, inkluderende dynemicin A; bisfosfonater, slik som klodronat; esperamicin; så vel som neokarzinostatinkromofor og relaterte kromoprotein enediynantibiotiske kromoforer), aklacinomysiner, aktinomycin,

35 autramycin, azaserin, bleomyciner, kaktinomycin, karabycin, karminomycin, karzinofilin, krommyciner, daktinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-okso-L-norleucin,

doksorubicin (AdriamycinTM) (inkluderende morfolino-doksorubicin, cyanomorfolino-doksorubicin, 2-pyrrolino-doksorubicin og deoksydoksorubicin), epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomycin, mitomyciner slik som mitomycin C, mykofenolsyre, nogalamycin, olivomyciner, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, 5 rodorubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimeks, zinostatin, zorubicin; anti-metabolitter slik som metotreksat og 5-fluoruracil (5-FU); folsyreanaloger slik som denopterin, metotreksat, pteropterin, trimetreksat; purinanaloger slik som fludarabin, 6-merkaptopurin, tiamiprin, tioguanin; pyrimidinanaloger slik som ancitabin, azacitidin, 6-azauridin, karmofur, cytarabin, dideoksyuridin, doksifluridin, enocitabin, floksuridin; 10 androgener slik som kalusteren, dromostanolenpropionat, epitiostanol, mepitiostan, testolakten; anti-adranaler slik som aminoglutetimid, mitotan, trilostan; folsyre supplerende midler slik som frolinsyre; aceglaton; aldofosfamidglykosid; aminolevulin syre; eniluracil; amsakrin; bestrabucil; bisantren; edatraksat; defofamin; demokolcin; diaziquen; elfornitin; elliptiniumacetat; en epotilen; etoglucid; galliumnitrat; 15 hydroksyurea; lentinan; lonidamin; maytansinoider slik som maytansin og ansamitociner; mitoguazen, mitoksantren; mopidamol; nitracrin; pentostatin; fenamet; pirarubicin; losoksantren; podofyllinsyre; 2-etylhydrazid; prokarbazin; PSK®; razoksan; rhizoksin; sizofiran; spirogermanium; tenuazonisyre; triaziquen; 2,2',2"-triklortrietylamin; trikotecener (spesielt T-2 toksin, verracurin A, roridin A og anguidin); uretan; vindesin; 20 dakarbazin; mannomustin; mitabronitol; mitolaktol; pipobroman; gacytosin; arabinosid ("Ara-C"); cyklofosfamid; tiotepa; taksoider, for eksempel, paklitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) og doksetaxel (TAXOTERE®, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); klorambucil; gemcitabin (GemzarTM); 6-tioguanin; merkaptopurin; metotreksat; platinaanaloger slik som cisplatin og karboplatin; vinblastin; 25 platina; etoposid (VP-16); ifosfamid; mitoksantren; vinkristin; vinorelbin (NavelbineTM); novantren; teniposid; edatreksat; daunomycin; aminopterin; xeloda; ibandronat; CPT-11; topoinoenraseinhibitor RFS 2000; difluormetylornitin (DMFO); retinoider slik som retin syre; kapecitabin; og farmasøytisk akseptable salter, syrer eller derivater av enhver av det ovenfor. Også inkludert i denne definisjonen er anti-hormonelle midler som tjener til å 30 regulere eller inhibere hormonvirkning på tumorer slik som anti-østrogener og selektive østrogenreseptormodulatorer (SERMer), inkluderende for eksempel tamoksifen (inkluderende NolvadexTM), raloksifen, droloksifen, 4-hydroksytamoksifen, trioksifen, keoksifen, LY117018, onapristen og toremifen (FarestonTM); aromataseinhibitorer som inhiberer enzymet aromatase, som regulerer østrogenproduksjon i binyrene, slik som for 35 eksempel 4(5)-imidazole, aminoglutetimid, megestrolacetat (MegaceTM), eksemestan, formestan, fadrozol, vorozol (RivisorTM), letrozol (FemaraTM) og anastrozol

(Arimidex™); og anti-androgener slik som flutamid, nilutamid, bicalutamid, leuprolid og goserelin; og farmasøytisk akseptable salter, syrer eller derivater av enhver av det ovenfor.

- 5 Betegnelsen “promedikament” som benyttet her refererer til en forløper eller en derivat form av en farmasøytisk aktiv substans som er mindre cytotoxisk for tumorceller sammenlignet med modermedikamentet og er i stand til å bli enzymatisk aktivert eller omdannet til den mer aktive formen. Se for eksempel Wilman, 1986, "Prodrugs in Cancer Chemandready", I *Biochemical Society Transactions*, 14, s. 375-382, 615th Meeting
- 10 Belfast og Stella et al., 1985, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery, I: *Directed Drug Delivery*, Borchardt et al., (utg.), s. 247-267, Humana Press. Nyttige promedikamenter inkluderer, men er ikke begrenset til, fosfatinnholdende promedikamenter, tiofosfatinnholdende promedikamenter, sulfatinnholdende promedikamenter, peptidinnholdende promedikamenter, D-aminosyre-modifiserte
- 15 promedikamenter, glykosylerte promedikamenter, β -laktam-inneholdende promedikamenter, eventuelt substituerte fenoksyacetamid-inneholdende promedikamenter og eventuelt substituerte fenylacetamid-inneholdende promedikamenter, 5-fluorcytosin og andre 5-fluoruridin promedikamenter som kan bli omdannet til det mer aktive cytotoxiske frie medikamentet. Eksempler på cytotoxiske medikamenter som kan bli
- 20 derivatisert til en promedikamentform inkluderer, men er ikke begrenset til, de kjemoterapeutiske midlene beskrevet ovenfor.

- Betegnelsen “merke” refererer til en detekterbar forbindelse eller sammensetning som er konjugert direkte eller indirekte til antistoffet. Merket kan i seg selv være detekterbart
- 25 (for eksempel radioisotopmerker eller fluorescerende merker) eller i tilfellet av et enzymatisk merke, kan det katalyseres kjemisk endring av en substratforbindelse eller sammensetning som er detekterbar. Merket humanisert anti-CD40-antistoff kan bli fremstilt og benyttet i ulike anvendelser inkluderende *in vitro* og *in vivo* diagnostikk.

- 30 Et “liposom” er en liten vesikel bestående av ulike typer av lipider, fosfolipider og/eller overflateaktivt stoff. Liposomer er nyttige for levering til et pattedyr av en forbindelse eller formulering, slik som et humanisert anti-CD40-antistoff beskrevet her, eventuelt, koblet til eller i kombinasjon med et eller flere farmasøytisk aktive midler. Komponentene av liposomet er alminnelig arrangert i en dobbeltlag form, lignende lipid
- 35 arrangementen av biologiske membraner.

Et “isolert” nukleinsyremolekyl er et nukleinsyremolekyl som er identifisert og separert fra minst et kontaminerende nukleinsyremolekyl med hvilket det er alminnelig assosiert i den naturlige kilden av antistoff nukleinsyren. Et isolert nukleinsyremolekyl er annet enn i formen eller settingen hvor det er funnet i naturen. Isolerte nukleinsyremolekyler er
 5 derfor skjelnbare fra nukleinsyremolekylet som det eksisterer i naturlige celler.

Imidlertid inkluderer et isolert nukleinsyremolekyl et nukleinsyremolekyl som finnes i celler som ordinært uttrykker antistoffet hvor, for eksempel, nukleinsyremolekylet er i en kromosomal lokalisering forskjellig fra den av naturlige celler.

- 10 Betegnelsen “kontrollsekvenser” refererer til polynukleotidsekvenser nødvendig for ekspresjon av en funksjonelt forbundet kodende sekvens i en bestemt vertsorganisme. Kontrollsekvensene egnet for anvendelse i prokaryote celler inkluderer, for eksempel, promoter, operator og ribosom bindingssetesekvenser. Eukaryote kontrollsekvenser inkluderer, men er ikke begrenset til, promotere, polyadenyleringssignaler og enhancere.
 15 Disse kontrollsekvensene kan bli benyttet for ekspresjon og produksjon av humanisert anti-CD40-antistoff i prokaryote og eukaryote vertsceller.

- En nukleinsyresekvens er “funksjonelt forbundet” når den er plassert i et funksjonelt forhold med en annen nukleinsyresekvens. For eksempel er en nukleinsyrepresekvens
 20 eller sekretorisk «leader» funksjonelt forbundet til en nukleinsyre kodende for et polypeptid om den er uttrykt som et preprotein som deltar i sekresjonen av polypeptidet; en promoter eller enhacser er funksjonelt forbundet til en kodende sekvens om den påvirker transkripsjonen av sekvensen; eller et ribosombindingssete er funksjonelt forbundet til en kodende sekvens om det posisjonert på en måte som fremmer translasjon.
 25 Generelt betyr ”funksjonelt forbundet” at DNA-sekvensene er forbundet kontinuerlig, og i tilfellet av en sekretorisk leder, kontinuerlig og i leseramme. Imidlertid er enhancere eventuelt kontinuerlige. Forbinding kan bli utført ved legering ved bekvemmelige restriksjonsseter. Om slike seter ikke eksisterer, kan syntetiske oligonukleotidadaptore eller linkere bli benyttet.

- 30 Som benyttet her, er uttrykkene “celle”, “cellelinje” og “cellekultur benyttet vekslende og alle slike betegnelser inkluderer etterkommeren derav. “Transformanter” og “transformerte celler” inkluderer derfor den primære subjektcellen og kulturer derivert derfra uten hensyn til antallet av overføringer. Det må forstås at ikke alle etterkommere
 35 kan være presist identiske i DNA-innhold, på grunn av overveide eller naturlig forekommende mutasjoner. Mutant etterkommer som har den samme funksjonen eller

biologiske aktiviteten som screenet for i den opprinnelig transformerte cellen er inkludert. Hvor forskjellige betegnelser er tiltenkt, vil det være tydelig fra sammenhengen.

Betegnelsen “pattedyr” for formål av behandling refererer til ethvert dyr klassifisert som et pattedyr, inkluderende mennesker, husdyr og landbruksdyr, og dyr i dyrehage, sportsdyr eller kjæledyr, slik som hunder, hester, katter, kuer og lignende. Fortrinnsvis er pattedyret humant.

En “lidelse”, som benyttet her, er enhver tilstand som vil dra fordel fra behandling med et humanisert anti-CD40-antistoff beskrevet her. Dette inkluderer kroniske og akutte lidelser eller sykdommer inkluderende de patologiske tilstandene som predisponerer pattedyret for lidelsen det dreier seg om. Ikke-begrensede eksempler eller lidelser som skal bli behandlet her inkluderer cancer, hematologiske maligniteter, godartede og ondartede tumorer, leukemier og lymfoide maligniteter og inflammatoriske, angiogene og immunologiske lidelser.

Betegnelsene “cancer” og “cancerøs” refererer til eller beskriver den fysiologiske tilstanden i pattedyr som vanligvis er karakterisert ved uregulert cellevekst. Eksempler på cancer inkluderer, men er ikke begrenset til, karcinom, lymfom, blastom, sarkom og leukemi.

Som benyttet her, refererer betegnelsen “CD40-assosiert lidelse” eller “CD40-assosiert sykdom” til en tilstand hvor modifikasjon eller eliminering av celler som uttrykker CD40-er indikert. Disse inkluderer CD40-uttrykkende celler som demonstrerer unormal proliferasjon eller CD40-uttrykkende celler som er assosiert med cancerøs eller malign vekst. Mer bestemte eksempler på cansere som demonstrerer unormal ekspresjon av CD40-antigen inkluderer B lymfoblastoide celler, Burkitts lymfom, multippel myelom, T cellelymfomer, Kaposi sarkom, osteosarkom, epidermale tumorer og endoteltumorer, pankreas, lunge, bryst, ovarier, kolon, prostata, hode og hals, hud (melanom), blære og nyrecancere. Slike lidelser inkluderer, men er ikke begrenset til, leukemier, lymfomer, inkluderende B-cellelymfom og ikke-Hodgkins lymfom, multippel myelom, Waldenstrøms makroglobulinemi; solide tumorer, inkluderende sarkomaer, slik som osteosarkom, Ewings sarkom, malign melanom, adenokarcinom, inkluderende ovarian adenokarcinom, Kaposi sarkom/Kaposi tumor og plateepitelcellekarcinom.

En CD40-assosiert lidelse inkluderer også sykdommer og lidelser av immunsystemet, slik som auto-immune lidelser og inflammatoriske lidelser. Slike tilstander inkluderer, men er ikke begrenset til, reumatoid artritt (RA), systemisk lupus erytematosus (SLE), skleroderm, Sjøgrens syndrom, multiple sklerosis, inflammatorisk tarmsykdom (for eksempel ulcerative kolitt og Crohns sykdom), pulmonær inflammasjon, astma og idiopatisk trombocytopenisk purara (TTP).

Frasen “arresterer veksten av” eller “vekstinhiberende” når benyttet her refererer til inhibering av vekst eller proliferasjon av en celle, spesielt en neoplastisk celletype uttrykkende CD40-antigenet. Vekstinhibering reduserer derfor, for eksempel, signifikant prosentandelen av neoplastiske celler i S-fase.

Betegnelsen “intravenøs infusjon” refererer til introduksjon av et middel i venet til et dyr eller human pasient over en tidsperiode større enn omtrent 15 minutter, generelt mellom omtrent 30 til 90 minutter.

Betegnelsen “intravenøs bolus” eller “intravenøst press ” refererer til medikament administrasjon i en vene av et dyr eller menneske slik at kroppen mottar medikamentet på omtrent 15 minutter eller mindre, generelt 5 minutter eller mindre.

Betegnelsen “subkutan administrasjon” refererer til introduksjon av et middel under huden av et dyr eller human pasient, fortrinnsvis innenfor en lomme mellom huden og underliggende vev, ved relativt sakte, opprettholdt levering fra en medikamentbeholder. Klemming eller trekking av huden opp og vekk fra underliggende vev kan skape lommen.

Betegnelsen “subkutan infusjon” refererer til introduksjon av et medikament under huden av et dyr eller human pasient, fortrinnsvis innenfor en lomme mellom huden og underliggende vev, ved relativt sakte, opprettholdt levering fra en medikamentbeholder for en tidsperiode inkluderende, men ikke begrenset til, 30 minutter eller mindre, eller 90 minutter eller mindre. Eventuelt kan infusjonen bli gjort ved subkutan implantasjon av en medikamentleveringspumpe implantert under huden av dyret eller humane pasienten, hvor pumpen leverer en på forhånd bestemt mengde av medikament for en på forhånd bestemt tidsperiode, slik som 30 minutter, 90 minutter eller tidsperiode som spenner over lengden av behandlingsregimet.

Betegnelsen “subkutan bolus” refererer til medikamentadministrasjon under huden av et dyr eller human pasient, hvor bolusmedikamentlevering er mindre enn omtrentlig 15 minutter; i et annet aspekt mindre enn 5 minutter, og i et annet aspekt, mindre enn 60 sekunder. I et ytterligere aspekt er administrasjon innenfor en lomme mellom huden og underliggende vev, hvor lommen kan bli skapt ved å klemme eller trekke huden opp og vekk fra underliggende vev.

Betegnelsen “terapeutisk effektiv mengde” er benyttet for å referere til en mengde av et aktivt middel som har fordelaktig pasientresultat, for eksempel, en vekstarresterende effekt eller forårsaker delesjonen av cellen. I et aspekt har den terapeutisk effektive mengden apoptotisk aktivitet, eller er i stand til å indusere celledød. I et annet aspekt refererer den terapeutisk effektive mengden til en serum målkonsentrasjon som har blitt vist til å være effektiv i, for eksempel, å forsinke sykdomsprogresjon. Virkeevne kan bli målt på konvensjonelle måter, avhengig av tilstanden som blir behandlet. I neoplastiske sykdommer eller lidelser karakterisert ved celler som uttrykker CD40, kan for eksempel virkeevne bli målt ved å bestemme tiden til sykdomsprogresjon (TTP) eller bestemme responsratene (RR).

Betegnelsene “behandling” og “terapi” og lignende, som benyttet her, er ment til å inkludere terapeutiske så vel som profylaktiske, eller undertrykkende målinger for en sykdom eller lidelse som fører til enhver klinisk ønskelig eller fordelaktig effekt, inkluderende, men ikke begrenset til, lindring eller lettelse av et eller flere symptomer, regresjon, forsinkning eller opphør av progresjon av sykdommen eller lidelsen. Betegnelsen behandling inkluderer derfor for eksempel administrasjonen av et middel før eller etter starten av et symptom på en sykdom eller lidelse som derved forebygger eller fjerner et eller flere tegn på sykdommen eller lidelsen. Som et annet eksempel inkluderer betegnelsen administrasjonen av et middel etter klinisk manifestering av sykdommen for å motarbeide symptomene av sykdommen. Videre omfatter administrasjon av et middel etter start og etter kliniske symptomer har utviklet seg, hvor administrasjon påvirker kliniske parametere av sykdommen eller lidelsen, slik som graden av vevsskade eller mengden eller omfanget av metastase, hvorvidt eller ikke behandlingen fører til forbedring av sykdommen, “behandling” eller “terapi” som benyttet her.

Betegnelsen “pakningsinnlegg” er benyttet til å referere til instruksjoner vanlig inkludert i kommersielle pakninger av terapeutiske produkter, som inneholder informasjon omkring

indikasjonene, bruken, administrasjonen, kontraindikasjonene og/eller advarslene som angår anvendelsen av slike terapeutiske produkter.

5 Forkortelsen “AFP” refererer til dimetylvalin-valin-dolaisoleuin-dolaproin-fenylalanin-p-fenylendiamin.

Forkortelsen “MMAE” refererer til monometylauristatin E.

10 Forkortelsen “AEB” refererer til en ester produsert ved å reagere auristatin E med paraacetylbenzosyre.

Forkortelsen “AEVB” refererer til en ester produsert ved å reagere auristatin E med benzoylvalersyre.

15 Forkortelsen “MMAF” refererer til dovalin-valin-dolaisoleunin-dolaproin-fenylalanin.

Antistoffer

Beskrevet og angitt her er humaniserte anti-CD40-antistoffer, og sammensetninger og artikler for fremstilling omfattende et humanisert anti-CD40-antistoff. Også beskrevet er
20 bindende midler som inkluderer et antigen-bindende fragment av et humanisert anti-CD40-antistoff. De humaniserte anti-CD40-antistoffene og bindende midlene kan arrestere veksten av celler, forårsake delesjonen av celler som uttrykker CD40-eller på annen måte induserer eller forårsaker en cytotoxisk eller cytostatisk effekt på målceller.
25 De humaniserte anti-CD40-antistoffene og bindende midlene kan bli benyttet i behandlingen av et utvalg av sykdommer eller lidelser karakterisert ved proliferasjonen av celler som uttrykker CD40-overflateantigenet.

Et humanisert anti-CD40-antistoff og et CD40-bindende middel inkluderer hver minst en
30 del som spesifikt gjenkjenner en CD40-epitop (dvs. et antigen-bindende fragment). I noen utførelsesformer inkluderer et humanisert anti-CD40-antistoff eller et CD40-bindende middel et antigen-bindende fragment som konkurrerer for binding med antistoff S2C6.

35 I noen utførelsesformer kan det antigen-bindende fragmentet for eksempel blokkere proliferasjon eller på annen måte arrestere vekten av en celle eller forårsake dens

- utarming, død eller på annen måte dens delesjon, for eksempel gjennom binding til CD40-overflateantigenet. I T- og B-cellemaligniteter resulterer for eksempel anti-tumoreffekter (for eksempel vekstarrestering med eller uten celledelesjon eller apoptose) ofte når maligne celler er eksponert for stimuli som fører til aktivering av normale
- 5 lymfocytter. Denne aktiverings-induserte vekstarresteringen har blitt observert med signaler gjennom enten antigenreseptorer eller kostimulatoriske reseptorer (se for eksempel Ashwell et al., 1987, *Science* 237:61; Bridges et al., 1987, *J. Immunol.* 139:4242; Page og Defranco, 1988, *J. Immunol.* 140:3717; og Beckwith et al., 1990, *J. Natl. Cancer Inst.* 82:501). CD40-stimulering, som et resultat av spesifikk binding ved
- 10 enten antistoff eller løselig ligand, inhiberer B-cellelymfomvekst (se for eksempel Funakoshi et al., 1994, *Blood* 83:2787-2794). Midler som inhiberer vekst av malign celle på denne måten og som er rettet mot CD40-overflateantigenet er eksempler på hensiktsmessige midler.
- 15 CD40-spesifikke midler inkluderer et antigen-bindende fragment av et humanisert anti-CD40-antistoff som binder til CD40-(for eksempel humant CD40-eller en variant derav). De CD40-spesifikke midlene og antistoffene kan eventuelt bli konjugert med eller fusjonert til et cytotoksisk eller kjemoterapeutisk middel. I aspekter hvor det humaniserte antistoffet binder til CD40-overflateantigenet og forårsaker utarming av de CD40-
- 20 uttrykkende celletypene, er binding generelt karakterisert ved hjemvending til CD40-overflateantigencellen *in vivo*. Egnede bindende midler binder CD40-antigenet med tilstrekkelig affinitet og/eller aviditet slik at det CD40-spesifikke midlet er nyttig som et terapeutisk middel ved og spesifikt målsøke en celle som uttrykker antigenet.
- 25 I et aspekt er midlet et humanisert antistoff inneholdende CDReNe av det murine monoklonale antistoffet S2C6. (S2C6 antistoffet er beskrevet ved for eksempel Paulie et al., 1984, *Cancer Immunol. Immunother.* 17:165-179.) S2C6 antistoffet har blitt vist til å utøve en agonistaktivitet på humane perifere B-celler som demonstrert ved antistoffets evne til å stimulere primær B-celleproliferasjon på en doseavhengig måte (se for
- 30 eksempel Paulie et al., 1989, *J. Immunol.* 142:590-595), så vel som anti-neoplastisk aktivitet *in vivo* (se for eksempel US Patent Nr. 6.838.261).
- I noen aspekter øker det humaniserte antistoffet bindingen av CD40-ligand til CD40 ved minst 45%, ved minst 50%, ved minst 60% eller ved minst 75%. En fremgangsmåte for å
- 35 bestemme økninger i binding av CD40-ligand til CD40 er beskrevet i US Patent Nr. 6.838.261.

I noen utførelsesformer omfatter de humaniserte anti-CD40-antistoffene, inkluderende antigen-bindende fragmenter derav, slik som tung og lett kjede variable domener, en aminosyresekvens av residuene derivert fra CDRene eller HVLe av det S2C6 murine antistoffet (se for eksempel US Patent Nr. 6.838.261) og aminosyreresiduer derivert fra rammeverksregioner av et humant immunoglobulin. I et aspekt er de humane rammeverksregion aminosyrene derivert fra humane konsensus-sekvenser for det tung kjede undergruppe III variable domenet og det kappa lett kjede variable domenet som beskrevet i US Patent Nr. 6.037.454. De humaniserte anti-CD40-antistoffene inkluderer spesifikke aminosyresubstitusjoner i konsensus-rammeverksregionene.

Den spesifikke substitusjonen av aminosyreresiduer i disse rammeverksposisjonene kan forbedre ulike aspekter av antistofftyeevne inkluderende bindingsaffinitet og/eller stabilitet, over det demonstrert i humaniserte antistoffer dannet ved "direkte bytting" av CDRer eller HVLe til de humane konsensus rammeverksregionene, som vist i eksemplene nedenfor.

I noen utførelsesformer omfatter de humaniserte anti-CD40-antistoffene beskrevet her minst et tung eller lett kjede variabelt domene omfattende CDRene eller HVLe av det murine monoklonale antistoffet S2C6 og Frene av de humane konsensus tung og lett kjede variable domene som har de spesifikke substitusjonene beskrevet i Tabell 5. En oppstilling av de variable tung kjede aminosyresekvensene som har substitusjoner og variable lett kjede aminosyresekvensene som har substitusjoner er vist i Tabellene 3 og 4, henholdsvis. Disse sekvensene inkluderer et tung kjede variabelt domene som har aminosyresekvensen av SEQ ID NO:3 og et lett kjede variabelt domene som har aminosyresekvensen av SEQ ID NO:14.

I enkelte utførelsesformer er det humaniserte anti-CD40-antistoffet et antistoff-fragment. Forskjellige teknikker har blitt utviklet for produksjonen av antistoff-fragmenter. Fragmenter kan bli derivert via proteolytisk fordøying av intakte antistoffer (se for eksempel Morimoto et al., 1992, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117; og Brennan et al., 1985, *Science* 229:81). Alternativt kan fragmentene bli produsert direkte i rekombinante vertsceller. For eksempel kan Fab'-SH fragmentene bli direkte utvunnet fra *E. coli* og kjemisk koblet for å danne F(ab')₂ fragmenter (se for eksempel Carter et al., 1992, *Bio/Technology* 10:163-167). Ved en annen fremgangsmåte

kan F(ab')₂ fragmenter bli isolert direkte fra rekombinant vertscellekultur. Andre teknikker for produksjonen av antistoff-fragmenter vil være tydelig for fagpersonen.

Enkelte utførelsesformer inkluderer et F(ab')₂ fragment av et humanisert anti-CD40-antistoff omfattende en tung kjede variabelt domene aminosyresekvens og en lett kjede variabelt domene aminosyresekvens av henholdsvis; SEQ ID NO:10 og SEQ ID NO:16, Slike utførelsesformer kan inkludere et intakt antistoff omfattende en slik F(ab')₂.

I noen utførelsesformer inkluderer antistoffet eller antistoff-fragmentet en konstant region som medierer effektorfunksjon. Den konstante regionen kan tilveiebringe antistoff-avhengig cellulær cytotoxiskitet (ADCC), antistoff-avhengig cellulær fagocytose (ADCP) og/eller komplement-avhengig cytotoksiske (CDC) responser mot en CD40-uttrykkende målcelle. Effektordomenet(ene) kan være, for eksempel, være en Fc-region av et Ig molekyl. Vanligvis rekrutterer og/eller aktiverer det CD40-bindende midlet cytotoksiske hvite blodceller (for eksempel naturlige dreper (NK) celler, fagocytotiske celler (for eksempel makrofager), og/eller serumkomplementkomponenter).

Effektordomenet av et antistoff kan være fra enhver egnet vertebrat dyreart og isotyper. Isotypene fra forskjellige dyrearter er forskjellige i evnene til å mediere effektorfunksjoner. For eksempel er evnen av humant immunoglobulin til å mediere CDC og ADCC/ADCP generelt i rekkefølgen av henholdsvis IgM≈IgG₁>IgG₃>IgG₂>IgG₄ og IgG₁≈IgG₃>IgG₂/IgM/IgG₄. Murine immunoglobuliner medierer CDC og ADCC/ADCP generelt i rekkefølgen av henholdsvis murine IgM≈IgG₃>>IgG_{2b}>IgG_{2a}>>IgG₁ og IgG_{2b}>IgG_{2a}>IgG₁>>IgG₃. I et annet eksempel medierer murin IgG_{2a} ADCC mens både murin IgG_{2a} og IgM medierer CDC.

Antistoffmodifikasjoner

De humaniserte anti-CD40-antistoffene og midlene kan inkludere modifikasjoner av det humaniserte anti-CD40-antistoffet eller antigen-bindende fragmentet derav. For eksempel kan det være ønskelig å modifisere antistoffet med hensyn på effektorfunksjonen, slik som for å forsterke effektiviteten av antistoffet i behandling av for eksempel cancer. En slik modifikasjon er introduksjonen av cysteinresiduet(r) i Fc-regionen, som derved tillater interkjededisulfidbindingsdannelse i denne regionen. Det homodimere antistoffet generert på denne måten kan ha forbedret internaliseringsevne og/eller økt komplementmediert celledreping og/eller antistoff-avhengig cellulær cytotoxiskitet (ADCC). Se for

eksempel Caron et al., 1992, *J. Exp Med.* 176:1191-1195; og Shopes, 1992, *J. Immunol.* 148:2918-2922. Homodimere antistoffer som har forsterket anti-tumoraktivitet kan også bli fremstilt ved å benytte heterobifunksjonelle kryss-forbindere som beskrevet i Wolff et al., 1993, *Cancer Research* 53: 2560-2565. Alternativt kan et antistoff bli konstruert til å
 5 inneholde doble Fc-regioner, som forsterker komplementlysis og ADCC-muligheter av antistoffet. Se Stevenson et al., 1989, *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230.

Antistoffer med forbedret evne til å støtte ADCC har blitt generert ved å modifisere glykosyleringsmønsteret av deres Fc-region. Dette er mulig siden antistoff-glykosylering
 10 ved asparaginresiduen, N297, i C_H2-domenet er involvert i interaksjonen mellom IgG og Fcγ reseptorer nødvendig for ADCC. Vertscellelinjer som har blitt konstruert til å uttrykke antistoffer med endret glykosylering, slik som økt halverende N-acetylglukosamin eller redusert fukose. Fukosereduksjon tilveiebringer større forsterkning til ADCC-aktivitet enn å øke nærværet av halverende N-acetylglukosamin. Videre er forsterkning
 15 av ADCC ved lave fukoseantistoffer uavhengig av FcγRIIIa V/F polymorfismen.

Modifisering av aminosyresekvensen av Fc-regionen av antistoffer er et alternativ til å manipulere glykosylering for å forsterke ADCC. Bindingssetet på humant IgG₁ for Fcγ reseptorer har blitt bestemt ved utstrakt mutasjonsmessig analyse. Dette førte til
 20 genereringen av humaniserte IgG₁ antistoffer med Fc mutasjoner som øker bindingsaffiniteten for FcγRIIIa og forsterker ADCC *in vitro*. I tillegg har Fc-varianter blitt oppnådd med mange forskjellige permutasjoner av bindingsegenskaper, for eksempel forbedret binding til spesifikke FcγR-reseptorer med uendret eller forminsket binding til andre FcγR-reseptorer.

25 I noen utførelsesformer kan Fc-regionen bli modifisert som beskrevet i US Patent søknader publikasjon nr. 2006-0003412 og 2006-0008883.

Et annet aspekt inkluderer immunokonjugater omfattende det humaniserte antistoffet eller fragmentene derav konjugert til et cytotoxisk middel slik som et kjemoterapeutisk
 30 middel, et toksin (for eksempel et enzymatisk aktivt toksin av bakteriell, fungal, plante eller dyreopprinnelse, eller fragmenter derav), eller en radioaktiv isotop (dvs. et radiokonjugat).

Kjemoterapeutiske midler nyttige i genereringen av slike immunokonjugater har blitt
 35 beskrevet ovenfor. Enzymatisk aktive toksiner og fragmenter derav som kan bli benyttet for å danne nyttige immunokonjugater inkluderer difteria A kjede, ikke-bindende aktive

fragmenter av difteria toksin, eksotoksin A kjede (fra *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A kjede, abrin A kjede, modeccin A kjede, alfa-sarkin, Aleurites fordii proteiner, diantin proteiner, *Phytolaca americana* proteiner (PAPI, PAPII, og PAP-S), *Momordica charantia* inhibitor, curcin, crotin, *Sapaonaria officinalis* inhibitor, gelonin, mitogellin, restriktocin, fenomycin, enomycin, trikotecenene og lignende. Et utvalg av radionuklider er tilgjengelige for produksjonen av radiokonjugerte humaniserte anti-CD40-antistoffer. Eksempler inkluderer ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y og ^{186}Re .

Konjugater av det humaniserte anti-CD40-antistoffet og cytotoksisk eller kjemoterapeutisk middel kan bli laget ved kjente fremgangsmåter, ved å benytte et utvalg av bifunksjonelle proteinkoblingsmidler slik som N-succinimidyl-3-(2-pyridylditiol) propionat (SPDP), iminotiolan (IT), bifunksjonelle derivater av imidoestere (slik som dimetyladipimidat HCL), aktive estere (slik som disuccinimidylsuberat), aldehyder (slik som glutaraldehyd), bis-azidoforbindelser (slik som bis (p-azidobenzoyl) heksandiamin), bis-diazoniumderivater (slik som bis-(p-diazoniumbenzoyl)-etylendiamin), diisocyanater (slik som toluen 2,6-diisocyanat), og bis-aktive fluorforbindelser (slik som 1,5-difluor-2,4-dinitrobenzen). For eksempel kan et ricinimmunotoksin bli preparert som beskrevet i Vitetta et al., 1987, *Science* 238:1098. Karbon-14-merket 1-isotiocyanatobenzyl-3-metyldietylenetriaminpentaeddiksyre (MX-DTPA) er et eksemplarisk chelatiserende middel for konjugering av radionukleotid til antistoffet. Se for eksempel Internasjonal Pulikasjon WO 94/11026. Konjugater kan også bli formet med en kløyvbar linker, slik som den beskrevet i publisert EP Patentsøknad 0 624 377.

I en utførelsesform kan antistoffet bli konjugert til en "reseptor" (slik som streptavidin) for utnyttelse i tumorpenetrering. I denne prosedyren er antistoff-reseptorkonjugatet administrert til en pasient, etterfulgt ved fjerning av ubundet konjugat fra sirkulasjonen ved å benytte et fjernende middel og så administrasjon av en "ligand" som selektivt binder reseptoren (for eksempel avidin), hvor liganden er konjugert til et cytotoksisk middel (for eksempel et radionuklid).

De humaniserte anti-CD40-antistoffer beskrevet her kan også bli formulert som immunoliposomer. Liposomer inneholdende antistoffet er preparert ved fremgangsmåter kjent i fagfeltet, slik som beskrevet i Epstein et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688; Hwang et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4030; og US Patenter Nr. 4.485.045 og 4.544.545. Liposomer som har forsterket sirkulasjonstid er for eksempel angitt i US Patent Nr. 5.013.556.

- Spesielt nyttige liposomer kan bli generert ved revers fasefordampingsmetoden med en lipidsammensetning omfattende fosfatidylkolin, kolesterol og PEG-derivatisert fosfatidyletanolamin (PEG-PE). Liposomer er ekstrudert gjennom filtre av definert pore størrelse for å gi liposomer med den ønskede diameteren. Fab' fragmenter av et antistoff
- 5 beskrevet her kan bli konjugert til liposomene som beskrevet i Martin et al., 1982, *J. Biol. Chem.* 257:286-288 via en disulfidutvekslingsreaksjon. Et kjemoterapeutisk middel (slik som doksorubicin) er eventuelt holdt i liposomet. Se for eksempel Gabizon et al., 1989, *J. National Cancer Inst.* 81(19):1484.
- 10 Antistoffene beskrevet og angitt her kan også bli benyttet i ADEPT (Antistoff-rettet Enzym Promedikament Terapi) prosedyrer ved konjugering av antistoffet til et promedikament-aktiverende enzym som omdanner et promedikament (for eksempel et peptidyl kjemoterapeutisk middel), til et aktivt anti-cancermedikament. Se for eksempel WO 81/01145, WO 88/07378, og US Patent Nr. 4,975,278. Enzymkomponenten av
- 15 immunokonjugatet nyttig for ADEPT er et enzym i stand til å virke på et promedikament på en slik måte til å omdanne det til sin mer aktive, cytoksiske form. Spesifikke enzymer som er nyttige i ADEPT inkluderer, men er ikke begrenset til, alkalisk fosfatase for omdanning av fosfatinneholdende promedikamenter til frie medikamenter; arylsulfatase for omdanning av sulfatinneholdende promedikamenter til frie medikamenter; cytosin
- 20 deaminase for omdanning av ikke-toksisk 5-fluorcytosin til anti-cancermedikamentet, 5-fluoruracil; proteaser slik som serratiaprotease, termolysin, subtilisin, karboksypeptidaser og katepsiner (slik som katepsiner B og L), for omdanning av peptidinneholdende pro-medikamenter til frie medikamenter; D-alanylkarboksypeptidaser, for omdanning av promedikamenter inneholdende D-aminosyresubstitusjoner; karbohydrat-kløyvende
- 25 enzymer slik som β -galaktosidase og neuraminidase for omdanning av glykosylerte promedikamenter til frie medikamenter; β -laktamase for omdanning av medikamenter derivatisert med β -laktamer til frie medikamenter; og penicillinamidaser, slik som penicillin V amidase eller penicillin G amidase, for omdanning av medikamenter derivatisert ved deres aminnitrogener med henholdsvis fenoksyacetyl eller fenylacetyl
- 30 grupper, til frie medikamenter. Alternativt kan antistoffer som har enzymatisk aktivitet ("abzymer") bli benyttet for å omdanne promedikamentene til deres frie medikamenter (se for eksempel Massey, 1987, *Nature* 328: 457-458). Antistoff-abzymkonjugater kan bli preparert ved kjente fremgangsmåter for levering av abzymet til en tumorcellepopulasjon, for eksempel ved kovalent binding av enzymet til de humaniserte anti-CD40-
- 35 antistoff/heterobifunksjonelle kryssforbindende reagensene diskutert ovenfor. Alternativt kan fusjonproteiner omfattende minst den antigen-bindende regionen av et antistoff

beskrevet her forbundet til minst en funksjonell aktiv del av et enzym som beskrevet ovenfor bli konstruert ved å benytte rekombinante DNA-teknikker (se for eksempel Neuberger et al., 1984, *Nature* 312:604-608).

- 5 I enkelte utførelsesformer kan det være ønskelig å benytte et humanisert anti-CD40-antistoff-fragment, i stedet for et intakt antistoff, for å for eksempel øke tumorpener-
trering. Det kan være ønskelig å modifisere antistoff-fragmentet for å øke dets serum
halveringstid. Dette kan for eksempel bli oppnådd ved inkorporering av en bergings
reseptor bindende epitop til antistoff-fragmentet. I en fremgangsmåte kan for eksempel
10 den hensiktsmessige regionen av antistoff-fragmentet bli endret (for eksempel mutert),
eller epitopen kan bli inkorporert i en peptidveving som så er fusjonert til antistoff-
fragmentet i hver ende eller i midten, ved DNA eller peptidsyntese. Se for eksempel WO
96/32478.
- 15 I andre utførelsesformer er kovalente modifikasjoner av det humaniserte anti-CD40-
antistoffet også inkludert. De kan bli laget ved kjemisk syntese eller ved enzymatisk eller
kjemisk kløyving av antistoffet, om egnet. Andre typer av kovalente modifikasjoner av
antistoffet kan bli introdusert inn i molekylet ved å reagere de målrettede amino-
syreresiduenes av antistoffet med et organisk derivatiserende middel som er i stand til å
20 reagere med valgte sidekjerder eller de amino- eller karboksy-terminale residuenes.

Kovalente modifikasjoner inkluderer modifikasjon av cysteinyleriduer, histidylresiduer,
lysinyler og amino-terminale residuer, arginyleriduer, tyrosylresiduer, karboksylside-
grupper (aspartyl eller glutamyl), glutaminyler og asparaginyleriduer, eller seryl eller
25 treonyleriduer. En annen type av kovalent modifikasjon involverer kjemisk eller
enzymatisk kobling av glykosider til antistoffet.

Fjerning av enhver karbohydrathalvdel tilstede på antistoffet kan bli utført kjemisk eller
enzymatisk. Kjemisk deglykosylering er beskrevet ved Hakimuddin et al., 1987, *Arch.*
30 *Biochem. Biophys.* 259:52 og ved Edge et al., 1981, *Anal. Biochem.*, 118:131.
Enzymatisk kløyving av karbohydrathalvdeler på antistoffer kan bli oppnådd ved
anvendelsen av et utvalgt av endo- og ekso-glykosidaser som beskrevet ved Thotakura et
al., 1987, *Meth. Enzymol.* 138:350.

- 35 En annen type av nyttige kovalent modifikasjon omfatter forbindelse av antistoff til en av
et utvalg av ikke-proteinøse polymerer, for eksempel, polyetylenglykol, polypropylen-

glykol eller polyoksyalkylener, på en måte presentert i en eller flere av US Patent Nr. 4.640.835, US Patent Nr. 4.496.689, US Patent Nr. 4.301.144, US Patent Nr. 4.670.417, US Patent Nr. 4.791.192 og US Patent Nr. 4.179.337.

5 ***Humanisering og Aminosyresekvensvarianter***

Eksempel 1 nedenfor beskriver prosedyrer for humanisering av et anti-CD40-antistoff, mens Eksempel 2 beskriver varianter. I enkelte utførelsesformer kan det være ønskelig å generere aminosyresekvensvarianter av disse humaniserte antistoffene, spesielt hvor disse forbedrer bindingsaffiniteten eller andre biologiske egenskaper av det humaniserte antistoffet.

Aminosyresekvensvarianter av anti-CD40-antistoffet kan bli fremstilt ved å introdusere hensiktsmessige nukleotidendringer i anti-CD40-antistoff DNAet, eller ved peptid-syntese. Slike varianter inkluderer, for eksempel, delelsjoner fra, og/eller innsetninger i og/eller substitusjoner av, residuer i aminosyresekvensene av anti-CD40-antistoffene av eksemplene her. Enhver kombinasjon av delelsjoner, innsetninger og substitusjoner er gjort for å nå den endelige konstruksjonen, tilveiebrakt at den endelige konstruksjonen har de ønskede egenskapene. Aminosyreendringene kan også endre post-translasjonelle prosesser av det humaniserte anti-DC40-antistoffet eller antistoffvarianten, slik som endring av antallet eller posisjonen av glykosylerings seter.

En nyttig fremgangsmåte for identifisering av enkelte residuer eller regioner av anti-CD40-antistoffet som er foretrukne lokaliseringer for mutagenese er kalt "alanin skanning mutagenese," som beskrevet ved Cunningham og Wells (*Science*, 244:1081-1085 (1989)). Her er en residue eller gruppe av målresiduer identifisert (for eksempel ladede residuer slik som arg, asp, his, lys, og glu) og erstattet ved en nøytral eller negativt ladede aminosyre (vanligvis alanin) for å påvirke interaksjonen av aminosyrene med CD40-antigen. De aminosyrelokaliseringene som demonstrerer funksjonell sensitivitet til substitusjonene er så raffinert ved å introdusere ytterligere eller andre varianter ved, eller for, setene av substitusjon. Mens setet for å introdusere en aminosyresekvensvariasjon er bestemt på forhånd, trenger derfor ikke naturen av mutasjonen i seg selv å bli bestemt på forhånd. For eksempel å analysere yteevnen til en mutasjon ved et gitt sete, er alanin skanning eller tilfeldig mutagenese utført ved målkodonet eller regionen og de uttrykte anti-CD40-antistoffvariantene er screenet for den ønskede aktiviteten.

Aminosyresekvensinnsettinger inkluderer amino- og/eller karboksyl-terminale fusjoner varierende i lengde fra en residue til polypeptider inneholdende hundrevis eller flere residuer, så vel som intrasekvensinnsettinger av enkle eller multiple aminosyreresiduer. Eksempler på terminale innsettinger inkluderer et anti-CD40-antistoff fusjonert til et epitopmerke. Andre innsettingsvarianter av anti-CD40-antistoffmolekylet inkluderer en fusjon ved den N- eller C-terminale enden av anti-CD40-antistoffet av et enzym eller et polypeptid som øker serumhalveringstiden av antistoffet.

En annen type av variant er en aminosyresubstitusjonsvariant. Disse varianter har minst en aminosyreresidue i anti-CD40-antistoffmolekylet fjernet og en forskjellig residue satt inn for dens plass. Setene av størst interesse for substitusjonsmessig mutagenese inkluderer de hypervariable regionene, men FR-endringer er også betraktet. Konservative substitusjoner er vist i Tabell 1 under overskriften av "foretrukne substitusjoner". Om slike substitusjoner resulterer i en endring i biologisk aktivitet, kan så flere vesentlige endringer, betegnet "eksemplariske substitusjoner", eller som ytterligere beskrevet nedenfor i referanse til aminosyreklasser, bli introdusert og produktene screenet.

TABELL 1

Opprinnelig residue	Eksemplariske Substitusjoner	Foretrukne Substitusjoner
Ala (A)	val; leu; ile	Val
Arg (R)	lys; gln; asn	Lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; Arg	Gln
Asp (D)	glu; asn	Glu
Cys (C)	ser; ala	Ser
Gln (Q)	asn; glu	Asn
Glu (E)	asp; gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	Arg
Ile (I)	leu; val; met; ala;	Leu

	phe; norleucin	
Leu (L)	Norleucin; ile; val;	ile
	met; ala; phe	
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	Ala	ala
Ser (S)	Thr	thr
Thr (T)	Ser	ser
Trp (W)	Tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	Trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	Ile; leu; met; phe;	leu
	Ala; norleucin	

Vesentlige modifikasjoner i de biologiske egenskapene av antistoffet er utført ved å selekttere substitusjoner som er signifikant forskjellig i deres effekt på å opprettholde (a) strukturen av polypeptidryggraden i området av substitusjonen, for eksempel, som en

5 ark- eller spiralkonformasjon, (b) ladningen eller hydrofobisiteten av molekylet ved målsetet, eller (c) hovedmengden av sidekjeden. Naturlig forekommende residuer er delt inn i grupper basert på felles side-kjedeegenskaper:

- (1) hydrofobe: norleucin, met, ala, val, leu, ile;
- 10 • (2) nøytrale hydrofile: cys, ser, thr;
- (3) sure: asp, glu;
- (4) basiske: asn, gin, his, lys, arg;
- (5) residuer som påvirker kjedeorientering: gly, pro; og
- (6) aromatiske: trp, tyr, phe.

15 Ikke-konservative substitusjoner vil medføre utveksling av et medlem av en av disse klassene med en annen klasse.

Enhver cysteinresidue ikke involvert i å opprettholde den korrekte konformasjonen av det humaniserte anti-CD40-antistoffet eller anti-CD40-antistoffvarianten kan også bli substituert, generelt med serin, for å forbedre den oksidative stabiliteten til molekylet, forebygge avvikende kryssforbinding, eller tilveiebringe etablerte punkter av konjugering
 5 til en cytotoxisk eller cytostatisk forbindelse.

Omvent kan cysteinbinding(er) bli tilføyd til antistoffet for å forbedre dets stabilitet (spesielt hvor antistoffet er et antistoff-fragment slik som et Fv fragment).

10 En type av substitusjonsmessig variant involverer å substituere en eller flere hypervariable regionresiduer av et moderantistoff (for eksempel et humanisert eller humant antistoff). Generelt vil den/de resulterende varianten(e) valgt for ytterligere utvikling ha forbedrede biologiske egenskaper relativt til moderantistoffet hvorfra de er generert. En bekvemmelig måte å generere slike substitusjonsmessige varianter er
 15 affinitetsmodning ved å benytte fagfremvisning. I korthet er flere hypervariable region-seter (for eksempel 6-7 seter) mutert for å generere alle mulige aminosubstitusjoner ved hvert sete. Antistoffvariantene generert på denne måten er fremvist på en monovalent måte fra filamentøse fagpartikler som fusjoner til gen III produktet av M13 pakket i hver partikkel. De fag-fremviste variantene er så screenet for deres biologiske aktivitet (for
 20 eksempel bindingsaffinitet). For å identifisere kandidatseter av hypervariable region for modifikasjon, kan alanin skanningsmutagenese bli utført for å identifisere residuer av hypervariable region som bidrar signifikant til antigenbinding. Alternativt, eller i tillegg, kan det fordelaktig å analysere en krystallstruktur av antigen-antistoffkomplekset for å identifisere kontaktpunkter mellom antistoffet og human CD40. Slike kontaktresiduer og
 25 naboresiduer er kandidater for substitusjon i henhold til teknikkene utarbeidet her. Med en gang slike varianter er generert, er panelet av varianter utsatt for screening som beskrevet her og antistoffer med overlegne egenskaper i en eller flere relevante tester kan bli valgt for ytterligere utvikling.

30 En annen type av aminosyrevariant av antistoffet endrer det opprinnelige glykosyleringsmønsteret av antistoffet. Ved "endring" menes det å deletere en eller flere karbohydrat halvdelar funnet i antistoffet, og/eller tilføyning av et eller flere glykosyleringsseter som ikke er tilstede i antistoffet.

35 Glykosylering av antistoffer er vanligvis enten N-forbundet eller O-forbundet. N-forbundet refererer til festingen av karbohydrathalvdelen til sidekjeden av en asparagin

residue. Tripeptidsekvensene asparagin-X-serin og asparagin-X-treonin, hvor X er enhver aminosyre med unntak av prolin, er gjenkjenningssekvensene for enzymatisk festing av karbohydrathalvdelen til asparaginsidekjeden. Nærværet av enhver av disse tripeptid sekvensene i et polypeptid skaper derfor et potensielt glykosyleringssete. O-forbundet
 5 glykosylering refererer til festingen av et av sukrene N-aceylgalaktosamin, galaktose eller xylose til en hydroksyaminosyre, mest alminnelig serin eller treonin, selv om 5-hydroksyprolin eller 5-hydroksylysin også kan bli benyttet.

Tilføyning av glykosyleringsseter til antistoffet er bekvemmelig utført ved å endre
 10 aminosyresekvensen slik at den inneholder en eller flere av de ovenfor beskrevne tripeptidsekvensene (for N-forbundede glykosyleringsseter). Endringen kan også bli gjort ved tilføyningen av, eller substitusjonen ved, en eller flere serin- eller treoninresiduer til sekvensen av det opprinnelige antistoffet (for O-forbundede glykosyleringsseter).

15 Nukleinsyremolekyler som koder for aminosyresekvensvarianter av anti-CD40-antistoffet er preparert ved et utvalg av fremgangsmåter kjente i fagfeltet. Disse fremgangsmåtene inkluderer, men er ikke begrenset til, isolering fra en naturlig kilde (i tilfellet av naturlig forekommende aminosyresekvensvarianter) eller preparering ved oligonukleotid-mediert (eller sete-rettet) mutagenese, PCR-mutagenese og kassettmutagenese av en tidligere
 20 preparert variant eller en ikke-variant verssjon av anti-CD40-antistoffet.

Humane antistoffer

Som et alternativ til humanisering, kan humane antistoffer bli generert. For eksempel kan
 25 transgene dyr (for eksempel mus) bli benyttet som er i stand til å produsere et fullt repertoire av humane antistoffer i fraværet av endogen immunoglobulinproduksjon ved immunisering. For eksempel har det blitt beskrevet at den homozygote delesjonen av antistoff tung-kjede sammenføyende region (J_H) genet i kimere og kimbane mutante mus resulterer i fullstendig inhibering av endogen antistoffproduksjon. Overføring av den
 30 humane kimbane immunoglobulingenoppstillingen i slike kimbane mutante mus vil resultere i produksjonen av humane antistoffer ved antigenutfordring. Som et alternativ til humanisering, kan humane antistoffer bli generert. For eksempel kan transgene dyr (*for eksempel* mus) bli benyttet som er i stand til å produsere et fullt repertoire av humane antistoffer i fraværet av endogen immunoglobulinproduksjon med immunisering. For
 35 eksempel har det blitt beskrevet at den homozygote delesjonen av antistoff tung-kjede sammenføyende region (J_H) genet i kimere og kimbane mutant mus resulterer i

fullstendig inhibering av of endogen antistoffproduksjon. Overføring av den humane kimbane immunoglobulingenoppstillingen i slike kimbane mutante mus vil resultere i produksjonen av humane antistoffer ved antigenutfordring. Se for eksempel Jakobovits et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551; Jakobovits et al., 1993, *Nature* 362:255-258; Bruggermann et al., 1993, *Year in Immuno.* 7:33; og US Patenter Nr. 5.591.669; 5.589.369; 5.545.807; 6.075.181; 6.150.584; 6.657.103 og 6.713.610.

Alternativt kan fagfremvisningsteknologi (se for eksempel McCafferty et al., 1990, *Nature* 348:552-553) bli benyttet for å produsere humane antistoffer og antistoff-fragmenter *in vitro*, fra immunoglobulin variabelt (V) domene genrepertoarene fra ikke-immuniserte donorer. I henhold til denne teknikken er antistoff V domenegener klonet i-lese ramme til enten et større eller mindre katteproteingen av en filamentøs bakteriofag, slik som M13 eller fd, og fremvist som funksjonelle antistoff-fragmenter på overflaten av fagpartikkelen. Fordi den filamentøse partikkelen inneholder en enkel-trådet DNA-kopi av faggenomet, resulterer seleksjoner basert på de funksjonelle egenskapene av antistoffet også i seleksjon av genet som koder for antistoffet som viser disse egenskapene. Faget etterligner derfor noen av egenskapene av B-cellen. Fagfremvisning kan bli utført på et utvalg av formater; for deres gjennomgåelse se for eksempel, Johnson og Chiswell, 1993, *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571. Flere kilder av V-gensegmenter kan bli benyttet for fagfremvisning. Clackson et al., 1991, *Nature* 352:624-628 isolerte en mangfoldig oppstilling av anti-oksazolantistoffer fra et lite tilfeldig kombinasjonsmessig bibliotek av V gener derivert fra miltene av immuniserte mus. Et repertoire av V gener fra ikke-immuniserte humane donorer kan bli konstruert og antistoffer til en mangfoldig oppstilling av antigener (inkluderende selv-antigener) kan bli isolert hovedsakelig ved å følge teknikkene beskrevet ved Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581-597, eller Griffith et al., 1993, *EMBO J.* 12:725-734. Se også US Patenter Nr. 5.565.332 og 5.573.905. Som diskutert ovenfor, kan humane antistoffer også bli generert ved *in vitro* aktiverte B-celler (se US Patenter Nr. 5.567.610 og 5.229.275).

Polynukleotider, vektorer, vertsceller og rekombinante fremgangsmåter

Andre utførelsesformer omfatter isolerte polynukleotider som omfatter en sekvens som koder for et humanisert anti-CD40-antistoff, vektorer og vertsceller omfattende polynukleotidene, og rekombinante teknikker for produksjon av det humaniserte antistoffet. De isolerte polynukleotidene kan kode for enhver ønsket form av anti-CD40-antistoffet inkluderende, for eksempel, fullengde monoklonale antistoffer, Fab, Fab',

F(ab')₂, og Fv fragmenter, diabodier, lineære antistoffer, enkel-kjede antistoffmolekyler, og multispesifikke antistoffer dannet fra antistoff-fragmenter.

domeneI et aspekt koder den/de isolerte polynukleotidsekvensen(e) for et tung kjede
 5 variabelt domene aminosyresekvens og et lett kjede variabelt domene aminosyresekvens
 av henholdsvis SEQ ID NO:10 og SEQ ID NO:16.

Polynukleotidet/polynukleotidene som omfatter en sekvens kodende for et humanisert
 10 anti-CD40-antistoff eller et fragment eller et kjede derav kan bli fusjonert til en eller flere
 regulatoriske eller kontrollsekvenser, som kjent i fagfeltet, og kan holdes i egnede
 ekspresjonsvektorer eller vertscelle som kjent i fagfeltet. Hvert av polynukleotid
 molekylene kodende for de tung eller lett kjede variable domenene kan uavhengig bli
 fusjonert til en polynukleotidsekvens kodende for et konstant domene, slik som et humant
 15 konstant domene, som muliggjør produksjonen av intakte antistoffer. Alternativt kan
 polynukleotider eller deler derav, bli fusjonert sammen, som tilveiebringer et templat for
 produksjon av et enkel-kjedeantistoff.

For rekombinant produksjon er et polynukleotid som koder for antistoffet satt inn i en
 20 replikerbar vektor for kloning (amplifisering av DNAet) eller for ekspresjon. Mange
 egnede vektorer for å uttrykke det rekombinante antistoffet er tilgjengelig. Vektor-
 komponentene inkluderer generelt, men er ikke begrenset til, en eller flere av det
 følgende: en signalsekvens, et startsted for replikasjon, et eller flere markørgener, et
 enhancerelement, en promoter og en transkripsjonstermineringssekvens.

25 De humaniserte anti-CD40-antistoffene kan også bli produsert som fusjonspolypeptider,
 hvor antistoffet er fusjonert til et heterologt polypeptid, slik som en signalsekvens eller
 annet polypeptid som har et spesifikt kløyvingssete ved amino-enden av det modne
 proteinet eller polypeptidet. Den heterologe signalsekvensen valgt, er vanligvis en som er
 30 gjenkjent og prosessert (dvs. kløyyet ved en signalpeptidase) av vertscellen. For
 prokaryote vertsceller som ikke gjenkjenner og prosesserer den humaniserte anti-CD40-
 antistoffsignalsekvensen, kan signalsekvensen bli byttet ut med en prokaryot signal
 sekvens. Signalsekvensen kan for eksempel være alkalisk fosfatase, penicillinase,
 lipoprotein, varme-stabile enterotoksin II ledere og lignende. For gjærsekresjon kan den
 35 native signalsekvensen bli byttet ut med for eksempel en ledersekvens oppnådd fra gjær
 invertase alfa-faktor (inkluderende *Saccharomyces* og *Kluyveromyces* α-faktorledere), sur

fosatase, *C. albicans* glukamylase, eller signalet beskrevet i WO90/13646. I mammalske celler kan mammalske signalsekvenser så vel som virale sekretoriske ledere, for eksempel, herpes simplex gD signalet, bli benyttet. DNAet for slik forløperregion er ligert i leseramme med DNA som koder for det humaniserte anti-CD40-antistoffet.

5

Ekspresjon og kloningsvektorer inneholder en nukleinsyresekvens som muliggjør vektoren og replikere i en eller flere valgte vertsceller. Generelt i kloningsvektorer er denne sekvensen en som muliggjør vektoren å replikere uavhengig av vertens kromosomale DNA, og inkluderer startsteder for replikasjon eller autonomt replikerende sekvenser. Slike sekvenser er godt kjent for et utvalg av bakterier, gjær og virus.

10

Startstedet for replikasjon fra plasmidet pBR322 er egnet for de fleste Gram-negative bakterier, 2 μ plasmidstartstedet er egnet for gjær, og ulike virale startsteder (SV40, polyoma, adenovirus, VSV og BPV) er nyttige for kloningsvektorer i mammalske celler. Generelt er startstedet for replikasjonskomponenten ikke nødvendig for mammalske ekspresjonsvektorer (SV40 startstedet kan vanligvis bli benyttet bare fordi det inneholder den tidligere promoteren).

15

Ekspresjons- og kloningsvektorer kan inneholde et seleksjonsgen, også kalt en selekterbar markør. Typiske seleksjonsgener koder for proteiner som (a) overdrar resistens for antibiotika eller andre toksiner, for eksempel, ampicillin, neomycin, metotreksat eller tetracyklin, (b) komplementerer auksotrofe mangler, eller (c) supplerer kritiske næringsstoffer ikke tilgjengelig fra komplekse medier, for eksempel genet som koder for D-alaninracemase for *Bacilli*.

20

Et eksempel på et seleksjonsskjema benytter et medikament for å arrestere vekst av en vertscelle. De cellene som er vellykket transformert med et heterologt gen produserer et protein som overdrar medikamentresistens og overlever på denne måten seleksjonskuren. Eksempler på slik dominant seleksjon anvender medikamentene neomycin, mykofenol syre og hygromycin.

25

30

Et annet eksempel på egnede selekterbare markører for mammalske celler er dem som muliggjør identifisering av celler kompetente til å ta opp en nukleinsyre som koder for et humanisert anti-CD40-antistoff, slik som DHFR (dihydrofolatreduktase), tymidin kinase, metallotienin-I og -II (slik som primate metallotieningener), adenosindeaminase, ornitindekarboksylase og lignende.

35

Celler transformert med DHFR seleksjonsgenet er for eksempel identifisert ved dyrking av alle transformantene i et dyrkingsmedium som inneholder metotreksat (Mtx), en kompetitiv antagonist av DHFR. En hensiktsmessig vertscelle når vill-type DHFR er benyttet, er den kinesiske hamster ovarie (CHO) cellelinje som mangler DHFR aktivitet (for eksempel DG44).

Alternativt kan vertsceller (spesielt vill-type verter som inneholder endogent DHFR) transformert eller ko-transformert med DNA-sekvenser kodende for anti-CD40-antistoff, vill-type DHFR-protein, og en annen selekterbar markør slik som aminoglykosid 3'-fosfotransferase (APH), bli selektert ved cellevekst i medium inneholdende et seleksjonsmiddel for den selekterbare markøren slik som et aminoglykosidantibiotika, for eksempel, kanamycin, neomycin eller G418. Se for eksempel US Patent Nr. 4.965.199.

Et egnet seleksjonsgen for anvendelse i gjær er *TRP1*-genet tilstede i gjærplasmidet YRp7 (Stinchcomb et al., 1979, *Nature* 282: 39). *TRP1*-genet tilveiebringer en seleksjons markør for en mutant stamme av gjær som mangler evnen til å vokse i tryptofan, for eksempel, ATCC Nr. 44076 eller PEP4-1 (Jens, 1977, *Genetics* 85:12). Nærværet av *trp1*-skaden i gjærvertscellegenomet tilveiebringer så en effektiv omgivelse for å detektere transformasjon ved vekst i fraværet av tryptofan. På lignende måte er Leu2p-manglende gjærstammer slike som ATCC 20.622 og 38.626 komplementert ved kjente plasmider som bærer *LEU2*-genet.

Vektorer derivert fra det 1,6 µm sirkulære plasmidet pKD1 kan i tillegg bli benyttet for transformasjon av *Kluyveromyces* gjær. Alternativt ble et ekspresjonssystem for produksjon i stor skala av rekombinant kalvechymosin rapportert ved *K. lactis* (Van den Berg, 1990, *Bio/Technology* 8:135). Stabile multi-kopiekspresjonsvektorer for sekresjon av modent rekombinant humant serumalbumin ved industrielle stammer av *Kluyveromyces* har også blitt angitt (Fleer et al., 1991, *Bio/Technology* 9:968-975).

Ekspresjons- og kloningsvektorer inneholder vanligvis en promoter som er gjenkjent ved vertsorganismen og er funksjonelt forbundet til nukleinsyremolekylet kodende for et anti-CD40-antistoff eller en polypeptidkjede derav. Promotere egnet for anvendelse med prokaryote verter inkluderer phoA promoter, β-laktamase og laktosepromotersystemer, alkalisk fosfatase, tryptofan (*trp*) promotersystem, og hybride promotere slik som tac promoteren. Andre kjente bakterielle promotere er også egnet. Promotere for anvendelse

i bakterielle system vil også inneholde en Shine-Dalgarno (S.D.) sekvens funksjonelt forbundet til DNAet som koder for det humaniserte anti-CD40-antistoffet.

Mange eukaryote promotersekvenser er kjent. Praktisk talt alle eukaryote gener har en
 5 AT-rik region lokalisert omtrentlig 25 til 30 baser oppstrøm for stedet hvor transkripsjon
 er initiert. En annen sekvens funnet 70 til 80 baser oppstrøm fra starten av transkripsjon
 av mange gener er en CNCAAT-region hvor N kan være ethvert nukleotid. Ved den 3'
 enden av de fleste eukaryote gener er en AATAAA-sekvens som kan være signalet for
 tilføyning av poly A-halen til den 3' enden av den kodende sekvensen. Alle disse
 10 sekvensene er egnet satt inn i eukaryote ekspresjonsvektorer.

Eksempler på egnede fremmede sekvenser for anvendelse med gjærverter inkluderer
 promoterne for 3-fosfoglyceratkinase eller andre glykolytiske enzymer, slik som enolase,
 glyceraldehyd-3-fosfatdehydrogenase, heksokinase, pyruvat dekarboksylase,
 15 fosfofruktokinase, glukose-6-fosfatase, 3-fosfoglyceratmutase, pyruvatkinase,
 triosefosfatase, fosfoglukose isomerase og glukokinase.

Induserbare promotere har den ytterligere fordel av transkripsjon kontrollert ved
 dyrkningsforhold. Disse inkluderer gjærpromoterregioner for alkoholdehydrogenase 2,
 20 isocytokrom C, sur fosfatase, derivatzenzymer assosiert med nitrogenmetabolisme,
 metallotienin, glyceraldehyd-3-fosfatdehydrogenase, og enzymer ansvarlig for maltose og
 galaktoseutnyttelse. Egnede vektorer og promotere for anvendelse i gjærekspresjon er
 ytterligere beskrevet i EP 73.657. Gjærehancere er også fordelaktig benyttet med gjær
 promotere.

25 Humanisert anti-CD40-antistofftranskripsjon fra vektorer i mammalske vertsceller er
 kontrollert ved, for eksempel, promotere oppnådd fra genomene av virus slik som
 polyomvirus, koppervirus, adenovirus (slik som Adenovirus 2), bovin papillomvirus,
 fuglesarkomvirus, cytomegalovirus, et retrovirus, hepatitt-B virus og Simian Virus 40
 30 (SV40), fra heterologe mammalske promotere, for eksempel, aktinpromoteren eller en
 immunoglobulinpromoter, eller fra heat-shock promotere, tilveiebrakt at slike promotere
 er kompatible med vertscellesystemene.

De tidlige og sene promoterne av SV40 viruser er bekvemmelig oppnådd som et SV40
 35 restriksjonsfragment som også inneholder SV40 virale startstedet for replikasjon. Den
 øyeblikkelige tidlige promoteren av det humane cytomegaloviruset er bekvemlig oppnådd

som et HindIII E restriksjonsfragment. Et system for å uttrykke DNA i mammalske verter ved å benytte det bovine papillomviruset som en vektor er beskrevet i US Patent Nr. 4.419.446. En modifisering av dette systemet er beskrevet i US Patent Nr. 4.601.978. Se også Reyes et al., 1982, *Nature* 297:598-601, som angir ekspresjon av humant β -interferon cDNA i musceller under kontrollen av en tymidinkinasepromoter fra herpes simplex virus. Alternativt kan rous sarkomvirus lang terminal repetisjon bli benyttet som promoter.

Transkripsjon av et DNA som koder for et humanisert anti-CD40-antistoff beskrevet her ved høyere eukaryoter er ofte økt ved å sette inn en enhancersekvens i vektoren. Mange enhancersekvenser er nå kjente fra mammalske gener (for eksempel globin, elastase, albumin, α -fetoprotein og insulin). Vanligvis er imidlertid en enhancer et virus fra eukaryot celle anvendt. Eksempler inkluderer SV40-enhanceren på den sene siden av replikasjonsstartstedet (bp 100-270), cytomegalovirus tidlig promoterenhanceren, polyomenhanceren på den sene siden av replikasjonsstartstedet, og adenovirusenhancere. Se også Yaniv, 1982, *Nature* 297:17-18 for en beskrivelse av forsterkende elementer for aktivering av eukaryote promotere. Enhanceren kan bli spleiset inn i vektoren ved en posisjon 5' eller 3' for den kodende sekvensen av humanisert anti-CD40-antistoff, men er fortrinnsvis lokalisert ved et sete 5' for promoteren.

Ekspresjonsvektorer anvendt i eukaryote vertsceller (gjær, sopp, insekt, plante, dyr, menneske eller nukleære celler fra andre multicellulære organismer) kan også inneholde sekvenser nødvendig for termineringen av transkripsjon og for stabilisering av mRNA. Slike sekvenser er alminnelig tilgjengelige fra de 5' og, inne i mellom 3', ikke-translaterte regioner av eukaryote eller virale DNAer eller cDNAer. Disse regionene inneholder nukleotidsegmenter transkribert som polyadenylerte fragmenter i den ikke- translaterte delen av mRNAet som koder for anti-CD40-antistoff. En nyttig transkripsjon termineringskomponent er polyadenyleringsregionen fra bovint veksthormon. Se WO94/11026 og ekspresjonsvektoren beskrevet der. I noen utførelsesformer kan humaniserte anti-CD40-antistoffer bli uttrykt ved å benytte CHEF-systemet. (Se for eksempel US Patent Nr. 5.888.809.

Egnede vertsceller for kloning eller ekspresjon av DNAet i vektorene her er de prokaryote, gjær eller høyere eukaryote cellene beskrevet ovenfor. Egnede prokaryoter for dette formålet inkluderer eubakterier, slik som Gram-negative eller Gram-positive organismer, for eksempel, Enterobacteriaceae slik som *Escherichia*, for eksempel, *E. coli*,

Enterobacter, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, for eksempel, *Salmenella typhimurium*, *Serratia*, for eksempel, *Serratia marcescans*, og *Shigella*, så vel som *Bacilli* slik som *B. subtilis* og *B. licheniformis* (for eksempel *B. licheniformis* 41 P beskrevet i DD 266.710 publisert 12. april 1989), *Pseudomonas* slik som *P. aeruginosa*, og

5 *Streptomyces*. En foretrukket *E. coli* kloningsvert er *E. coli* 294 (ATCC 31,446), selv om andre stammer slik som *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537), og *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) er egnet. Disse eksemplene er illustrative i stedet for begrensende.

I tillegg til prokaryoter er eukaryote mikrober slik som filamentøs sopp eller gjær egnede

10 klonings- eller ekspresjonsverter for humaniserte anti-CD40-antistoff-kodende vektorer. *Saccharomyces cerevisiae*, eller alminnelig bakergjær, er den mest alminnelig benyttet blant lavere eukaryote vertsmikroorganismer. Imidlertid er et antall av andre slekter, arter og stammer alminnelig tilgjengelig og nyttige her, slik som *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces* verter slik som, for eksempel, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC

15 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickeramii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilarum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, og *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastors* (EP 183.070); *Kandida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* slik som *Schwanniomyces occidentalis*; og filamentøs sopp slik som, for eksempel, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, og

20 *Aspergillus* verter slik som *A. nidulans* og *A. niger*.

Egnede vertsceller for ekspresjonen av glykosylert humanisert anti-CD40-antistoff er derivert fra multicellulære organismer. Eksempler på invertebrate celler inkluderer plante- og insektsceller, inkluderende, for eksempel, tallrike bakulovirale stammer og

25 varianter og korresponderende tillatelige insektsceller fra verter slik som *Spodoptera frugiperda* (larve), *Aedes aegypti* (mygg), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (bananflue), og *Bombyx mori* (silkeorm). Et utvalg av virale stammer for transfeksjon er offentlig tilgjengelig, for eksempel, L-1 varianten av *Autographa californica* NPV og Bm-5 stammen av *Bombyx mori* NPV, og slike virus kan bli benyttet,

30 spesielt for transfeksjon av *Spodoptera frugiperda* celler.

Plantecellekulturer av bomull, mais, potet, soyabønne, petunia, tomat og tobakk kan også bli benyttet som verter.

35 I et annet aspekt er ekspresjon av humanisert anti-CD40 utført i vertebrate celler. Propageringen av vertebrate celler i kultur (vevskultur) har blitt rutinemessig prosedyre

- og teknikker er utstrakt tilgjengelig. Eksempler på nyttige mammalske vertscellelinjer er apenyre CV1 linje transformert ved SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), human embryonal nyrelinje (293 eller 293 celler subklone for vekst i suspensjonskultur, (Graham et al., 1977, *J. Gen Virol.* 36: 59), babyhamsternyreceller (BHK, ATCC CCL 10), kinesisk hamsterovarieceller/-DHFR⁻ (CHO, Urlaub et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216; for eksempel, DG44), musesertoliceller (TM4, Mather, 1980, *Biol. Reprod.* 23:243-251), apenyreceller (CV1 ATCC CCL 70), Afrikans grønn apenyreceller (VERO-76, ATCC CRL-1587), humane livmorhals karcinomceller (HELA, ATCC CCL 2), hundenyreceller (MDCK, ATCC CCL 34), bøffelrotteleverceller (BRL 3A, ATCC CRL 1442), humane lungeceller (W138, ATCC CCL 75), humane leverceller (Hep G2, HB 8065), musmammatumorer (MMT 060562, ATCC CCL51), TRI celler (Mather et al., 1982, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44-68), MRC 5 celler, FS4 celler, og human hepatom linje (Hep G2).
- 15 Vertsceller er transformert med de ovenfor beskrevne ekspresjons- eller kloningsvektorene for humanisert anti-CD40-antistoffproduksjon og dyrket i bekvemlig næringsmedium modifisert som hensiktsmessig for å indusere promotere, selektere for transformanter, eller amplifisere genene som koder for de ønskede sekvensene.
- 20 Vertscellene benyttet for å produsere et humanisert anti-CD40-antistoff beskrevet her kan bli dyrket i et utvalg av medier. Kommersielt tilgjengelige medier slik som Ham's F10 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO), Minimalt Essentielt Medium ((MEM), (Sigma-Aldrich Co.), RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Co.), og Dulbeccos Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma-Aldrich Co.) er egnet for dyrking av vertscellene. I tillegg kan ethvert av mediene beskrevet i en eller flere av Ham et al., 1979, *Meth. Enz.* 58: 44, Barnes et al., 1980, *Anal. Biochem.* 102: 255, US Patent Nr. 4.767.704, US Patent Nr. 4.657.866, US Patent Nr. 4.927.762, US Patent Nr. 4.560.655, US Patent Nr. 5.122.469, WO 90/103430, og WO 87/00195 bli anvendt som dyrkningsmedier for vertscellene. Ethvert av disse mediene kan bli supplert som nødvendig med hormoner og/eller andre vekstfaktorer (slik som insulin, transferrin eller epidermal vekstfaktor), salter (slik som natriumklorid, kalsium, magnesium og fosfat), buffere (slik som HEPES), nukleotider (slik som adenosin og tymidin), antibiotika (slik som gentamicin), sporelementer (definert som uorganiske forbindelser vanligvis tilstede i sluttkonsentrasjoner i mikromolarområdet), og glukose eller en ekvivalent energikilde. Andre supplementer kan også bli inkludert med
- 35 hensiktsmessige konsentrasjoner som vil være kjent for fagpersoner. Dyrknings-

forholdene, slik som temperatur, pH og lignende, er dem tidligere benyttet med vertscellen valgt for ekspresjon, og vil være kjent for fagpersonen.

- Når det benyttes rekombinante teknikker, kan antistoffet bli produsert intracellulært, i det periplasmiske rommet, eller direkte skilt ut i mediumet. Hvis antistoffet er produsert intracellulært, kan cellene bli ødelagt for å frigjøre protein som et første trinn. Debrier i partikkelform, enten vertsceller eller lyserte fragmenter, kan bli fjernet ved for eksempel sentrifugering eller ultrafiltrering. Carter et al., 1992, *Bio/Technology* 10:163-167 beskriver en prosedyre for å isolere antistoffer som er skilt ut til det periplasmiske rommet av *E. coli*. I korthet er cellepasta tint i nærværet av natriumacetat (pH 3,5), EDTA, og fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF) over omkring 30 minutter. Celledebriet kan bli fjernet ved sentrifugering. Hvor antistoffet er skilt ut i mediumet, er supernatanter fra slike ekspresjonssystemer generelt først konsentrert ved å benytte et kommersielt tilgjengelig protein konsentreringsfilter, for eksempel en Amicon eller Millipore Pellicon ultrafiltreringsenhet. En proteaseinhibitor slik som PMSF kan bli inkludert i ethvert av de foregående trinnene for å inhibere proteolyse og antibiotika kan bli inkludert for å forebygge veksten av ytterligere kontaminanter. Et utvalg av fremgangsmåter kan bli benyttet for å isolere antistoffet fra vertscellen.
- Antistoffsammensetningen fremstilt fra cellene kan bli rensset ved, for eksempel, å benytte hydroksylapatittkromatografi, gelelektroforese, dialyse og affinitetskromatografi, hvor affinitetskromatografi er en typisk rensseteknikk. Egnetheten av protein A som en affinitetsligand avhenger av arten og isotype av ethvert immunoglobulin Fc domene som er tilstede i antistoffet. Protein A kan anvendes for å rense antistoffer som er basert på humane gamma1, gamma2 eller gamma4 tunge kjeder (se for eksempel Lindmark et al., 1983 *J. Immunol. Meth.* 62:1-13). Protein G er anbefalt for alle museisotyper og for human gamma3 (se for eksempel Guss et al., 1986 *EMBO J.* 5:1567-1575). En matrise hvortil en affinitetsligand er festet, er oftest agarose, men andre matriser er tilgjengelige. Mekanisk stabile matriser slik som kontrollert poreglass eller poly(styrendiviny)benzen tillater for raske strømningshastigheter og kortere prosesseringstider enn det som kan bli oppnådd med agarose. Hvor antistoffet omfatter et C_H3 domene, er Bakerbond ABXTM resinen (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) nyttig for rensing. Andre teknikker for proteinrensing slik som fraksjonering på en ionebytterkolonne, etanolpresipitering, revers fase HPLC, kromatografi på silika, kromatografi på heparin SEPHAROSETM kromatografi på en anion- eller kationbytterresin (slik som en polyasparginsyrekolonne),

kromatofokusering, SDS-PAGE, og ammoniumsulfatpresipitering er også tilgjengelig avhengig av antistoffet som skal bli utvunnet.

Etter ethvert preliminært rensetrinn kan blandingen omfattende antistoffet av interesse og kontaminanter bli utsatt for hydrofob interaksjonskromatografi ved lav pH ved å benytte en elueringsbuffer ved en pH mellom omkring 2,5-4,5, vanligvis utført ved lave salt konsentrasjoner (for eksempel fra omkring 0-0,25M salt).

Hybridiseringsforhold

Beskrevet er også nukleinsyrer som hybridiserer under lave, moderate og høye stringensforhold, som definert her, til hele eller en del (for eksempel delen kodende for den variable regionen) av nukleotidsekvensen representert ved SEQ ID NO:17, eller dens komplement, eller SEQ ID NO:20 eller dens komplement. Den hybridiserende delen av den hybridiserende nukleinsyren er vanligvis minst 15 (for eksempel 20, 25, 30 eller 50) nukleotider i lengde. Den hybridiserende delen av den hybridiserende nukleinsyren er minst 80%, for eksempel minst 90%, minst 95% eller minst 98%, identisk til sekvensen av en del eller hele av en nukleinsyre kodende for et anti-CD40-polyprotein (for eksempel en tung kjede eller lett kjede variabel region), eller dens komplement. Hybridiserende nukleinsyrer av typen beskrevet her kan for eksempel bli benyttet som en kloningsprobe, en primer, for eksempel en PCR primer, eller en diagnostisk probe.

Som eksempel og ikke begrensning, er prosedyrer ved å benytte forhold av lav stringens som følger (se også Shilo og Weinberg, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:6789-6792). I en utførelsesform er filtre inneholdeing DNA varmet på forhånd i 6 timer ved 40°C i en løsning inneholdende 35% formamid, 5X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM EDTA, 0,1% PVP, 0,1% Ficoll, 1% BSA og 500 µg/ml denaturert laksesperm DNA. Hybridiseringer er utført i den samme løsningen med de følgende modifikasjonene: 0,02% PVP, 0,02% Ficoll, 0,2% BSA, 100 µg/ml laksesperm DNA, 10% (v/vol) dekstransulfat, og 5-20 X 10⁶ cpm ³²P-merket probe er anvendt. Filtre er inkubert i hybridiseringsblandingen i 18-20 timer ved 40°C, og så vasket i 1,5 timer ved 55°C i en løsning inneholdende 2X SSC, 25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM EDTA og 0,1% SDS. Vaskeløsningen er erstattet med frisk løsning og inkubert i ytterligere 1,5 timer at 60°C. Filtre er blottet tørre og eksponert for autoradiografi. Om nødvendig, er filtre vasket en tredje gang ved 65-68°C og igjen eksponert til film. I en annen utførelsesform inkluderer et eksempel av lave stringensforhold hybridisering i en buffer omfattende 35% formamid, 5X SSC, 50 mM

Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM EDTA, 0,02% PVP, 0,02% Ficoll, 0,2% BSA, 100 µg/ml denaturert laksesperm DNA, og 10% (v/vol) dekstransulfat, i 18-20 timer ved 40°C, vasking i en buffer bestående av 2X SSC, 25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM EDTA, og 0,1% SDS, i 1,5 timer ved 55°C, og vasking i en buffer bestående av 2X SSC, 25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM EDTA, og 0,1% SDS i 1,5 timer ved 60°C. Andre forhold av lav stringens kan bli benyttet og er godt kjent i fagfeltet (for eksempel som benyttet for kryss-art hybridiseringer).

Som eksempel og ikke begrensning, er prosedyrer ved å benytte forhold av høy stringens som følger. Prehybridisering av filtre inneholdende DNA er utført i 8 timer til over natt ved 65°C i buffer bestående av 6X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 0,02% PVP, 0,02% Ficoll, 0,02% BSA og 500 µg/ml denaturert laksesperm DNA. Filtre er hybridisert i 48 timer ved 65°C i prehybridiseringsblanding inneholdende 100 µg/ml denaturert laksesperm DNA og 5-20 X 10⁶ cpm av ³²P-merket probe. Vasking av filtre er gjort ved 37°C i 1 time i en løsning inneholdende 2X SSC, 0,01% PVP, 0,01% Ficoll og 0,01% BSA. Dette er etterfulgt ved en vasking i 0,1X SSC ved 50°C i 45 minutter før autoradiografi. Andre forhold av høy stringens som kan bli benyttet er godt kjent i fagfeltet.

Som eksempel og ikke begrensning, er prosedyrer ved å benytte forhold av moderat stringens som følger: Filtre inneholdende DNA er på forhånd behandlet i 6 timer ved 55°C i en løsning inneholdende 6X SSC, 5X Denhardts løsning, 0,5% SDS og 100 µg/ml denaturert laksesperm DNA. Hybridiseringene er utført i den samme løsningen med 5-20 x 10⁶ cpm ³²P-merket probe. Filtre er inkubert i hybridiseringsblanding i 18-20 timer ved 55°C, og så vasket to ganger i 30 minutter ved 60°C i en løsning inneholdende 1X SSC og 0,1% SDS. Filtre er blottet tørre og eksponert for autoradiografi. Vasking av filtre er gjort ved 37°C i 1 time i en løsning inneholdende 2X SSC, 0,1% SDS. Andre forhold av moderat stringens som kan anvendes er godt kjent i fagfeltet (se for eksempel Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2. utg., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Sambrook et al., 2001; *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3. utg., Cold Spring Harbor Publish., Cold Spring Harbor, N.Y.; se også Ausubel et al., utg., i *Current Protocols in Molecular Biology* series of laboratory technique manuals, 1987-1999, Current Protocols, © 1994-1999 John Wiley and Sons, Inc.).

Det er også beskrevet isolerte polynukleotider inkluderende sekvenser som koder for et antistoff eller antistoff-fragment som har tung kjede variabel region aminosyresekvens som er minst 80%, minst 90%, minst 95%, minst 98% eller minst 99% identisk til aminosyresekvensen av SEQ ID NO:10, Beskrevet er også isolerte polynukleotider inkluderende sekvenser som koder for et antistoff eller antistoff-fragment som har lett kjede variabelt domene aminosyresekvensen som er minst 80%, minst 90%, minst 95%, minst 98% eller minst 99% identisk til aminosyresekvensen av SEQ ID NO:16.

I et aspekt koder den/de isolerte polynukleotidsekvensen(e) for et antistoff eller antistoff-fragment som har et tung kjede variabelt domene og en lett kjede variabel region, hver inkluderende en aminosyresekvens som er minst 80%, minst 90%, minst 95%, minst 98% eller minst 99% identisk til aminosyresekvensen av henholdsvis; SEQ ID NO:10 og SEQ ID NO:16

Som benyttet her, refererer betegnelsene “identisk” eller “prosent identitet,” i sammenhengen av to eller flere nukleinsyrer eller polypeptidsekvenser, til to eller flere sekvenser eller delsekvenser som er de samme eller har en spesifisert prosentandel av nukleotider eller aminosyreresiduer som er de samme, når sammenlignet og oppstilt for maksimal overensstemmelse. For å bestemme prosent identitet, er sekvensene oppstilt for optimale sammenligningsformål (for eksempel kan åpninger bli introdusert i sekvensene av en første aminosyre eller nukleinsyresekvensen for optimal oppstilling med en andre amino eller nukleinsyresekvens). Aminosyreresiduene eller nukleotidene ved korresponderende aminosyreposisjoner eller nukleotidposisjoner er så sammenlignet. Når en posisjon i den første sekvensen er okkupert ved den samme aminosyreresiduen eller nukleotidet som den korresponderende posisjonen i den andre sekvensen, så er molekylene identiske ved den posisjonen. Prosent identitet mellom de to sekvensene er en funksjon av antallet av identiske posisjoner delt ved sekvensene (dvs. % identitet = # av identiske posisjoner/totale # av posisjoner (for eksempel overlappende posisjoner) x 100). I noen utførelsesformer er de to sekvensene som er sammenlignet av den samme lengden etter at åpninger er introdusert i sekvensene, som hensiktsmessig (for eksempel ekskluderende ytterligere sekvens som strekker seg utover sekvensene som blir sammenlignet). For eksempel, når sekvenser av variabel region er sammenlignet, er leder og/eller konstant domenesekvensene ikke betraktet. For sekvenssammenligninger mellom to sekvenser, refererer en “korresponderende” CDR til en CDR i den samme lokaliseringen i begge sekvenser (for eksempel CDR-H1 av hver sekvens).

Bestemmelsen av prosent identitet eller prosent likhet mellom to sekvenser kan bli utført ved å benytte en matematisk algoritme. Et foretrukket, ikke-begrensende eksempel på en matematisk algoritme benyttet for sammenligningen av to sekvenser er algoritmen til Karlin og Altschul, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268, modifisert som i

5 Karlin og Altschul, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. En slik algoritme er inkorporert i NBLAST og XBLAST programmene til Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410. BLAST nukleotidsøk kan bli utført NBLAST programmet, scoring = 100, ordlengde = 12, for å oppnå nukleotidsekvenser homologe til en nukleinsyre kodende for et protein av interesse. BLAST proteinsøk kan bli utført med XBLAST programmet,

10 score = 50, ordlengde = 3, for å oppnå aminosyresekvenser homologe til protein av interesse. For å oppnå oppstillinger med åpninger for sammenligningsformål, kan "Gapped" BLAST bli benyttet som beskrevet i Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. Alternativt kan PSI-Blast bli benyttet for å utføre et gjentatt søk som detekterer fjernliggende slektskap mellom molekyler (Id.). Når det benyttes BLAST,

15 Gapped BLAST og PSI-Blast programmer, kan standardparameterne av de respektive programmene (for eksempel XBLAST og NBLAST) bli anvendt. Et annet foretrukket, ikke-begrensende eksempel av en matematisk algoritme benyttet for sammenligningen av sekvensene er algoritmen til Myers og Miller, *CABIOS* (1989). En slik algoritme er inkorporert i ALIGN programmet (versjon 2.0) som er del av GCG sekvensoppstilling

20 programvarepakken. Når det benyttes ALIGN programmet for sammenligning av aminosyresekvenser, kan en PAM120 vektresiduetabell, en åpningslengdekostnad på 12, og en åpningskostnad på 4 bli anvendt. Ytterligere algoritmer for sekvensanalyse er kjent i fagfeltet og inkluderer ADVANCE og ADAM som beskrevet i Torellis og Robotti, 1994, *Comput. Appl. Biosci.* 10:3-5; og FASTA beskrevet i Pearson og Lipman, 1988,

25 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-8. I FASTA er ktup en kontrollmulighet som setter sensitiviteten og hastigheten av søket. Om ktup = 2, er lignende regioner i de to sekvensene som blir sammenlignet funnet ved å se på par av oppstilte residuer; om ktup = 1, er enkle oppstilte aminosyrer undersøkt. ktup kan bli satt til 2 eller 1 for protein sekvenser, eller fra 1 til 6 for DNA sekvenser. Standarden om ktup ikke er spesifisert er 2

30 for proteiner og 6 for DNA. Alternativt kan proteinsekvensoppstilling bli utført ved å benytte CLUSTAL W algoritmen, som beskrevet by Higgins et al., 1996, *Methods Enzymol.* 266:383-402.

Ikke-terapeutiske Anvendelser

Antistoffene beskrevet her er nyttige som affinitetsrensemidler. I denne fremgangsmåten er antistoffene immobilisert på en fast fase slik som en Sephadex resin eller filterpapir, ved å benytte fremgangsmåter godt kjent i fagfeltet. Det immobiliserte antistoffet er kontaktet med en prøve inneholdende CD40-proteinet (eller fragmentet derav) for å bli rensset, og deretter er støtten vasket med et egnet løsningsmiddel som vil fjerne hovedsakelig alt materialet i prøven med unntak av CD40-proteinet, som er bundet til det immobiliserte antistoffet. Til slutt blir støtten vasket med et annet egnet løsningsmiddel, slik som glycinbuffer, pH 5,0 som vil frigjøre CD40-proteinet fra antistoffet.

Humaniserte anti-CD40-antistoffer er også nyttige i diagnostiske tester for å detektere og/eller kvantifisere CD40-protein, for eksempel, detektere CD40-ekspresjon i spesifikke celler, vev eller serum.

15

For diagnostiske anvendelser vil antistoffet vanligvis være merket med en detekterbar del. Tallrike merker er tilgjengelig som kan generelt bli gruppert i de følgende kategoriene:

- (a) Radioisotoper, for eksempel, slik som ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H og ^{131}I . Antistoffet kan bli merket med radioisotopen, ved å benytte teknikker beskrevet i, for eksempel, *Current Protocols in Immunology*, Volumer 1 og 2, 1991, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. Radioaktivitet kan bli målt ved for eksempel scintillasjonstelling.
- (b) Fluorescerende merker slik som sjeldne jordchelater (europium chelater) eller fluorescein og dets derivater, rhodamin og dets derivater, dansyl, Lissamine, fykoerytrin og Texas Rød er tilgjengelig. De fluorescerende merkene kan bli konjugert til antistoffet via kjente teknikker, slik som dem beskrevet i *Current Protocols in Immunology, supra*. Fluorescens kan bli kvantifisert ved å benytte et fluorimeter.
- (c) Ulike enzym-substratmerker er tilgjengelige (se for eksempel US Patent Nr. 4.275.149 som tilveiebringer en gjennomgåelse av noen av disse). Enzymet katalyserer generelt en kjemisk endring av det kromogene substratet som kan bli målt ved å benytte ulike teknikker. For eksempel kan enzymet katalysere en fargeendring i et substrat som kan bli målt spektrofotometrisk. Alternativt kan enzymet endre fluorescensen eller kjemiluminescensen av substratet. Teknikker for kvantifisering av en endring i fluorescens er beskrevet ovenfor. Det

35

kjemiluminescerende substratet blir elektronisk eksitert ved en kjemisk reaksjon og kan så emitte lys som kan bli målt, ved for eksempel å benytte et kjemiluminometer, eller donere energi til en fluorescerende akseptor. Eksempler på enzymatiske merker inkluderer luciferaser slik som ildflue luciferase og bakteriell luciferase (US Patent Nr. 4.737.456), luciferin, 2,3-dihydroftal-azinedioner, malatdehydrogenase, urease, peroksidase slik som pepperrotoksidase (HRPO), alkalisk fosfatase, β -galaktosidase, glukamylase, lysozym, sakkarid oksidaser (slik som glukoseoksidase, galaktoseoksidase, og glukose-6-fosfat dehydrogenase), heterocydiske oksidaser (slik som uricase og xantinoksidase), laktoperoksidase, mikroperoksidase og lignende. Teknikker for konjugering av enzymer til antistoffer er beskrevet, for eksempel, i O'Sullivan et al., 1981, *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, in *Methods in Enzym.* (J. Langen & H. Van Vunakis, utg.), Academic press, N.Y., 73: 147-166.

15

Eksempler på enzym-substratkombinasjoner inkluderer, for eksempel:

- (a) Pepperrotperoksidase (HRPO) med hydrogenperoksidase som et substrat, hvor hydrogenperoksidasen oksiderer en fargeforløper slik som ortofenylendiamin (OPD) eller 3,3',5,5'-tetrametylbenzidinhydroklorid (TMB);
- (b) alkalisk fosfatase (AP) med para-Nitrofenylfosfat som kromogent substrat; og
- (c) β -D-galaktosidase (β -D-Gal) med et kromogent substrat slik som p-nitrofenyl- β -D-galaktosidase eller fluorogent substrat 4-metylbelliferyl- β -D-galaktosidase.

25

Tallrike andre enzym-substratkombinasjoner er tilgjengelig for fagpersoner. For en generell gjennomgåelse av disse, se US Patent Nr. 4.275.149 og US Patent Nr. 4.318.980.

Merket kan bli indirekte konjugert med antistoffet ved å benytte ulike kjente teknikker. For eksempel kan antistoffet bli konjugert med biotin og enhver av de tre brede kategoriene av merker nevnt ovenfor kan bli konjugert med avidin, eller omvendt. Biotin binder selektivt til avidin og merket kan derfor bli konjugert med antistoffet på denne indirekte måten. For og alternativt oppnå indirekte konjugering av merket med antistoffet, kan antistoffet bli konjugert med et lite haptent (slik som digoksin) og en av de forskjellige typene av merker nevnt ovenfor er konjugert med et anti-haptent antistoff (for

35

eksempel anti-digoksinantistoff). Indirekte konjugering av merket med antistoffet kan bli oppnådd på denne måten.

I en annen utførelsesform er det humaniserte anti-CD40-antistoffet anvendt umerket og
5 detektert med et merket antistoff som binder det humaniserte anti-CD40-antistoffet.

Antistoffene beskrevet her kan bli benyttet i enhver kjent testmetode, slik som kompetitive bindingstester, direkte og indirekte sandwich-tester og immunopresipiterings-tester. Se for eksempel Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*,
10 s.147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

Diagnostiske sett

Et humanisert anti-CD40-antistoff kan bli benyttet i et diagnostisk sett, dvs. en pakket
15 kombinasjon av reagenser i på forhånd bestemte mengder med instruksjoner for å utføre den diagnostiske testen. Hvor antistoffet er merket med et enzym, kan settet inkludere substrater og kofaktorer nødvendig ved enzymet slik som en substratforløper som tilveiebringer den detekterbare kromoforen eller fluoroforen. I tillegg kan andre tilsetninger bli inkludert slik som stabilisatorer, buffere (for eksempel en blokkerings-
20 buffer eller lysisbuffer) og lignende. De relative mengdene av de ulike reagensene kan bli variert bredt for å tilveiebringe konsentrasjoner i løsning av reagensene som hovedsakelig optimaliserer sensitiviteten av testen. Reagensene kan bli tilveiebrakt som tørre pulvere, vanligvis lyofiliserte, inkluderende tilsetninger som ved oppløsning vil tilveiebringe en reagensløsning som har den hensiktsmessige konsentrasjonen.

25

Terapeutiske anvendelser

I en annen utførelsesform er et humanisert anti-CD40-antistoff beskrevet her nyttig i
30 behandlingen av ulike lidelser assosiert med ekspresjonen av CD40 som beskrevet her.

30

Det humaniserte anti-CD40-antistoffet eller midlet er administrert ved ethvert egnet middel, inkluderende parenteral, subkutan, intraperitoneal, intrapulmonal og intranasal og, om ønsket for lokal immunundertrykkende behandling, intralesjonal administrasjon (inkluderende å perfusere eller på annen måte kontakte graften med antistoffet før
35 transplantasjon). Det humaniserte anti-CD40-antistoffet eller midlet kan bli administrert, som for eksempel en infusjon eller som en bolus. Parenterale infusjoner inkluderer

intramuskulær, intravenøs, intraarteriell, intraperitoneal eller subkutan administrasjon. I tillegg er det humaniserte anti-CD40-antistoffet egnet administrert ved pulsinfusjon, spesielt med nedadgående doser av antistoffet. I et aspekt er dosering gitt ved injeksjoner, mest foretrukket intravenøse eller subkutane injeksjoner, delvis avhengig av hvorvidt

5 administrasjonen er kort eller kronisk.

For forebyggingen eller behandlingen av sykdom vil den hensiktsmessige doseringen av antistoff avhenge av et utvalg av faktorer slik som typen av sykdom som skal bli behandlet, som definert ovenfor, kraftigheten og forløpet av sykdommen, hvorvidt

10 antistoffet er administrert for forebyggende eller terapeutiske formål, tidligere terapi, pasientens kliniske historie og respons til antistoffet, og diskresjonen av den behandlende legen. Antistoffet er egnet administrert til pasienten ved et tidspunkt eller over en serie av behandlinger.

15 Avhengig av typen og kraftigheten av sykdommen er omtrent 1 µg/kg til 20 mg/kg (for eksempel 0,1-15 mg/kg) av antistoff en initial kandidatdosering for administrasjon til pasienten, enten ved for eksempel en eller flere separate administrasjoner, eller ved kontinuerlig infusjon. En typisk daglig dosering kan variere fra omtrent 1 µg/kg til 100 mg/kg eller mer, avhengig av faktorene nevnt ovenfor. For repeterte administrasjoner

20 over flere dager eller lenger, avhengig av tilstanden, er behandlingen opprettholdt inntil en ønsket undertrykkelse av sykdomssymptomer forekommer. Imidlertid kan andre doseringsregimer være nyttige. Progresjonen av denne terapien er enkelt monitorert ved konvensjonelle teknikker og tester. Et eksemplarisk doseringsregime er den beskrevet i WO 94/04188.

25 Antistoffsammensetningen vil bli formulert, dosert og administrert på en måte samsvarende med god medisinsk praksis. Faktorer for omtanke i denne sammenhengen inkluderer den bestemte sykdommen som blir behandlet, det bestemte pattedyret som blir behandlet, den kliniske tilstanden av den individuelle pasienten, årsaken av lidelsen,

30 stedet for levering av midlet, fremgangsmåten for administrasjon, planleggingen av administrasjon og andre faktorer kjent for de som praktiserer medisin. Den "terapeutisk effektive mengden" av antistoffet som skal bli administrert vil bli styrt ved slike betraktninger, og er den minimale mengden nødvendig for å forebygge, forbedre eller behandle sykdommen assosiert med CD40-ekspresjon.

Antistoffet trenger ikke, men er eventuelt, formulert med et eller flere midler nå benyttet for å forebygge eller behandle lidelsen det dreier seg om. Den effektive mengden av slike andre midler avhenger av mengden av humanisert anti-CD40-antistoff tilstede i formuleringen, typen av lidelse eller behandling, og andre faktorer diskutert ovenfor.

- 5 Disse er generelt benyttet i de samme doseringene og med administrasjonsruter som benyttet her tidligere eller fra omtrent 1 til 99% av de her tidligere benyttede doseringene.

CD40-assosierte lidelser

- 10 Anti-CD40-antistoffene eller midlene er nyttige for behandling eller forebygging av en CD40-uttrykkende cancer eller en immunologisk lidelse karakterisert ved ekspresjon av CD40, for eksempel ved uhensiktsmessig aktivering av immunceller (for eksempel lymfocytter eller dendrittceller). Slik ekspresjon av CD40 kan være på grunn av for eksempel økte CD40-proteinnivåer på cellenes overflate og/eller endret antigenisitet av
- 15 uttrykt CD40. Behandling eller forebygging av den immunologiske lidelsen, i henhold til fremgangsmåtene beskrevet her, er oppnådd ved å administrere til et individ med behov for slik behandling eller forebygging en effektiv mengde av et anti-CD40-antistoff eller middel, hvorved antistoffet (i) binder til aktiverte immunceller som uttrykker CD40 og som er assosierte med sykdomstilstanden og (ii) utøver en cytotoksisk, cytostatisk
- 20 eller immunundertrykkende effekt på de aktiverte immuncellene.

- Immunologiske sykdommer som er karakterisert ved uhensiktsmessig aktivering av immunceller og som kan bli behandlet eller forebygget ved fremgangsmåtene beskrevet her, kan bli klassifisert ved for eksempel typen(e) av hypersensitivitetsreaksjon(er) som
- 25 ligger bak lidelsen. Disse reaksjonene er vanligvis klassifisert i fire typer: anafylaktiske reaksjoner, cytotoksiske (cytolytiske) reaksjoner, immunkompleksreaksjoner eller cellemedierte immunitets (CMI) reaksjoner (også referert til som forsinket-type hypersensitivitets (DTH) reaksjoner). (Se for eksempel *Fundamental Immunology* (William E. Paul utg., Raven Press, N.Y., 3, utg. 1993).)

30

- Spesifikke eksempler på slike immunologiske sykdommer inkluderer følgende: reumatoid artritt, autoimmun demyeliniserende sykdommer (for eksempel multiple sklerose, allergisk encefalomyelitt), endokrin oftalmopati, uveoretinitt, systemisk lupus erytematosus, myasthenia gravis, Graves sykdom, glomerulonefritt, autoimmun
- 35 hepatologisk lidelse, inflammatorisk tarmsykdom (for eksempel Crohns sykdom eller ulcerativ kolitt), anafylakse, allergisk reaksjon, Sjøgrens syndrom, type I diabetes

mellitus, primær gallecirrhose, Wegeners granulomatos, fibromyalgi, polymyositt, dermatomyositt, inflammatorisk myositt, multiple endokrin svikt, Schmidts syndrom, autoimmun uveitt, Addisons sykdom, adrenalitt, tyroiditt, Hashimotos tyroiditt, autoimmun tyroid sykdom, pernisiøs anemi, gastrisk atrofi, kronisk hepatitt, lupoid
5 hepatitt, aterosklerose, subakutt kutan lupus erythematosus, hypoparatyroidisme, Dresslers syndrom, autoimmun trombocytopeni, idiopatisk trombocytopenisk purpura, hemolytisk anemi, pemphigus vulgaris, pemphigus, dermatitt herpetiformis, alopecia arcata, pemfigoid, skleroderm, progressiv systemisk sklerose, CREST syndrom (calcinose, Raynauds fenomen, esofageal dysmotilitet, sclerodactyly og telangiectasia), autoimmun
10 infertilitet hos menn og kvinner, ankyloserende spondylitt, ulcerativ kolitt, blandet bindevevssykdom, polyarteritt nodosa, systemisk nekrotiserende vaskulitt, atopisk dermatitt, atopisk rhinitt, Goodpastures syndrom, Chagas sykdom, sarkoidose, reumatisk feber, astma, tilbakevendende abortering, anti-fosfolipidsyndrom, bondens lunge, erythema multiforme, post kardiotoris syndrom, Cushings syndrom, autoimmun kronisk
15 aktiv hepatitt, "fuglelikeres lunge", toksisk epidermal nekrolyse, Alports syndrom, alveolitt, allergisk alveolitt, fibroserende alveolitt, interstitiell lungesykdom, erythema nodosum, pyoderma gangrenosum, transfusjonsreaksjon, Takayasu arteritt, polymyalgia rheumatica, temporal arteritt, schistosomiasis, giantcellarteritt, ascariasis, aspergillose, Sampters syndrom, eksem, lymfomatoid granulomatose, Behcets sykdom, Caplans
20 syndrom, Kawasakis sykdom, denguefeber, encefalomyelitt, endokarditt, endomyokardial fibrose, endoftalmitt, erythema elevatum et diutinum, psoriasis, erythroblastose fetialis, eosinofil facitt, Shulmans syndrom, Feltys syndrom, filariasi, cyklitt, kronisk cyklitt, heterokronisk cyklitt, Fuchs cyklitt, IgA nefropati, Henoch-Schonlein purpura, graft versus verts sykdom, transplantasjonsfrastøting, kardiomyopati, Eaton-Lamberts
25 syndrom, tilbakevendende polykondritt, kryoglobulinemi, Waldenstrøms makroglobulemi, Evans syndrom, akutt respiratorisk lidelsessyndrom, pulmonar inflammasjon, osteoporose, forsinket type hypersensitivitet og autoimmun gonadal svikt.

Følgelig omfatter fremgangsmåtene beskrevet her behandling av lidelser av B-
30 lymfocytter (for eksempel systemisk lupus erythematosus, Goodpastures syndrom, reumatoid artritt og type I diabetes), Th₁-lymfocytter (for eksempel reumatoid artritt, multiple sklerose, psoriasis, Sjörgrens syndrom, Hashimotos tyroiditt, Graves sykdom, primær gallecirrhose, Wegeners granulomatose, tuberkulose eller graft versus verts sykdom), eller Th₂-lymfocytter (for eksempel atopisk dermatitt, systemisk lupus
35 erythematosus, atopisk astma, rhinokonjunktivitt, allergisk rhinitt, Omenns syndrom,

systemisk sklerose eller kronisk graft versus verts sykdom). Generelt involverer lidelser som involverer dendrittceller lidelser av Th₁-lymfocytter eller Th₂-lymfocytter.

I noen utførelsesformer er den immunologiske lidelsen en T-cellemediert immunologisk lidelse, slik som en T-cellelidelse hvor aktiverte T-celler assosiert med lidelsen uttrykker CD40. Anti-CD40-antistoffer eller midler kan bli administrert for å utarme slik CD40-uttrykkende aktiverte T-celler. I en spesifikk utførelsesform kan administrasjon av anti-CD40-antistoffer eller midler utarme CD40-uttrykkende aktiverte T-celler, mens resten av T-celler ikke er vesentlig utarmet ved anti-CD40 eller midlet. I denne betydningen betyr “ikke vesentlig utarmet” at mindre enn omkring 60% eller mindre enn omtrent 70% eller mindre enn omtrent 80% av de resterende T-cellene ikke er utarmet.

Anti-CD40-antistoffene og midlene som beskrevet her er også nyttige for behandling eller forebygging av en CD40-uttrykkende cancer. Behandling eller forebygging av en CD40-uttrykkende cancer, i henhold til fremgangsmåtene beskrevet her, er oppnådd ved å administrere til et individ med behov av slik behandling eller forebygging en effektiv mengde av anti-CD40-antistoffet eller midlet, hvorved antistoffet eller midlet (i) binder til CD40-uttrykkende cancerceller og (ii) utøver en cytotoksisk eller cytostatisk effekt for å utarme eller inhibere proliferasjonen av de CD40-uttrykkende cancercellene.

CD40-uttrykkende cancere som kan bli behandlet eller forebygget ved fremgangsmåtene beskrevet her inkluderer, for eksempel leukemi, slik som akutt leukemi, akutt lymfocytisk leukemi, akutt myelocytisk leukemi (for eksempel myeloblastisk, promyelocytisk, myelomonocytisk, monocytisk eller erytroleukemi), kronisk leukemi, kronisk myelocytisk (granulocytisk) leukemi eller kronisk lymfocytisk leukemi; Polycytemi vera; Lymfom (for eksempel Hodgkins sykdom eller Ikke-Hodgkins sykdom); multiple myelom, Waldenstrøms makroglobulinemi; tung kjede sykdom; solide tumorer slik som sarkomer og karsinomer (for eksempel fibrosarkom, myksosarkom, liposarkom, kondrosarkom, osteogen sarkom, osteosarkom, kordom, angiosarkom, endoteliosarkom, lymfangiosarkom, lymfangioendoteliosarkom, synoviom, mesoteliom, Ewings tumor, leiomyosarkom, rhabdomyosarkom, kolonkarcinom, kolorektal karcinom, pankreatisk cancer, brystcancer, ovariecancer, prostatacancer, plateepitelcellekarcinom, basalcelle karcinom, adenokarcinom, svettekjertelkarcinom, sebacøs kjertelkarcinom, papillar karcinom, papillare adenokarcinomer, cystadenokarcinom, medulla karcinom, bronkogen karcinom, nyrecellekarcinom, hepatom, gallegangskarcinom, koriokarcinom, seminom, embryonal karcinom, Wilms tumor, livmorhalscancer, livmorscancer, testikkulær tumor,

lungekarzinom, småcellelungekarzinom, ikke-småcellelungekarzinom, blærekarzinom, epitelkarzinom, gliom, astrocytom, medulloblastom, kraniofaryngiom, ependymom, pinealom, hemangioblastom, akustisk neurom, oligodendrogliom, menangioma, melanom, neuroblastom, retinoblastom, nasofaryngeal karcinom eller esophageal karcinom).

5

Farmasøytiske sammensetninger og administrasjon derav

En sammensetning omfattende et CD40-bindende middel (for eksempel et anti-CD40-antistoff) kan bli administrert til et individ som har eller er risiko for å ha en immunologisk lidelse eller en CD40-uttrykkende cancer. Oppfinnelsen tilveiebringer videre anvendelsen av et antistoff eller antigenbindende fragment i følge oppfinnelsen i fremstillingen av et medikament for forebygging eller behandling av en CD40-uttrykkende cancer eller immunologisk lidelse. Betegnelsen "individ" som benyttet her betyr enhver mammalsk pasient hvortil et CD40-bindende middel kan bli administrert, inkluderende for eksempel mennesker og ikke-humane pattedyr, slik som primater, gnagere og hunder. Individet spesifikt tiltenkt for behandling ved å benytte fremgangsmåten beskrevet her inkluderer mennesker. Antistoffene eller midlene kan bli administrert enten alene eller i kombinasjon med andre sammensetninger i forebyggingen eller behandlingen av den immunologiske lidelsen eller CD40-uttrykkende canceren.

20

Ulike leveringssystemer er kjent og bli benyttet for å administrere det CD40-bindende midlet. Fremgangsmåter for introduksjon inkluderer, men er ikke begrenset til intradermale, intramuskulære, intraperitoneale, intravenøse, subkutane, intranasale, epidurale og orale ruter. Det CD40-bindende midlet kan bli administrert ved for eksempel infusjon, bolus eller injeksjon, og kan bli administrert sammen med andre biologisk aktive midler slik som kjemoterapeutiske midler. Administrasjon kan være systemisk eller lokal.

25

I spesifikke utførelsesformer er sammensetningen av CD40-bindende middel administrert ved injeksjon, ved hjelp av et kateter, ved hjelp av en stikkpille, eller ved hjelp av et implantat, hvor implantatet er av et porøst, ikke-porøst eller gelatinholdig materiale, inkluderende en membran, slik som en sialastisk membran, eller en fiber. Når sammensetningen administreres er vanligvis materialer hvortil anti-CD40-antistoffet eller midlet ikke absorberer benyttet.

35

I andre utførelsesformer er anti-CD40-antistoffet eller midlet levert i et kontrollert frigjøringsystem. I en utførelsesform kan en pumpe bli benyttet (se for eksempel Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533; Sefton, 1989, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201; Buchwald et al., 1980, *Surgery* 88:507; Saudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). I en annen utførelsesform kan polymere materialer bli benyttet. (Se for eksempel *Medical Applications of Controlled Release* (Langer og Wise utg., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance* (Smolen og Ball utg., Wiley, New York, 1984); Ranger og Peppas, 1983, *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61. Se også Levy et al., 1985, *Science* 228:190; During et al., 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard et al., 1989, *J. Neurosurg.* 71:105.) Andre kontrollerte frigjøringsystemer er diskutert i for eksempel Langer, *supra*.

Et CD40-bindende middel (for eksempel et anti-CD40-antistoff) kan bli administrert som farmasøytiske sammensetninger omfattende en terapeutisk effektiv mengde av det bindende middel og en eller flere farmasøytisk compatible ingredienser. For eksempel inkluderer den farmasøytiske sammensetningen vanligvis en eller flere farmasøytiske bærere (for eksempel sterile væsker, slik som vann og oljer, inkluderende dem av petroleum, dyr, vegetabilsk eller syntetisk opprinnelse, slik som peanøttolje, soyabønne olje, mineralolje, sesamolje og lignende). Vann er en mer typisk bærer når den farmasøytiske sammensetningen er administrert intravenøst. Saltløsninger og vannholdige dekstrose og glycerolløsninger kan også bli benyttet som flytende bærere, spesielt for injiserbare løsninger. Egnede farmasøytiske tilsetninger inkluderer, for eksempel, stivelse, glukose, laktose, sukrose, gelatin, malt, ris, mel, kritt, silikagel, natriumstearat, glycerolmonostearat, talkum, natriumklorid, tørket skummet melk, glycerol, propylen, glykol, vann, etanol og lignende. Andre egnede farmasøytiske tilsetninger inkluderer aminosyrer (for eksempel arginin, histidin, glycin), overflateaktive stoffer (for eksempel polysorbate) og sukre og sukkeralkoholer (for eksempel sukrose eller sorbitol og andre polyoler (for eksempel trehalose)). Sammensetningen kan om ønskelig også inneholde mindre mengder av fuktemidler eller emulgatorer, eller pH-bufrende midler. Disse sammensetningene kan ta formen av løsninger, suspensjoner, emulsjoner, tabletter, piller, kapsler, pulvere, opprettholdt-frigjøringsformuleringer og lignende. Sammensetningen kan formuleres som en stikkpille, med tradisjonelle bindere og bærere slik som triglycerider. Orale formuleringer kan inkludere standard bærere slik som farmasøytiske grader av mannitol, laktose, stivelse, magnesiumstearat, natrium sakkarin, cellulose, magnesiumkarbonat *etc.* Eksempler på egnede farmasøytiske bærere

er beskrevet i "Remington's Pharmaceutical Sciences" ved E.W. Martin. Slike sammensetninger vil inneholde en terapeutisk effektiv mengde av nukleinsyren eller proteinet, vanligvis i rensert form, sammen med en egnet mengde av bærer for å tilveiebringe formen for korrekt administrasjon til pasienten. Formuleringene korresponderer til måten av administrasjon.

I typiske utførelsesformer er den farmasøytiske sammensetningen formulert i overensstemmelse med rutinemessige prosedyrer som en farmasøytisk sammensetning tilpasset for intravenøs administrasjon til mennesker. Vanligvis er sammensetninger for intravenøs administrasjon løsninger i steril isoton vannholdig buffer. Hvor nødvendig kan legemidlet også inkludere et løselighetsgjørende middel og et lokalt anestetikum slik som lignokain for å lette smerte ved stedet av injeksjonen. Generelt er ingrediensene levert enten separat eller blandet sammen i enhetsdoseringsform, for eksempel som et tørt lyofilisert pulver eller vannfritt konsentrat i en hermetisk forseglet beholder slik som en ampulle eller pose som indikerer mengden av aktivt middel. Hvor legemidlet skal bli administrert ved infusjon, kan det bli tildelt med en infusjonsflaske inneholdende steril farmasøytisk grad vann eller salt. Hvor legemidlet er administrert ved injeksjon, kan en ampulle av sterilt vann for injeksjon eller salt bli tilveiebrakt slik at ingrediensene kan bli blandet før administrasjon.

Videre kan den farmasøytiske sammensetningen bli tilveiebrakt som et farmasøytisk sett omfattende (a) en beholder inneholdende et CD40-bindende middel (for eksempel et anti-CD40-antistoff) i lyofilisert form og (b) en andre beholder inneholdende et farmasøytisk akseptabelt fortynningsmiddel (for eksempel sterilt vann) for injeksjon. Det farmasøytisk akseptable fortynningsmidlet kan bli anvendt for rekondisjonering eller fortynning av det lyofiliserte anti-CD40-antistoffet eller midlet. Eventuelt assosiert med slik beholder(e) kan være et notat i formen preskribert ved et offentlig organ som regulerer fremstillingen, anvendelsen eller salget av legemidler eller biologiske produkter, hvor notater reflekter godkjenning ved byrået for fremstilling, anvendelse eller salg for human administrasjon.

Mengden av det CD40-bindende midlet (for eksempel anti-CD40-antistoff) som er effektivt ved behandlingen eller forebyggingen av en immunologisk lidelse eller CD40-uttrykkende cancer kan bli bestemt ved standard kliniske teknikker. I tillegg kan *in vitro* tester eventuelt bli benyttet for å hjelpe å identifisere optimale doseringsområder. Den presise dosen som skal bli benyttet i formuleringen vil også avhenge av ruten av administrasjon, og trinnet av immunologisk lidelse eller CD40-uttrykkende cancer, og

burde bli bestemt i henhold til bedømmelsen av legen og hver pasients omstendigheter. Effektive doser kan bli ekstrapolert fra dose-responskurver derivert fra *in vitro* eller dyremodelltestsystemer.

- 5 Toksisitet og terapeutisk virkeevne av anti-CD40-antistoffet eller midlet kan for eksempel bli bestemt i cellekulturer eller eksperimentelle dyr ved standard farmasøytiske prosedyrer for å bestemme LD₅₀ (dosen dødelig for 50% av populasjonen) og ED₅₀ (dosen terapeutisk effektiv i 50% av populasjonen). Doseforholdet mellom toksiske og terapeutiske effekter er den terapeutiske indeksen og kan bli uttrykt som forholdet
- 10 LD₅₀/ED₅₀. Et CD40-bindende middel (for eksempel et anti-CD40-antistoff) som viser en stor terapeutisk indeks er foretrukket. Hvor et CD40-bindende middel viser toksiske bieffekter, kan et leveringssystem som målretter det CD40-bindende midlet til stedet av rammet vev bli benyttet for å minimalisere potensiell skade på ikke-CD40-uttrykkende celler og, derved redusere bieffekter.

- 15 Dataene oppnådd fra cellekulturtestene og dyrestudiene kan bli benyttet i formulering av et område av dosering for anvendelse i mennesker. Doseringen av det CD40-bindende midlet ligger vanligvis innenfor et område av sirkulerende konsentrasjoner som inkluderer ED₅₀ med liten eller ingen toksisitet. Doseringen kan variere innenfor dette
- 20 området avhengig av doseringsformen benyttet og ruten av administrasjon benyttet. For ethvert CD40-bindende middel anvendt i fremgangsmåten, kan den terapeutiske effektive dosen bli estimert til å begynne med fra cellekulturtester. En dose kan bli formulert i dyremodeller for å oppnå et sirkulerende plasmakonsentrasjonsområde som inkluderer IC₅₀ (dvs. konsentrasjonen av testforbindelsen som oppnår en halv-maksimal inhibering
- 25 av symptomer) som bestemt i cellekultur. Slik informasjon kan bli anvendt for mer presist å bestemme nyttige doser i mennesker. Nivåer i plasma kan bli målt ved for eksempel væskechromatografi med høy yteevne.

- Generelt er doseringen av et anti-CD40-antistoff eller CD40-bindende middel
- 30 administrert til en pasient med en immunologisk lidelse eller CD40-uttrykkende cancer vanligvis omtrent 0,1 mg/kg til omtrent 100 mg/kg av individets kroppsvekt. Dosen administrert til et individ er omtrent 0,1 mg/kg til omtrent 50 mg/kg, omtrent 1 mg/kg til omtrent 30 mg/kg, omtrent 1 mg/kg til omtrent 20 mg/kg, omtrent 1 mg/kg til omtrent 15 mg/kg eller omtrent 1 mg/kg til omtrent 10 mg/kg av individets kroppsvekt.

Eksempel doser inkluderer, men er ikke begrenset til, fra 1 ng/kg til 100 mg/kg. I noen utførelsesformer er en dose omtrent 0,5 mg/kg, omtrent 1 mg/kg, omtrent 2 mg/kg, omtrent 3 mg/kg, omtrent 4 mg/kg, omtrent 5 mg/kg, omtrent 6 mg/kg, omtrent 7 mg/kg, omtrent 8 mg/kg, omtrent 9 mg/kg, omtrent 10 mg/kg, omtrent 11 mg/kg, omtrent 12 mg/kg, omtrent 13 mg/kg, omtrent 14 mg/kg, omtrent 15 mg/kg eller omtrent 16 mg/kg. Dosen kan bli administrert for eksempel daglig, en gang per uke (ukentlig), to ganger per uke, tre ganger per uke, fire ganger per uke, fem ganger per uke, seks ganger per uke, annen hver uke eller månedlig. I spesifikke utførelsesformer er dosen omtrent 0,5 mg/kg/uke, omtrent 1 mg/kg/uke, omtrent 2 mg/kg/uke, omtrent 3 mg/kg/uke, omtrent 4 mg/kg/uke, omtrent 5 mg/kg/uke, omtrent 6 mg/kg/uke, omtrent 7 mg/kg/uke, omtrent 8 mg/kg/uke, omtrent 9 mg/kg/uke, omtrent 10 mg/kg/uke, omtrent 11 mg/kg/uke, omtrent 12 mg/kg/uke, omtrent 13 mg/kg/uke, omtrent 14 mg/kg/uke, omtrent 15 mg/kg/uke eller omtrent 16 mg/kg/uke. I noen utførelsesformer er varierer dosen fra omtrent 1 mg/kg/uke til omtrent 15 mg/kg/uke.

I noen utførelsesformer kan de farmasøytiske sammensetningene omfattende det CD40-bindende midlet ytterligere omfatte et terapeutisk middel, enten konjugert eller ikke-konjugert til det bindende middel. Anti-CD40-antistoffet eller CD40-bindende midlet kan bli ko-administrert i kombinasjon med et eller flere terapeutiske midler for behandlingen eller forebyggingen av immunologiske lidelser eller CD40-uttrykkende cancere. For eksempel kan kombinasjonsterapi inkludere et cytostatisk, cytotoxisk eller immunundertrykkende middel. Kombinasjonsterapi kan også inkludere for eksempel administrasjon av et middel som målsøker en reseptor eller reseptorkompleks annet enn CD40 på overflaten av aktiverte lymfocytter, dendrittceller eller CD40-uttrykkende cancerceller. Et eksempel på et slikt middel inkluderer et annet, ikke-CD40-antistoff som binder til et molekyl ved overflaten av en aktivert lymfocytt, dendrittcelle eller CD40-uttrykkende cancercelle. Et annet eksempel inkluderer en ligand som målsøker en slik reseptor eller reseptorkompleks. Vanligvis binder et slikt antistoff eller ligand til en celle overflatereseptor på aktiverte lymfocytter, dendrittcelle eller CD40-uttrykkende cancer celle og forsterker den cytotoxiske eller cytostatiske effekten av anti-CD40-antistoffet ved å levere et cytostatisk eller cytotoxisk signal til den aktiverte lymfocytten, dendrittcellen eller CD40-uttrykkende cancercelle.

Slike kombinasjonsmessig administrasjon kan ha en additiv eller synergistisk effekt på sykdomsparametere (for eksempel kraftighet av et symptom, antallet av symptomer eller hyppighet av tilbakefall).

Med hensyn på terapeutiske regimer for kombinasjonsmessig administrasjon er i en spesifikk utførelsesform et anti-CD40-antistoff eller CD40-bindende middel administrert samtidig med et terapeutisk middel. I en annen spesifikk utførelsesform er det

5 terapeutiske middel administrert før eller etter administrasjon av anti-CD40-antistoffet eller det CD40-bindende middel, ved minst en time og opp til flere måneder, for eksempel minst en time, fem timer, 12 timer, en dag, en uke, en måned eller tre måneder, før eller etter administrasjon av anti-CD40-antistoffet eller det CD40-bindende middel.

- 10 Nyttige klasser av cytotoksiske eller immunundertrykkende midler inkluderer, for eksempel, antitubulinmidler, auristatiner (for eksempel MMAE eller MMAF), midler som binder mindre grop av DNA, DNA replikasjonsinhibitorer, alkyliserende midler (for eksempel platinakomplekser slik som *cis*-platin, mono(platina), bis(platina) og tri-nukleære platinakomplekser og karboplatin), antracykliner, antibiotika, antifolater,
- 15 antimetabolitter, kjemoterapisensibilisatorer, duokarmyciner, etoposider, fluorinerte pyrimidiner, ionoforer, leksitropsiner, nitrosoureaer, platinoler, pre-dannende forbindelser, purinantimetabolitter, puromyciner, strålingssensibilisatorer, steroider, taksaner, topoisomeraseinhibitorer, vinca alkaloider eller lignende.
- 20 Individuelle cytotoksiske eller immunundertrykkende midler inkluderer, for eksempel et androgen, antramycin (AMC), asparaginase, 5-azacytidin, azatioprin, bleomycin, busulfan, butioninsulfoksimin, kamptotecin, karboplatin, karmustin (BSNU), CC-1065, klorambucil, cisplatin, colchicin, cyklofosfamid, cytarabin, cytidinarabinosid, cytochalin B, dakarbazin, daktinomycin (tidligere aktinomycin), daunorubicin,
- 25 dekarbazin, docetaxel, doksorubicin, et østrogen, 5-fluordeoksyuridin, 5-fluoruracil, gramicidin D, hydroksyurea, idarubicin, ifosfamid, irinotekan, lomustin (CCNU), meklorethamin, melfalan, 6-merkaptopurin, metotreksat, mitramycin, mitomycin C, mitoksantren, nitroimidazol, paklitaxel, plicamycin, prokarbizin, streptozotocin, tenoposid, 6-tioguanin, tioTEPA, topotekan, vinblastin, vinkristin, vinorelbin, VP-16 og
- 30 VM-26.

I noen typiske utførelsesformer er det terapeutiske middel et cytotoksisk middel. Egnede cytotoksiske midler inkluderer for eksempel dolastatiner (for eksempel auristatin E, AFP, MMAF, MMAE, AEB eller AEVB), midler som binder mindre grop av DNA (for

35 eksempel enedinyr og leksitropsiner), duokarmyciner, taksaner (for eksempel paklitaxel og docetaxel), puromyciner, vinca alkaloider, CC-1065, SN-38, topotekan, morfolino-

doksorubicin, rhizoksin, cyanomorfolino-doksorubicin, echinomycin, kombretastatin, netropsin, epotilon A og B, estramustin, kryptofysiner, cemadotin, maytansinoider, diskodermolid, eleuterobin eller mitoksantron.

- 5 I noen utførelsesformer er det cytotoksiske middel et konvensjonelt kjemoterapeutika for eksempel doksorubicin, paklitaksel, melfalan, vinca alkaloider, metotreksat, mitomycin C eller etoposid. I tillegg kan potente midler slik som CC-1065 analoger, kalicheamicin, maytansin, analoger av dolastatin 10, rhizoksin og palytoksin bli forbundet til anti-CD40-antistoffene eller midlene derav.

10

- I spesifikke utførelsesformer er det cytotoksiske eller cytostatiske middel auristatin E (også kjent i fagfeltet som dolastatin-10) eller et derivat derav. Vanligvis er auristatin E derivatet for eksempel en ester dannet mellom auristatin E og en ketosyre. For eksempel kan auristatin E bli reagert med paraacetylbenzosyre eller benzoylvalersyre for å
- 15 produsere AEB og AEVB, henholdsvis. Andre typiske auristatinderivater inkluderer AFP, MMAF og MMAE. Syntesen og strukturen av auristatin E og dets derivater er beskrevet i for eksempel US Patentsøknadpublikasjoner nr. 2004-0157782 A1 og 2005-0238649; Internasjonal Patentsøknad Nr. PCT/US03/24209, Internasjonal Patentsøknad Nr. PCT/US02/13435, og US Patenter Nr. 6.884.869; 6.323.315; 6.239.104; 6.034.065;
- 20 5.780.588; 5.665.860; 5.663.149; 5.635.483; 5.599.902; 5.554.725; 5.530.097; 5.521.284; 5.504.191; 5.410.024; 5.138.036; 5.076.973; 4.986.988; 4.978.744; 4.879.278; 4.816.444; og 4.486.414.

- I spesifikke utførelsesformer er det cytotoksiske middel et middel som binder mindre
- 25 grop av DNA. (Se for eksempel US Patent Nr. 6.130.237.). I noen utførelsesformer er for eksempel midlet som binder mindre grop en CBI forbindelse. I andre utførelsesformer er midlet som binder mindre grop et enediyn (for eksempel kalicheamicin).

- Eksempler på anti-tubulinmidler inkluderer, men er ikke begrenset til, taksaner (for
- 30 eksempel Taxol® (paklitaksel), Taxotere® (docetaksel)), T67 (Tularik), vinca alkyloider (for eksempel vinkristin, vinblastin, vindesin og vinorelbin), og dolastatiner (for eksempel auristatin E, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB). Andre antitubulinmidler inkluderer for eksempel bakkatinderivater, taksananaloger (for eksempel epotilon A og B), nokodazol, kolchicin og kolcimid, estramustin, kryptofysiner, cemadotin,
- 35 maytansinoider, kombretastatiner, diskodermolid og eleuterobin.

I noen utførelsesformer er det cytotoksiske middel et maytansinoid, en annen gruppe av anti-tubulinmidler. I spesifikke utførelsesformer er for eksempel maytansinoidet maytansin eller DM-1 (ImmunoGen, Inc.; se også Chari et al., 1992, *Cancer Res.* 52:127-131).

5

I noen utførelsesformer er det terapeutiske middel ikke en radioisotop.

I noen utførelsesformer er det cytotoksiske eller immunundertrykkende middel en antimetabolitt. Antimetabolitten kan for eksempel være en purinantagonist (for eksempel azotioprin eller mykofenolatmofetil), en dihydrofolatreduktaseinhibitor (for eksempel metotreksat), acyklovir, gangcyklovir, zidovudin, vidarabin, ribavarin, azidotymidin, cytidinarabinosid, amantadin, dideoksyuridin, jododeoksyuridin, poskarnet eller trifluridin.

I andre utførelsesformer er det cytotoksiske eller immunundertrykkende middel takrolimus, cyklosporin eller rapamycin. I ytterligere utførelsesformer er det cytotoksiske middel aldesleukin, alemtuzumab, alitretinoin, allopurinol, altretamin, amifostin, anastrozol, arsenikktrioksid, beksaroten, beksaroten, kalusteren, kapecitabin, celekoksib, kladribin, Darbepoetin alfa, Denileukin diftitoks, deksrazoksan, dromostanolonpropionat, epirubicin, Epoetin alfa, estramustin, eksemestan, Filgrastim, floksuridin, fludarabin, fulvestrant, gemcitabin, gemtuzumab ozogamicin, goserelin, idarubicin, ifosfamid, imatinibmesylat, Interferon alfa-2a, irinotekan, letrozol, leukovorin, levamisol, mekloretoamin eller nitrogensennep, megestrol, mesna, metotreksat, metokssalen, mitomycin C, mitotan, nandrolenfenpropionat, oprelvekin, oksaliplatin, pamidronat, pegademase, pegaspargase, pegfilgrastim, pentostatin, pipobroman, plikamycin, porfimeronatrium, prokarbazin, quinakrin, rasburikase, revlimid, Sargramostim, streptozocin, tamoksifen, temozolomid, teniposid, testolakton, tioguanin, toremifen, Tositumomab, Trastuzumab, tretinoin, uracilsennep, valrubicin, vinblastin, vinkristin, vinorelbin og zoledronat.

30

I ytterligere utførelsesformer er medikamentet et humanisert anti-HER2 monoklonalt antistoff; RITUXAN (rituksimab; Genentech, Inc., South San Francisco, CA); et chimert anti-CD20 monoklonalt antistoff; OVAREX (AltaRex Corporation, MA); PANOREX (Glaxo Wellcome, NC; et murint IgG2a antistoff); Cetuximab Erbitux (Imclone Systems Inc., NY; et anti-EGFR IgG chimert antistoff); Vitaxin (MedImmune, Inc., MD); Campath I/H (Leukosite, MA; et humanisert IgG1 antistoff); Smart MI95 (Protein Design

35

Labs, Inc., CA; et humanisert anti-CD33 IgG antistoff); LymphoCide (Immunomedics, Inc., NJ; et humanisert anti-CD22 IgG antistoff); Smart ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA; et humanisert anti-HLA-DR antistoff); Oncolym (Techniclen, Inc., CA; et radio-merket murint anti-HLA-Dr10 antistoff); Allomune (BioTransplant, CA; et humanisert anti-CD2 mAb); Avastin (Genentech, Inc., CA; et anti-VEGF humanisert antistoff);
 5 Epratuzamab (Immunomedics, Inc., NJ og Amgen, CA; et anti-CD22 antistoff); og CESyree (Immunomedics, NJ; et humanisert anti-CEA antistoff).

Andre egnede antistoffer inkluderer, men er ikke begrenset til, antistoffer mot de
 10 følgende antigenene: CA125, CA15-3, CA19-9, L6, Lewis Y, Lewis X, alfa fetoprotein, CA 242, alkalisk fosfatase fra placenta, prostataspesifikt antigen, prostatinsyre fosfatase, epidermal vekstfaktor, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE -4, antitransferrinreseptor, p97, MUC1-KLH, CEA, gp100, MART1, Prostataspesifikt Antigen, IL-2 reseptor, CD20, CD52, CD33, CD22, humant koriongonadotropin, CD38, mucin, P21, MPG og Neu
 15 onkogen produkt.

I noen utførelsesformer er det terapeutiske middel et immunundertrykkende middel. Det immunundertrykkende middel kan for eksempel være gancyklovir, etanercept, takrolimus, cyklosporin, rapamycin, cyklofosfamid, azatioprin, mykofenolatmofetil eller
 20 metotreksat. Alternativt kan det immunundertrykkende middel for eksempel være et glukokortikoid (for eksempel kortisol eller aldosteron) eller en glukokortikoidanalog (for eksempel prednison eller deksametason).

Egnede cyklooksygenaseinhibitorer inkluderer meklofenaminsyre, mefenaminsyre,
 25 karprofen, diklofenak, diflunisal, fenbufen, fenoprofen, ibuprofen, indometacin, ketoprofen, nabumeton, naproksen, sulindak, tenoksikam, tolmetin og acetylsalicylsyre.

Egnede lipoksygenaseinhibitorer inkluderer redoksinhibitorer (for eksempel katekol butanderivater, nordihydroguaiaretinsyre (NDGA), masoprokol, fenidon, lanopalen,
 30 indazolinoner, nafazatrom, benzofuranol, alkylhydroksylamin), og ikke-redoksinhibitorer (for eksempel hydroksytiazoler, metoksyalkyltiazoler, benzopyraner og derivater derav, metoksytrahydropyran, boswellinsyrer og acetylte derivater av boswellinsyrer, og quinolinmetoksyfenyleddiksyre substituert med cykloalkylradikaler), og forløpere av redoksinhibitorer.

Andre egnede lipoksygenaseinhibitorer inkluderer antioksidanter (for eksempel fenoler, propylgallat, flavonoider og/eller naturlig forekommende substrater inneholdende flavonoider, hydroksylerte derivater av flavonene, flavonol, dihydroquercetin, luteolin, galangin, orobol, derivater av kalkon, 4,2',4'-trihydroksykalkon, orto-aminofenoler, N-
 5 hydroksyureaer, benzofuranoler, ebselen og arter som øker aktiviteten av de reduserende selenoenzymene), jernchelerende midler (for eksempel hydroksaminsyrer og derivater derav, N-hydroksyureaer, 2-benzyl-1-naftol, katekoler, hydroksylaminer, karnosol troloks C, katekol, naftol, sulfasalazin, zyleuton, 5-hydroksyantranilinsyre og 4-(omega-arylalkyl)fenylalkansyrer), imidazol-inneholdende forbindelser (for eksempel keto-
 10 konazol og itraconazol), fenotiaziner og benzopyranderivater.

Andre egnede lipoksygenaseinhibitorer inkluderer inhibitorer av eikosanoider (for eksempel oktadekatetraen, eikosatetraen, dokosapentaen, eikosaheksaen og dokosaheksaensyrer og estere derav, PGE1 (prostaglandin E1), PGA2 (prostaglandin
 15 A2), viprostol, 15-monohydroksyeikosatetraen, 15-monohydroksy-eikosatrien og 15-monohydroksyeikosapentaensyrer, og leukotriener B5, C5 og D5), forbindelser som interferer med kalsiumstrømmer, fenotiaziner, difenylbutylaminer, verapamil, fuskosid, kurkumin, klorogensyre, koffeinsyre, 5,8,11,14-eikosatetrayensyre (ETYA), hydroksyfenylretinamid, Ionapalen, eskulin, dietylkarbamazin, fenantrolin, baikalein,
 20 proksikromil, tioetere, diallylsulfid og di-(1-propenyl) sulfid.

Leukotrienreseptorantagonister inkluderer kalcitriol, ontazolast, Bayer Bay-x-1005, Ciba-Geigy CGS-25019C, ebselen, Leo Denmark ETH-615, Lilly LY-293111, Ono ONO-4057, Terumo TMK-688, Boehringer Ingelheim BI-RM-270, Lilly LY 213024, Lilly LY
 25 264086, Lilly LY 292728, Ono ONO LB457, Pfizer 105696, Perdue Frederick PF 10042, Rhen-Poulenc Rorer RP 66153, SmithKline Beecham SB-201146, SmithKline Beecham SB-201993, SmithKline Beecham SB-209247, Searle SC-53228, Sumitamo SM 15178, Amerikan Home Products WAY 121006, Bayer Bay-o-8276, Warner-Lambert CI-987, Warner-Lambert CI-987BPC-15LY 223982, Lilly LY 233569, Lilly LY-255283,
 30 Macrenx MNX-160, Merck og Co. MK-591, Merck og Co. MK-886, Ono ONO-LB-448, Purdue Frederick PF-5901, Rhen-Poulenc Rorer RG 14893, Rhen-Poulenc Rorer RP 66364, Rhen-Poulenc Rorer RP 69698, Shionoogi S-2474, Searle SC-41930, Searle SC-50505, Searle SC-51146, Searle SC-52798, SmithKline Beecham SKandF-104493, Leo Denmark SR-2566, Tanabe T-757 og Teijin TEI-1338.

Artikler for fremstilling

Det beskrives en artikkel for fremstilling inneholdende materialer nyttige for
 5 behandlingen av lidelsene beskrevet ovenfor inkludert. Artikkelen for fremstilling
 omfatter en beholder og et merke. Egnet beholdere inkluderer for eksempel flasker, rør,
 sprøyter og testrør. Beholderne kan bli formet fra et utvalg av materialer slik som glass
 eller plastikk. Beholderen holder en sammensetning som er effektiv for behandling av
 tilstanden og kan ha en steril adgangsport. For eksempel kan beholderen være en
 10 intravenøs løsningspose eller et rør som har en stopper som kan gjennomhules ved en
 hypodermisk injeksjonsnål. Det aktive midlet i sammensetningen er det humaniserte anti-
 CD40-antistoffet. Merket på eller assosiert med beholderen indikerer at sammen-
 setningen er benyttet for behandling av tilstanden av valg. Artikkelen for fremstilling kan
 ytterligere omfatte en andre beholder omfattende en farmasøytisk-akseptabel buffer, slik
 15 som fosfatbufret salt, Ringers løsning og dekstroseløsning. Den kan videre inkludere
 andre materialer ønskbare fra et kommersielt og brukerstandpunkt, inkluderende andre
 buffere, fortynningsmidler, fyllstoffer, nåler, sprøyter og pakningsvedlegg med
 instruksjoner for anvendelse.

ATCC deponeringer

En ATCC deponering av monoklonalt antistoff S2C6 ble gjort 25. mai 1999 i henhold til
 vilkårene av Budapest Traktaten på den internasjonale gjenkjenningen av avsetningen av
 mikroorganismer for formål av patentprosedyre. ATCC er lokalisert ved 10801
 25 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA. Denne ATCC avsetningen
 ble gitt et anbringingsnummer PTA-110. ATCC er lokalisert ved 10801 University
 Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA. Enhver deponering er gitt som en
 bekvemmelighet for fagpersoner og er ikke en innrømmelse om at en avsetning er
 nødvendig under 35 U.S.C. Avsnitt 112. Det beskrevet her skal ikke begrense
 30 rekkevidden ved antistoffet avsatt, siden den avsatte utførelsesformen er ment som en
 enkel illustrasjon av enkelte aspekter av oppfinnelsen og hvert antistoff som er
 funksjonelt ekvivalent er innenfor rekkevidden av denne oppfinnelsen. Avsetningen av
 materialet her utgjør ikke en innrømmelse om at den skrevne beskrivelsen som finnes her
 er utilstrekkelig til å muliggjøre praktiseringen av ethvert aspekt av oppfinnelsen,
 35 inkluderende den beste måten derav, og skal heller ikke bli oppfattet som å begrense
 rekkevidden av kravene til de spesifikke illustrasjonene som den representerer. Ulike

modifikasjoner av oppfinnelsen i tillegg til den vist og beskrevet her vil virkelig være tydelig for fagpersoner fra den foregående beskrivelsen og faller innenfor rekkevidden av de vedlagte kravene.

- 5 Oppfinnelsen er videre beskrevet i de følgende eksemplene, som ikke er ment til å begrense rekkevidden av oppfinnelsen. Cellelinjer beskrevet i de følgende eksemplene ble opprettholdt i kultur i henhold til forholdene spesifisert ved Amerikan Type Culture Collection (ATCC) eller Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany (DMSZ). Celledyrkningsreagenser ble oppnådd fra
10 Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA).

EKSEMPLER

15 *Eksempel 1: Produksjon av humanisert anti-CD40-antistoff*

Et humanisert anti-CD40-antistoff ble konstruert generelt ved å importere CDReNe av det murine anti-CD40-donorantistoffet i et humant mottakerantistoff. Donorantistoffet var det murine monoklonale antistoffet S2C6, beskrevet i US Patent Nr. 6.838.261, og
20 demonstrerte å gi sterke, vekst-fremmende signaler til B-lymfocytter. Se for eksempel Paulie et. al., 2000, *J. Immunol.* 142:590. Konsensus-sekvenser av det humane undergruppe III tung kjede variable domenet (SEQ ID NO:2) og for det humane kappa undergruppe I lett kjede variabelt domene (SEQ ID NO:13) ble oppnådd, som generelt beskrevet i Carter et.al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285; US Patent Nr.
25 6.037.454, og US Patent Nr. 6.054.297 for å benyttes som de humane mottaker tung og lett kjede domene.

Fagmidet pEMX1, beskrevet i Cunningham et. al. (1989, *Science* 243:1330-1336), inneholder et DNA fragment kodende for det humane konsensus Kappa-undergruppe I
30 lett kjede variabelt domene og et konsensus humant undergruppe III tung kjede variabelt domene, og er en nyttig vektor for mutagenes så vel som for ekspresjon av F(ab)er i *E. coli*. DNA som koder for konsensus variable domener er funksjonelt forbundet til en alkalisk fosfatasepromoter og Shine-dalgarnosekvens, derivert fra et pUC119-basert plasmid, pAK2, som beskrevet i Carter et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285.
35 Et unikt SpeI restriksjonssete ble konstruert mellom polynukleotidene som koder for

F(ab) lett og tung kjede variable domenene. pEMX1 ble konstruert og benyttet i fremstilling av de humaniserte antistoffene beskrevet her.

En første humanisert mAb S2C6 F(ab), referert til som sgn-0, ble konstruert ved å importere CDRene av det murine antistoffet i de humane konsensus sekvens rammeverks regionene ved sete-rettet mutagenese. Mutagenese ble utført generelt i henhold til fremgangsmåtene beskrevet i Kunkel, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488. De resulterende aminosyresekvensene av de humaniserte F(ab) molekyl (sgn-0) tung og lett kjede variable domenene er vist i Tabell 2 (SEQ ID NO:3 og SEQ ID NO:14, henholdsvis), og er sammenlignet med dem av donorantistoffet, murint monoklonalt antistoff S2C6 (mMAb S2C6, også referert til her som SGN-14; SEQ ID NO:1 og SEQ ID NO:12, henholdsvis), og med dem av de humane konsensus sekvens mottaker antistoffene, HuV_H III og HuV_LK I (SEQ ID NO:2 og SEQ ID NO:13, henholdsvis).

Plasmider ble transformert inn i *E. coli* stamme XL-1 Blue (Strataene, San Diego, CA) for fremstilling av et dobbelt- og enkelt-trådet DNA. Hvert av de lett kjede og tung kjede variable domenene var fullstendig sekvensert ved å benytte dideoksynukleotidmetoden (Sequenase, U.S. Biochemical Corp.). Plasmider ble transformert inn i *E. coli* stamme 16C9, et derivat av MM294, platet på LB plater inneholdende 5 µg/ml karbenicillin, og en enkel koloni ble valgt for proteinekspresjon. 5 ml kulturen ble tilsatt til 500 ml AP5-100 µg/ml karbenicillin og tillatt å vokse i 16 timer i en 4 L avledet rysteflaske ved 37°C. APS medium besto av 1,5 g glukose, 11,0 g Hycase SF, 0,6 g gjærekstrakt (sertifisert), 0,19 g MgSO₄ (vannfritt), 1,07 g NH₄Cl, 3,73 g KCl, 1,2 g NaCl, 120 ml 1M trietanolamin, pH 7,4, til 1 L vann og så sterilfiltrert gjennom 0,1 µm Sealkeen filter.

Celler ble høstet ved sentrifugering i en 1L sentrifugeflaske (Nalgene) ved 3000X g, og supernatanten fjernet. Etter frysing i 1 time ble pelleten resuspendert i 25 ml kald 10 mM MES, 10 mM EDTA, pH 5,0 (buffer A). 250 µl av 0,1 M PMSF (Sigma) ble tilsatt for å inhibere proteolyse og 3,5 ml av stock 10 mg/ml hønseeggwhite lysozym (Sigma) ble tilsatt for å hjelpe å lysere den bakterielle celleveggen. Etter forsiktig rysting på is i 1 time ble prøven sentrifugert ved 40.000X g i 15 minutter. Supernatanten ble brakt til 50 ml med buffer A og lastet på en 2 ml DEAE kolonne ekvilibrert med buffer A. Det som strømmet gjennom ble så tilført til en protein G-Sepharose CL-4B kolonne (Pharmacia) (0,5 ml lagvolum) ekvilibrert med buffer A. Kolonnen ble vasket med 10 ml buffer A og eluert med 3 ml 0,3 M glycine, pH 3,0, i 1,25 ml av 1M TRIS, pH 8,0. F(ab) ble så buffer vekslet til PBS ved å benytte et Centricon-30 filter (Amicon) og konsentrert til et slutt

volum på 0,5 ml. SDS PAGE geler av F(ab) ble kjørt for å sikre renhet og den molekulære vekten ble verifisert ved elektropraymassespektrometri.

- 5 Det humaniserte antistoffet, sgn-0, demonstrerte en signifikant forminsket bindings-affinitet for CD40-immobilisert på mikrotiterplater, sammenlignet med den av det murine moderantistoffet.

70

Tabell 2

Variabel Tung		10	20	30	40	50
5	SGN-14	EVQLQQSGPD	LVKPGASVKI	SCKAS <u>SGYSFT</u>	GY ^Y IHWVKQS	HGKSLEWIGR
	sgn-0	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAAS <u>SGYSFT</u>	GY ^Y IHWVRQA	PGKGLEWVAR
	HumVHIII	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAAS <u>SGFTFS</u>	SYAMSWVRQA	PGKGLEWVAV
CDR-H1						
		60	70	80	90	
10	100					
	SGN-14	<u>VIPNNGGTSY</u>	NQKFKGKAIL	TVDKSSSTAY	MELRSLTSED	SAVYYCAREG
	sgn-0	<u>VIPNNGGTSY</u>	NQKFKG ^R FTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAREG
	HumVHIII	<u>ISGDGGSTYY</u>	ADSVKG ^R FTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARG ^R
CDR-H2						
15	110					
	SGN-14	<u>I---</u>	YWWGHG	TTLTVS		
	sgn-0	<u>I---</u>	YWWGQG	TLTVS		
	HumVHIII	<u>GGGSDY</u>	WGQG	TLTVS		
CDR-H3						
20						
Variabel Lett		10	20	30	40	50
25	SGN-14	DVVVTQTPLS	LPVSLGAQAS	ISCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YLQKPGQSPK
	sgn-0	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK
	HumKI	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASQ ^S SIS	NYL-----AW	YQQKPGKAPK
CDR-L1						
		60	70	80	90	100
30	SGN-14	LLIYTVSNRF	<u>SGVPDR</u> FSGS	SGGTDFTLKI	SRVEAEDLGV	YFCSQ ^T THVP
	sgn-0	LLIYTVSNRF	<u>SGVPSR</u> FSGS	SGGTDFTLTI	SSLQPEDFAT	YYCSQ ^T THVP
	HumKI	LLIYAASSLE	<u>SGVPSR</u> FSGS	SGGTDFTLTI	SSLQPEDFAT	YYCQ ^Q YNSLP
CDR-L2						CDR-L3
		110				
35	SGN-14	<u>WIFGGG</u> TKLE	IQR			
	sgn-0	<u>WIFGQG</u> TKVE	IKR			
	HumKI	<u>WIFGQG</u> TKVE	IKR			

Eksempel 2: Fremstilling av humaniserte anti-CD40-antistoffvarianter

En serie av mutasjoner ble gjort på det humaniserte templatantistoffet, sgn-0, preparert som beskrevet i Eksempel 1. Spesifikke mutasjoner ble gjort til DNAet som koder for de lett og tung kjede variable domeneene av sgn-0 ved sete-rettet mutagenese, og sekvensene av variantene produsert fra templatmolekylet er listet opp nedenfor i Tabellene 3 og 4.

Antistoffer konstruert ved å benytte disse variantene av lett og tung kjede variable domener ble analysert for bindingsaktivitet. Hvert antistoff ble fortynnet til ekvivalente konsentrasjoner, og så seriefortynnet. De fortynnede antistoffene ble testet for binding til CD40-immobilisert på mikrottestplater. Data for affinitetsbinding for antistoffvariantene er vist nedenfor i Tabell 5. Antistoffer som viser bindingsaktivitet som nærmer seg den av det murine moderantistoffet var sgn-14, sgn-18, sgn-19, sgn-22, sgn-23, sgn-26 og sgn-27, med varianter sgn-14, sgn-18, sgn-26 og sgn-27 som enda mer nærmer seg den av det murine moderantistoffet, SGN-14, og variant sgn-26 som viser den beste yteevnen i disse testene.

Tabell 3

		Tung Kjede Variabelt Domene			
Ab/SEQ ID NO	10	20	30	40	
sgn-0/3	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
sgn-1/4	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
sgn-2/5	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
sgn-4/6	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
sgn-14/7	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
sgn-15/8	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
sgn-16/9	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
sgn-17/6	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
sgn-18/6	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
sgn-19/7	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
sgn-22/10	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
sgn-23/11	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
sgn-26/10	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
sgn-27/11	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
CDR-H1					

72

		60	70	80	90	100
	sgn-0/3	<u>VIPNNGGTSY</u>	<u>NQKFKG</u> RFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARE <u>G</u>
	sgn-1/4	<u>VIPNNGGTSY</u>	<u>NQKFKG</u> RFTI	S VDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARE <u>G</u>
5	sgn-2/5	<u>VIPNNGGTSY</u>	<u>NQKFKG</u> RFTI	SRD K SKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARE <u>G</u>
	sgn-4/6	<u>VIPNNGGTSY</u>	<u>NQKFKG</u> R ATL	S VDNSKNT A Y	LQMNSLRAED	TAVYYCARE <u>G</u>
	sgn-14/7	<u>VIPNNGGTSY</u>	<u>NQKFKG</u> RFT L	S VDNSKNT A Y	LQMNSLRAED	TAVYYCARE <u>G</u>
	sgn-15/8	<u>VIPNNGGTSY</u>	<u>NQKFKG</u> R ATI	S VDNSKNT A Y	LQMNSLRAED	TAVYYCARE <u>G</u>
	sgn-16/9	<u>VIPNNGGTSY</u>	<u>NQKFKG</u> R ATL	S VDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARE <u>G</u>
10	sgn-17/6	<u>VIPNNGGTSY</u>	<u>NQKFKG</u> R ATL	S VDNSKNT A Y	LQMNSLRAED	TAVYYCARE <u>G</u>
	sgn-18/6	<u>VIPNNGGTSY</u>	<u>NQKFKG</u> R ATL	S VDNSKNT A Y	LQMNSLRAED	TAVYYCARE <u>G</u>
	sgn-19/7	<u>VIPNNGGTSY</u>	<u>NQKFKG</u> RFT L	S VDNSKNT A Y	LQMNSLRAED	TAVYYCARE <u>G</u>
	sgn-22/10	<u>VIPNAGGTSY</u>	<u>NQKFKG</u> RFT L	S VDNSKNT A Y	LQMNSLRAED	TAVYYCARE <u>G</u>
	sgn-23/11	<u>VIPNQGGTSY</u>	<u>NQKFKG</u> RFT L	S VDNSKNT A Y	LQMNSLRAED	TAVYYCARE <u>G</u>
15	sgn-26/10	<u>VIPNAGGTSY</u>	<u>NQKFKG</u> RFT L	S VDNSKNT A Y	LQMNSLRAED	TAVYYCARE <u>G</u>
	sgn-27/11	<u>VIPNQGGTSY</u>	<u>NQKFKG</u> RFT L	S VDNSKNT A Y	LQMNSLRAED	TAVYYCARE <u>G</u>

CDR-H2

		110
20	sgn-0/3	<u>I---</u> <u>YWWGQG</u> TLV TVS
	sgn-1/4	<u>I---</u> <u>YWWGQG</u> TLV TVS
	sgn-2/5	<u>I---</u> <u>YWWGQG</u> TLV TVS
	sgn-4/6	<u>I---</u> <u>YWWGQG</u> TLV TVS
	sgn-14/7	<u>I---</u> <u>YWWGQG</u> TLV TVS
25	sgn-15/8	<u>I---</u> <u>YWWGQG</u> TLV TVS
	sgn-16/9	<u>I---</u> <u>YWWGQG</u> TLV TVS
	sgn-17/6	<u>I---</u> <u>YWWGQG</u> TLV TVS
	sgn-18/6	<u>I---</u> <u>YWWGQG</u> TLV TVS
	sgn-19/7	<u>I---</u> <u>YWWGQG</u> TLV TVS
30	sgn-22/10	<u>I---</u> <u>YWWGQG</u> TLV TVS
	sgn-23/11	<u>I---</u> <u>YWWGQG</u> TLV TVS
	sgn-26/10	<u>I---</u> <u>YWWGQG</u> TLV TVS
	sgn-27/11	<u>I---</u> <u>YWWGQG</u> TLV TVS

CDR-H3

35

Tabell 4

Lett Kjede Variabelt Domene

Ab/SEQ ID NO	10	20	30	40	50
sgn-0/14	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK
sgn-1/14	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK
5 sgn-2/14	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK
sgn-4/14	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK
sgn-14/14	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK
sgn-15/14	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK
sgn-16/14	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK
10 sgn-17/15	DVQVTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK
sgn-18/16	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK
sgn-19/16	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK
sgn-22/14	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK
sgn-23/14	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK
15 sgn-26/16	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK
sgn-27/16	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK

CDR-L1

	60	70	80	90
20 100				
sgn-0/14	LLIYTVSNRF	SGVPSRFSGS	SGTDFTLTI	SSLQPEDFAT YYCSQTTHVP
sgn-1/14	LLIYTVSNRF	SGVPSRFSGS	SGTDFTLTI	SSLQPEDFAT YYCSQTTHVP
sgn-2/14	LLIYTVSNRF	SGVPSRFSGS	SGTDFTLTI	SSLQPEDFAT YYCSQTTHVP
sgn-4/14	LLIYTVSNRF	SGVPSRFSGS	SGTDFTLTI	SSLQPEDFAT YYCSQTTHVP
25 sgn-14/14	LLIYTVSNRF	SGVPSRFSGS	SGTDFTLTI	SSLQPEDFAT YYCSQTTHVP
sgn-15/14	LLIYTVSNRF	SGVPSRFSGS	SGTDFTLTI	SSLQPEDFAT YYCSQTTHVP
sgn-16/14	LLIYTVSNRF	SGVPSRFSGS	SGTDFTLTI	SSLQPEDFAT YYCSQTTHVP
sgn-17/15	LLIYTVSNRF	SGVPSRFSGS	SGTDFTLTI	SSLQPEDFAT YYCSQTTHVP
sgn-18/16	LLIYTVSNRF	SGVPSRFSGS	SGTDFTLTI	SSLQPEDFAT YFCSQTTHVP
30 sgn-19/16	LLIYTVSNRF	SGVPSRFSGS	SGTDFTLTI	SSLQPEDFAT YFCSQTTHVP
sgn-22/14	LLIYTVSNRF	SGVPSRFSGS	SGTDFTLTI	SSLQPEDFAT YYCSQTTHVP
sgn-23/14	LLIYTVSNRF	SGVPSRFSGS	SGTDFTLTI	SSLQPEDFAT YYCSQTTHVP
sgn-26/16	LLIYTVSNRF	SGVPSRFSGS	SGTDFTLTI	SSLQPEDFAT YFCSQTTHVP
sgn-27/16	LLIYTVSNRF	SGVPSRFSGS	SGTDFTLTI	SSLQPEDFAT YFCSQTTHVP

CDR-L2

CDR-L3

110

	sgn-0/14	<u>W</u> TFGQGTKVE IKR
	sgn-1/14	<u>W</u> TFGQGTKVE IKR
	sgn-2/14	<u>W</u> TFGQGTKVE IKR
5	sgn-4/14	<u>W</u> TFGQGTKVE IKR
	sgn-14/14	<u>W</u> TFGQGTKVE IKR
	sgn-15/14	<u>W</u> TFGQGTKVE IKR
	sgn-16/14	<u>W</u> TFGQGTKVE IKR
	sgn-17/15	<u>W</u> TFGQGTKVE IKR
10	sgn-18/16	<u>W</u> TFGQGTKVE IKR
	sgn-19/16	<u>W</u> TFGQGTKVE IKR
	sgn-22/14	<u>W</u> TFGQGTKVE IKR
	sgn-23/14	<u>W</u> TFGQGTKVE IKR
	sgn-26/16	<u>W</u> TFGQGTKVE IKR
15	sgn-27/16	<u>W</u> TFGQGTKVE IKR

Tabell 5

Antistoff	Tung Kjede Variabelt Domene	Lett Kjede Variabelt Domene	Bindings- data 1	Bindings- data 2	Bindings- data 3
SGN-14	SEQ ID NO: 1 Donor	SEQ ID NO: 12 Donor	1,00	1,33	1,16
hu sgn-0	SEQ ID NO: 3 Templat	SEQ ID NO: 14 Templat	75,31	75,31	-
hu sgn-1	SEQ ID NO: 4 R72V	SEQ ID NO: 14 Templat	23,63	19,31	-
hu sgn-2	SEQ ID NO: 5 N74K	SEQ ID NO: 14 Templat	471,37	370,87	-
hu sgn-4	SEQ ID NO: 6 F68A I70L R72V L79A	SEQ ID NO: 14 Templat	2,23 1,83 3,12 1,41	2,46	-
hu sgn-14	SEQ ID NO: 7 I70L R72V L79A	SEQ ID NO: 14 Templat	1/11 0,86 0,77	0,69 0,77	-
hu sgn-15	SEQ ID NO: 8 F68A R72V L79A	SEQ ID NO: 14 Templat	10,54 4,67	2,71	-
hu sgn-16	SEQ ID NO: 9 F68A I69L R72V	SEQ ID NO: 14 Templat	44,00 9,78 7,99	1,82 1,83	-
hu sgn-17	SEQ ID NO: 6 F68A I70L R72V L79A	SEQ ID NO: 15 I2V M4V	3,60 1,76	3,56	-
hu sgn-18	SEQ ID NO: 6 F68A I70L R72V L79A	SEQ ID NO: 16 Y92F	0,96 0,67	1,03	
hu sgn-19	SEQ ID NO: 7 I70L R72V L79A	SEQ ID NO: 16 Y92F	0,481 1,06	0,501 0,98 0,92 1,14	-
hu sgn-22	SEQ ID NO: 10 N55A I70L R72V L79A	SEQ ID NO: 14 Templat	1,44 1,41 1,80	0,84	-

			0,93		
hu sgn-23	SEQ ID NO: 11 N55Q I70L R72V L79A	SEQ ID NO: 14 Templat	2,11 1,58 2,38 0,72	0,90	-
hu sgn-26	SEQ ID NO: 10 N55A I70L R72V L79A	SEQ ID NO: 16 Y92F	0,92 1,02 1,02 1,06	0,92	-
hu sgn-27	SEQ ID NO: 11 N55Q I70L R72V L79A	SEQ ID NO: 16 Y92F	1,04 1,03 0,94 0,83	1,40	-

Eksempel 3: *In Vitro* cytotoksisk aktivitet av humanisert anti-CD40-antistoff

CD40⁺ og CD138⁺⁺ humane multiple myelomcellelinjer, MM.1S, som er deksametason sensitive, og MM.1R, som er deksametasinresistente, så vel som nylig isolerte tumor-

5 celler (CD40⁺, CD138⁺⁺) fra to multiple myelompasienter, ble behandlet med økende konsentrasjoner (0-100 µg/ml) av humanisert S2C6 antistoff i 48 timer. DNA-syntese ble målt ved ³[H]-tymidinopptak. Resultatene indikerte at humanisert S2C6 antistoff ikke stimulerte proliferasjon av MM.1S, MM.1R, eller tumorcellene fra de to pasientene (p > 0,1).

10 For å videre definere den cytotoksiske effekten av humanisert S2C6 antistoff mot disse cellene, ble kulturer av MM.1S og MM.1R behandlet i 6 timer med humanisert S2C6 antistoff (10 µg/ml) og så ko-dyrket med *de novo* proteinsynteseinhibitoren cykloheksimid (0,2 µg/ml) i ytterligere 48 timer. Celleviabilitet ble testet ved å benytte

15 reduksjonen 3-(4,5-dimetyltiozol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid (MTT) som indikatoren. Behandling med humanisert S2C6 antistoff og cykloheksimid utløste 50-60% dreping av celler i begge cellelinjer, imens behandling med isotypekontroll Ig alene, med eller uten cykloheksimid, induserte ikke cytotoksitet. Det humaniserte S2C6 antistoffet utløste 20-30% cellecytotoksitet i de to pasienttumorcellekulturene, som ble

20 signifikant forsterket i nærværet av cykloheksimid ved en ikke-toksisk dose (0,2 µg/ml).

Eksempel 4: *Anti-tumoraktivitet av humanisert anti-CD40-antistoff*

Anti-tumoraktiviteten av det humaniserte anti-CD40-antistoffet ble testet i en SCID muse

25 lymfom xenografmodell. Fem millioner Ramos tumorceller ble injisert subkutan i SCID mus (10/gruppe) tretten dager før start av medikamentbehandling. Murint anti-CD40-antistoff eller humanisert S2C6 ble gitt intra-peritonalt 3 ganger per uke (4 mg/kg/dose) med 8 eller 5 doser administrert. Mus ble undersøkt for tumorvekst, og tumorvolum ble målt ukentlig under den 14 dager lange studieperioden. Resultatene i Fig. 2 viser en

30 nesten 9 ganger økning i veksten av tumorer i kontrollmus, mens over den samme perioden har tumorvekst i mus behandlet med enten murint anti-CD40-antistoff eller humanisert S2C6 neglisjerbar. Dataene demonstrerer at det humaniserte antistoffet var like effektivt som det murine anti-CD40-antistoffet i å undertrykke tumorvekst i denne B lymfomxenografmodellen.

Eksempel 5: Forlenget overlevelse ved humanisert anti-CD40-antistoff

Virkeevnen av det humaniserte anti-CD40-antistoffet på overlevelse av tumor-bærende mus ble bestemt i en SCID muselymfomxenografmodell. SCID mus (10/gruppe) ble
5 inokkulert intravenøst med en million Ramos tumorceller tre dager før antistoff-
behandling. Mus ble behandlet med murint eller humanisert anti-CD40-antistoff, eller en
Ig kontroll, adminstrert intraperitonalt to ganger per uke (4 mg/kg/dose) for en total på
fem doesr. Museburene ble undersøkt daglig for dødelighet. Resultatene vist i Fig. 3 viser
at ingen av musene behandlet med et kontrollantistoff overlevde ut over dag 34 etter
10 tumorinokkulering, imens ate av de ti musene behandlet med murint anti-CD40-antistoff
og alle ti musene behandlet med det humaniserte anti-CD40-antistoffet var fortsatt
levende til og med 90 dager etter tumorimplantering. Dataene demonstrerer at det
humaniserte antistoffet var like effektivt som det murine anti-CD40-antistoffet i å
forlenge overlevelse av SCID mus i denne B lymfomxenografmodellen.

P a t e n t k r a v

1.

Antistoff eller antigen-bindende fragment som spesifikt binder til human CD40,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et humanisert tung kjede
variabelt domene og et humanisert lett kjede variabelt domene, der det tung kjede
variable domene og det humaniserte lett kjede variable domene omfatter
aminosyresekvensene til henholdsvis SEQ ID NO:10 og SEQ ID NO:16.

10

2.

Antistoffet eller det antigen-bindende fragmentet ifølge krav 1, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at det ytterligere omfatter en human IgG konstant
region.

15

3.

Antistoffet eller det antigen-bindende fragmentet ifølge krav 2, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at isotypen av den IgG konstante regionen er IgG1,
IgG2, IgG3 eller IgG4.

20

4.

Antistoffet eller det antigen-bindende fragmentet ifølge krav 3, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at isotypen av den IgG konstante regionen er IgG1.

25

5.

Antistoffet eller det antigen-bindende fragmentet ifølge et hvilket som helst av kravene
1til 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at det ytterligere omfatter et lett
kjede konstant domene.

30

6.

Antistoffet eller det antigen-bindende fragmentet ifølge krav 5, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at det lett lett kjede konstante domenet er et kappa
konstant domene.

35

7.

Antistoffet ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at antistoffet ytterligere omfatter en human immunoglobulin konstant region.

5 8.

Antistoffet ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter tung kjede og lett kjede aminosyresekvensene presentert i henholdsvis SEQ ID NO:19 og SEQ ID NO:22.

10

9.

Antigen-bindende fragment ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at antistoff-fragmentet er en Fab, a Fab', a F(ab')₂, et Fv fragment, en diabody, et enkel-kjede antistoff, eller et scFv fragment.

15

10.

Antistoffet eller det antigen-bindende fragmentet ifølge et hvilket som helst av kravene 1-9, k a r a k t e r i s e r t v e d at det ytterligere omfatter et detekterbart merke.

20

11.

Antistoffet eller det antigen-bindende fragmentet ifølge et hvilket som helst av kravene 1-10, k a r a k t e r i s e r t v e d at det er isolert.

25 12.

Antistoffet eller det antigen-bindende fragmentet ifølge et hvilket som helst av kravene 1-11, k a r a k t e r i s e r t v e d at antistoffet eller det antigen-bindende fragmentet konkurrerer for binding med monoklonalt antistoff S2C6 som er sekretet av et hybridom som har ATTC anbringingsnr. PTA-110.

30

13.

35 Sett, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter i en beholder antistoffet eller det antigen bindende fragmentet ifølge et hvilket som helst av kravene

1-12, og eventuelt instruksjoner for å benytte antistoffet for å detektere CD40-protein i en biologisk prøve.

14.

- 5 Antistoffet eller det antigen-bindende fragmentet ifølge et hvilket som helst av kravene 1-12, k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes til et medikament.

15.

- 10 Antistoffet eller det antigen-bindende fragmentet ifølge krav 14, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at medikamentet er for behandling av CD40
uttrykkende cancer eller en immunologisk lidelse kjennetegnet ved uttrykk av CD40.

16.

- 15 Farmasøytisk sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den
omfatter:

- (i) antistoffet eller det antigen-bindende fragmentet ifølge et hvilket som helst av
kravene 1-12; og
- (ii) en farmasøytisk akseptabel tilsetning.

20

17.

Isolert polynukleotid, k a r a k t e r i s e r t v e d at
polynukleotidet koder for tung kjede variabelt domene aminosyresekvensen og/eller lett
kjede variabelt domene aminosyresekvensen av henholdsvis SEQ ID NO:10 og

- 25 SEQ ID NO:16.

SEQUENCE LISTING

<110> Genentech, Inc.

Seattle Genetics, Inc.

Leonard G. Presta

Lori Y. O'Connell

Doronina, Svetlana

<120> Humanized Anti-CD40 Antibodies and Methods of Use

<130> Hu CD40

<150> US 60/684,853

<151> 2005-05-26

<160> 22

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 113

<212> PRT

<213> MusMusculus

<400> 1

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Val Ile Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly His Gly Thr Thr Leu Thr Val
 100 105 110

Ser

<210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 2

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Arg Gly Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser
 115

<210> 3
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 3

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser

<210> 4
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 4

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65		70		75		80									
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	

Ala	Arg	Glu	Gly	Ile	Tyr	Trp	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
		100						105					110		

Ser

<210> 5
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 5

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

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

Tyr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40						45		

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser

<210> 6

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 6

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Val Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser

<210> 7

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 7

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser

<210> 8

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 8

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Val Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ser

<400> 9

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser

<210> 10
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 10

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser

<210> 11
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 11

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser

<210> 12
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> MusMusculus

<400> 12

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

Ala Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Phe Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Thr
 85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gln
 100 105 110

Arg

<210> 13
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 13

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gln Arg
 100 105

<210> 14

<211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 14

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ser Gln Thr
 85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 15
 <211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 15

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ser Gln Thr
 85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 16

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 16

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Ser Gln Thr
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 17

<211> 1392

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 17

```

atgggatggt catgtatcat cctttttcta gtagcaactg caactggagt acattcagaa      60

gttcagctgg tggagtctgg cgggtggcctg gtgcagccag ggggctcact ccgtttgtcc      120

tgtgcagctt ctggctacag cttcacccgtt tattacatcc actgggtccg tcaggccccg      180

ggtaagggcc tggaatgggt tgcaagggtt attcctaacg ccggcggtac cagttataac      240

cagaagttca agggccgttt cacattgagc gtcgacaatt ccaaaaacac agcatacctg      300

cagatgaaca gcctgcgtgc tgaggacact gccgtctatt attgtgctcg agaggggtatc      360

tactggtggg gtcaaggaac cctggtcacc gtctcctcgg cctccaccaa gggcccatcg      420

gtcttcccc tggcacccctc ctccaagagc acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc      480

ctgggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc      540

agcggcgtgc acaccttccc ggtgtccta cagtctcag gactctactc cctcagcagc      600

gtggtgactg tgccctctag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac      660

aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca aatcttgtga caaaactcac      720

acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggag cgtcagtctt cctcttcccc      780

ccaaaacca aggacacct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg      840

gacgtgagcc acgaagacct tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg      900

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc      960

gtcttcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggctctc      1020

aacaagccc tccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga      1080

gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggaagaga tgaccaagaa ccaggtcagc      1140

```

ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1200
 gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1260
 ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1320
 tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1380
 ccgggtaaat ga 1392

<210> 18
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 18

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

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

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

Thr Gly Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

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

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 115 120 125

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 145 150 155 160

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 165 170 175

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

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

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 210 215 220

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

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

260	265	270
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu		
275	280	285
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
290	295	300
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
305	310	315 320
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
325	330	335
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile		
340	345	350
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
355	360	365
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
370	375	380
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
385	390	395 400
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
405	410	415
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
420	425	430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 19

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 19

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

100	105	110
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser		
115	120	125
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys		
130	135	140
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu		
145	150	155
		160
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu		
165	170	175
Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr		
180	185	190
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val		
195	200	205
Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro		
210	215	220
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		
225	230	235
		240
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
245	250	255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe		
260	265	270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 20
 <211> 717
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 20
 atgggatggt catgtatcat cctttttcta gtagcaactg caaccggtgt acattcagat 60
 atccagatga ccagtcctcc gagtcctctg tccgcctctg tgggcgatag ggtcaccatc 120
 acctgcagat ccagtcaaag cttagtacat agcaatggta acactttcct ccactgggtat 180
 caacagaaac caggaaaagc tccgaaacta ctgatttaca ctgttagcaa ccggttctct 240
 ggagtcctct ctcgcttctc tggatccggt tctgggacgg atttcactct gaccatcagc 300
 agtctgcagc cagaagactt cgctacgtat ttctgtagtc agactactca tgttccatgg 360
 acatttggac agggtagcaa ggtggagatc aaacgaactg tggctgcacc atctgtcttc 420
 atcttccgcg catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cttctgttgt gtgcctgctg 480
 aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtgggaagg tggataacgc cctccaatcg 540
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600
 agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 660
 acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttaa 717

<210> 21
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 21

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 20 25 30

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60

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

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

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

Ser Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
 115 120 125

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

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn

165

170

175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 180 185 190

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

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

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

<210> 22
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 22

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Ser Gln Thr
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

[000258]

1/5

Variable Region
~~~~~

Leader Sequence  
~~~~~

1 M G W S C I I L F L V A T A T G V H S E V Q L V .
ATGGGATGGT CATGTATCAT CCTTTTCTA GTAGCAACTG CAACTGGAGT ACATTCAGAA GTTCAGCTGG
TACCCTACCA GTACATAGTA GGAAAAAGAT CATCGTTGAC GTTGACCTCA TGTAAGTCTT CAAGTCGACC

Variable Region
~~~~~

71 . E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G Y S .  
TGGAGTCTGG CGGTGGCCTG GTGCAGCCAG GGGGCTCACT CCGTTTGTCC TGTGCAGCTT CTGGCTACAG  
ACCTCAGACC GCCACCGGAC CACGTCGGTC CCCCAGTGA GGCAAACAGG ACACGTCGAA GACCGATGTC

Variable Region  
~~~~~

141 . F T G Y Y I H W V R Q A P G K G L E W V A R V
CTTCACCGGT TATTACATCC ACTGGGTCGG TCAGGCCCGG GGTAAAGGGC TGGAAATGGGT TGCAAGGGTT
GAAGTGGCCA ATAATGTAGG TGACCCAGGC AGTCGGGGC CCATTCGCGG ACCTTACCCA ACGTTCCTCAA

Variable Region
~~~~~

211 I P N A G G T S Y N Q K F K G R F T L S V D N S .  
ATTCTAAGC CCGGCGGTAC CAGTTATAAC CAGAAGTTCA AGGGCCGTTT CACATTGAGC GTCGACAATT  
TAAGGATTGC GGCCGCCATG GTCAATATTG GTCTTCAAGT TCCCGGCAA GTGTAAGTTC CAGCTGTATA

Variable Region  
~~~~~

281 . K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R .
CCAAAAACAC AGCATACCTG CAGATGAACA GCCTGCGTGC TGAGGACACT GCCGTCTATT ATTGTGCTCG
GGTTTTTGTG TCGTATGGAC GTCTACTTGT CGGACGCACG ACTCCTGTGA CGGCAGATAA TAACACGAGC

Human G1 Constant Region
~~~~~

Variable Region  
~~~~~

351 . E G I Y W W G Q G T L V T V S S A S T K G P S
AGAGGGTATC TACTGGTGGG GTCAAGGAAC CCTGGTCACC GTCTCCTCGG CCTCCACCAA GGGCCCATCG
TCTCCCATAG ATGACCACCC CAGTTCCTTG GGACCACTGG CAGAGGAGCC GGAGGTGGTT CCCGGGTAGC

Human G1 Constant Region
~~~~~

421 V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D .  
GTCTTCCCCC TGGCACCTTC CTCCAAGAGC ACCTCTGGGG GCACAGCGGC CCTGGGCTGC CTGGTCAAGG  
CAGAAGGGGG ACCGTGGGAG GAGGTCTCG TGGAGACCC CGTGTCGCCG GGACCCGACG GACCACTTC

Human G1 Constant Region  
~~~~~

491 . Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P .
ACTACTTCCC CGAACCGGTG ACGGTGTCGT GGAAGTCAGG CGCCCTGACC AGCGGCGTGC ACACCTTCCC
TGATGAAGGG GCTTGGCCAC TGCCACAGCA CCTTGAGTCC GCGGGACTGG TCGCCGCACG TGTGGAAGGG

Human G1 Constant Region
~~~~~

561 . A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G  
GGCTGTCTTA CAGTCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACTG TGCCCTCTAG CAGCTTGGGC  
CCGACAGGAT GTCAGGAGTC CTGAGATGAG GGAGTCGTGC CACCACTGAC ACGGGAGATC GTCGAACCCG

Human G1 Constant Region  
~~~~~

631 T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K .
ACCCAGACCT ACATCTGCAA CGTGAATCAC AAGCCAGCA ACACCAAGGT GGACAAGAAA GTTGAGCCCA
TGGGTCTGGA TGTAGACGTT GCACTTAGTG TTCGGGTCGT TGTGGTTCCA CCTGTTCTTT CAACTCGGGT

Figur 1A

2/5

Human G1 Constant Region

701 . S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F .
 AATCTTGTGA CAAAACTCAC ACATGCCCCAC CGTGCCCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGGAC CGTCAGTCTT
 TTAGAACACT GTTTTGAGTG TGTACGGGTG GCACGGGTG TGGACTTGAG GACCCCTG GCAGTCAGAA

Human G1 Constant Region

771 . L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V
 CCTCTTCCCC CCAAAACCCA AGGACACCCT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTCACATG CGTGGTGGTG
 GGAGAAGGGG GGTTTTGGGT TCCTGTGGGA GTACTAGAGG GCCTGGGGAC TCCAGTGTAC GCACCACCAC

Human G1 Constant Region

841 D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K .
 GACGTGAGCC ACGAAGACCC TGAGGTCAAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA
 CTGCACTCGG TGCTTCTGGG ACTCCAGTTC AAGTTGACCA TGCACCTGCC GCACCTCCAC GTATTACGGT

Human G1 Constant Region

911 . T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q .
 AGACAAAGCC GCGGGAGGAG CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC GTCCTCACCG TCCTGCACCA
 TCTGTTTCGG CGCCCTCCTC GTCATGTTGT CGTGCATGGC ACACCAGTCG CAGGAGTGGC AGGACGTGGT

Human G1 Constant Region

981 . D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K
 GGACTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA
 CCTGACCGAC TTACCGTTCC TCATGTTTAC GTTCCAGAGG TTGTTTCGGG AGGGTCGGGG GTAGTCTTT

Human G1 Constant Region

1051 T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M .
 ACCATCTCCA AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA GAACCACAGG TGTACACCCT GCCCCATCC CGGGAAGAGA
 TGGTAGAGGT TTCGGTTTCC CGTCGGGGCT CTTGGTGTCC ACATGTGGGA CGGGGGTAGG GCCCTTCTCT

Human G1 Constant Region

1121 . T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W .
 TGACCAAGAA CCAGGTCAGC CTGACCTGCC TGGTCAAAGG CTTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG
 ACTGGTTCTT GGTCCAGTCG GACTGGACGG ACCAGTTTCC GAAGATAGGG TCGCTGTAGC GGCACCTCAC

Human G1 Constant Region

1191 . E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F
 GGAGAGCAAT GGGCAGCCGG AGAACAATA CAAGACCACG CCTCCCGTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTTC
 CCTCTCGTTA CCCGTGGGCC TCTTGTGAT GTTCTGGTGC GGAGGGCAGC ACCTGAGGCT GCCGAGGAAG

Human G1 Constant Region

1261 F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M .
 TTCCTCTACA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA
 AAGGAGATGT CGTTCGAGTG GCACCTGTTT TCGTCCACCG TCGTCCCCTT GCAGAAGAGT ACGAGGCACT

Human G1 Constant Region

1331 . H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K *
 TGCATAGGC TCTGCACAAC CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCTGTCT CCGGGTAAAT GA
 ACGTACTCCG AGACGTGTTG GTGATGTGCG TCTTCTCGGA GAGGGACAGA GGCCATTGA CT

Figur 1B

3/5

Variable Region
~~~~~

Leader Sequence

1 M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D I Q M T .  
ATGGGATGGT CATGTATCAT CCTTTTCTA GTAGCAACTG CAACCGGTGT ACATTCAGAT ATCCAGATGA  
TACCCCTACCA GTACATAGTA GGAAAAAGAT CATCGTTGAC GTTGGCCACA TGTAAGTCTA TAGGTCTACT

Variable Region

71 . Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R S S Q S .  
CCCAGTCCCC GAGCTCCCTG TCCGCCTCTG TGGGCGATAG GGTCAACATC ACCTGCAGAT CCAGTCAAAG  
GGGTCAGGGG CTCGAGGGAC AGGCGGAGAC ACCCGCTATC CCAGTGGTAG TGGACGTCTA GGTCAGTTTC

Variable Region

141 . L V H S N G N T F L H W Y Q Q K P G K A P K L .  
CTTAGTACAT AGCAATGGTA ACACTTTCTT CCACTGGTAT CAACAGAAAC CAGGAAAAGC TCCGAAACTA  
GAATCATGTA TCGTTACCAT TGTGAAAGGA GGTGACCATA GTTGTCTTTG GTCCTTTTCG AGGCCTTTGAT

Variable Region

211 L I Y T V S N R F S G V P S R F S G S G S G T D .  
CTGATTTACA CTGTTAGCAA CCGGTTCTCT GGAGTCCCTT CTCGCTTCTC TGGATCCGGT TCTGGGACGG  
GACTAAATGT GACAATCGTT GGCCAAGAGA CCTCAGGGAA GAGCGAAGAG ACCTAGGCCA AGACCTTGCC

Variable Region

281 . F T L T I S S L Q P E D F A T Y F C S Q T T H .  
ATTTCACTCT GACCATCAGC AGTCTGCAGC CAGAAGACTT CGCTACGTAT TTCTGTAGTC AGACTACTCA  
TAAAGTGAGA CTGGTAGTCG TCAGACGTCG GTCTTCTGAA GCGATGCATA AAGACATCAG TCTGATGAGT

Human Kappa Constant Region  
~~~~~

Variable Region

351 . V P W T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F .
TGTTCCATGG ACATTGGAC AGGSTACCAA GGTGGAGATC AAACGAAGT TGGCTGCACC ATCTGTCTTC
ACAAGGTACC TGTAACCTG TCCCATGGTT CCACCTCTAG TTTGCTTGAC ACCGACGTGG TAGACAGAAG

Human Kappa Constant Region

421 I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y .
ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA TCTGGAAGT CTTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT
TAGAAGGGCG GTAGACTACT CGTCAACTTT AGACCTTGAC GAAGACAACA CACGACGAC TTATTGAAGA

Human Kappa Constant Region

491 . P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V .
ATCCAGAGA GGCCAAAGTA CAGTGGAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAAGTCCC AGGAGAGTGT
TAGGGTCTCT CCGGTTTCAT GTCACCTTCC ACCTATTGCG GGAGGTTAGC CCATTGAGGG TCCTCTCACA

Human Kappa Constant Region

561 . T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y .
CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC AGCACCCTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC
GTGTCTCGTC CTGTCTGTTCC TGTCGTGGAT GTCGGAGTCG TCGTGGGACT GCGACTCGTT TCGTCTGATG

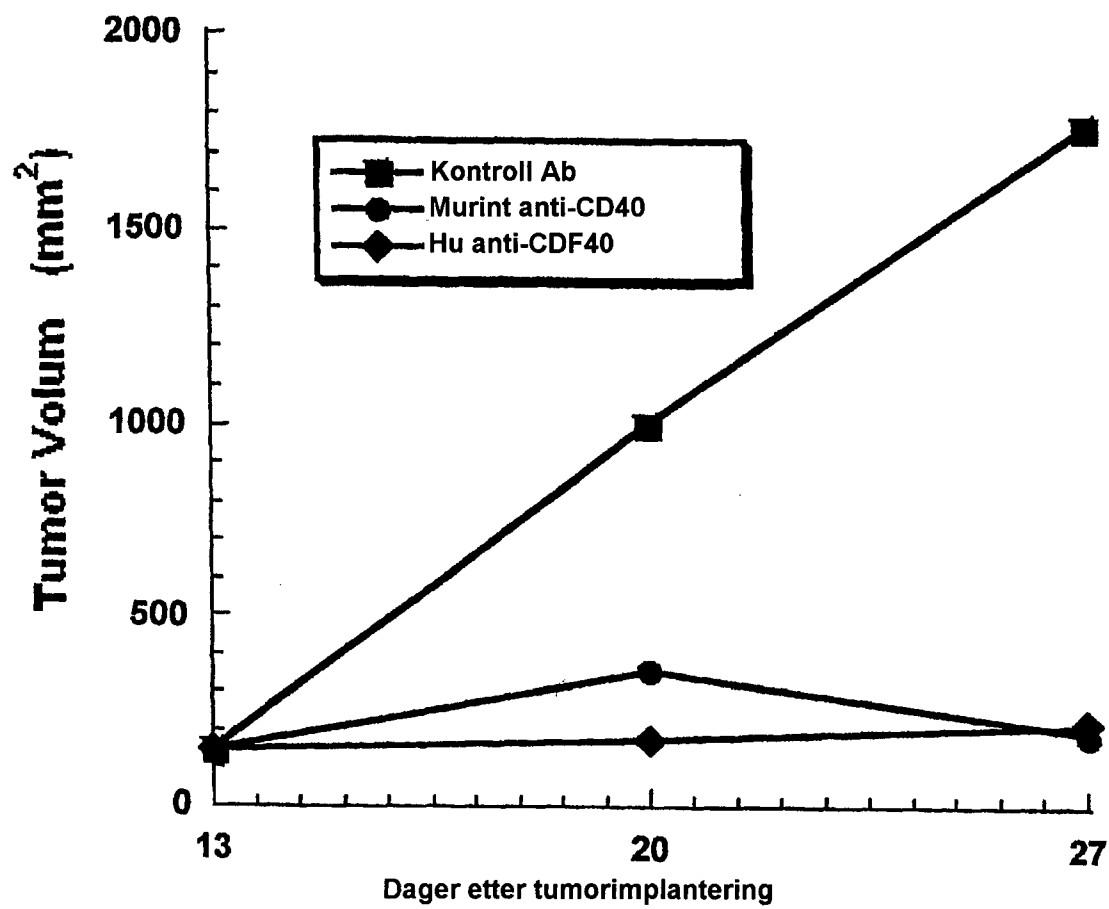
Human Kappa Constant Region

631 E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N .
GAGAAACACA AAGTCTACGC CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCGTCACA AAGAGCTTCA
CTCTTTGTGT TTCAGATGCG GACGCTTCAG TGGGTAGTCC CGGACTCGAG CGGGCAGTGT TTCTCGAAGT

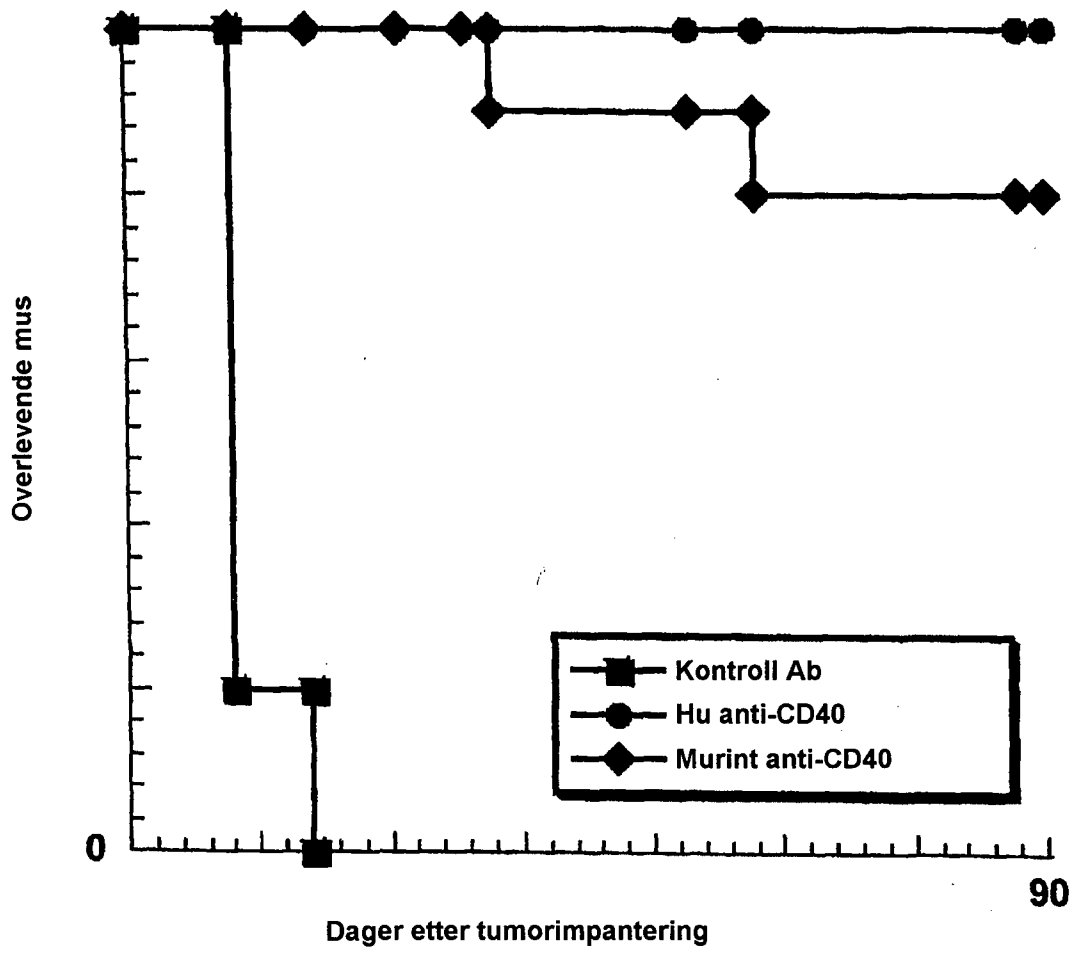
Human Kappa Constant Region

701 . R G E C *
ACAGGGGAGA GTGTTAA
TGTCCCTCT CACAATT

Figur 1C

**Figur 2**

5/5

**Figur 3**