



(12) PATENT

(19) NO

(11) 338143

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

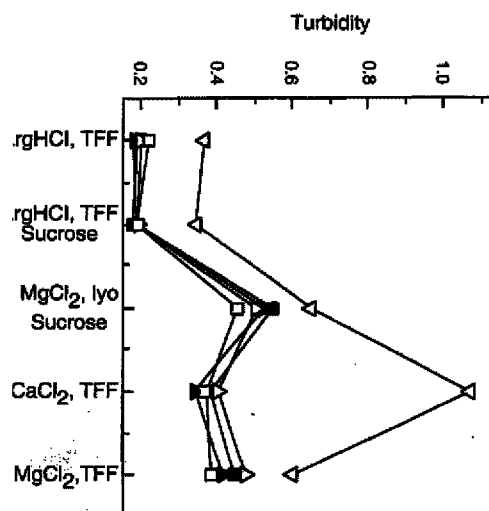
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 11/02 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 33/00 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 47/22 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
C07K 16/42 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20055202	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2004.03.29 PCT/US2004/009613
(22)	Inng.dag	2005.11.04	(85)	Videreføringsdag	2005.11.04
(24)	Løpedag	2004.03.29	(30)	Prioritet	2003.04.04, US, 60/460,659
(41)	Alm.tilgj	2005.11.04			
(45)	Meddelt	2016.08.01			
(73)	Innehaver	Genentech Inc., 1 DNA Way, US-CA94080-4990 SOUTH SAN FRANCISCO, USA Novartis AG, Lichtstrasse 35, CH-4056 BASEL, Sveits			
(72)	Oppfinner	Jun Liu, 1108 Glacier Avenue, US-CA94044 PACIFICA, USA Steven J Shire, 210 Sylvan Way, US-CA94062 EMERALD HILLS, USA			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Stabil, flytende formulering av anti-IgE-antistoff med lav turbiditet, fremstilt artikkel derav, og anvendelse derav til fremstilling av et medikament.
(56)	Anførte publikasjoner	WO 0230463 A2
(57)	Sammendrag	

Foreliggende patentsøknad gjelder svært konsentrerte antistoff og proteinutforminger med redusert viskositet som er stabile, relativt isotone og har lav turbiditet. Utformingene er spesielt egnede for subkutan tilførsel. Patentsøknaden beskriver videre fremstilte gjenstander som inneholder slike utforminger og fremgangsmåter for anvendelse av dem for behandling av forstyrrelser som kan behandles med det utformede antistoff eller protein. Utformingene omfatter arginin-HCl, histidin og polysorbat.



OPPFINNELSENS BAKGRUNN

Oppfinnelsens område

- 5 Foreliggende oppfinnelse gjelder høykonsentrerte formuleringer av antistoffer som er spesielt godt egnede for subkutan administrering. Oppfinnelsen tilveiebringer videre stabile, høykonsentrerte (f.eks. ≥ 100 mg/ml protein) flytende formuleringer.

Beskrivelse av teknikkens stand

- 10 Det foreligger et signifikant behov for høykonsentrerte, flytende antistoff-formuleringer. Høykonsentrerte proteinformuleringer byr imidlertid på flere problemer. Ett problem er ustabilitet grunnet dannelsen av partikler. Med rekonstituerte, frysetørkede sammensetninger for fremstilling av flytende formuleringer er dette problem blitt adressert ved anvendelse av overflateaktive midler (f.eks. et polysorbat), men overflateaktive midler
15 er uegnede for flytende sammensetninger, i og med at de gjør videre prosessering vanskelig. Dessuten reduserer overflateaktive midler i tillegg ikke den økte viskositeten som oppstår som et resultat av et stort antall intermolekylære interaksjoner fra den makromolekylære naturen til antistoffer.

- Selv om overflateaktive midler er blitt vist å signifikant redusere graden av
20 partikkeldannelse av proteiner, så adresserer de ikke problemet med økt viskositet, som gjør det vanskelig å manipulere og administrere konsentrerte antistoff-formuleringer. Antistoffer har en tendens til å danne viskøse løsninger ved høy konsentrasjon, fordi deres makromolekylære natur og potensialet for intermolekylære interaksjoner. Dessuten anvendes farmasøytisk aksepterbare sukkere ofte i store mengder som stabilisatorer. Slike
25 sukkere kan forsterke de intermolekylære interaksjonene og derved øke viskositeten til formuleringen. Svært viskøse formuleringer er vanskelig å fremstille, suge opp i en sprøyte og injisere subkutan. Anvendelse av kraft ved manipulering av de viskøse formuleringene fører til overdreven skumdannelse, noe som kan føre til denaturering og inaktivering av aktive biologiske forbindelser. En tilfredsstillende løsning på dette problem mangler.

- 30 Mens teknikkens stand indikerer tallrike eksempler på eksipienter som hensiktsmessig kan benyttes for fremstilling av farmasøytiske formuleringer så har svært få proteiner med suksess blitt formulert over 100 mg/ml, og heller ikke har teknikker for å gjøre det blitt beskrevet.

- Patentsøkerne har oppdaget at arginin, nærmere bestemt arginin-HCl, er spesielt
35 egnet for høykonsentrerte, flytende protein- eller antistoff-formuleringer.

Stabile, isotone, frysetørkede proteinformuleringer er beskrevet i PCT-publikasjonen WO97/04801, publisert 13. februar 1997. De beskrevne frysetørkede formuleringene kan rekonstitueres for å generere flytende formuleringer med høy proteinkonsentrasjon uten tilsynelatende tap av stabilitet. De mulige problemer assosiert med den høye viskositeten av

de rekonstituerte formuleringene adresseres imidlertid ikke. Protein aggregering har tidligere blitt redusert ved tilsetning av sukker, men å gjøre dette kan øke viskositeten og osmolariteten dramatisk, noe som gjør prosessering og anvendelse upraktisk.

Patentsøkernes PCT-patentsøknad, publikasjon WO02/30463, publisert 18. april 2002 beskriver formuleringer med høy proteinkonsentrasjon, men lav viskositet oppnådd: 1) ved lav pH (omtrent 4,0-5-3); 2) høy pH (omtrent 6,5-12-0) eller 3) økning av total ionestyrke i formuleringen ved tilsetning av salter eller buffere. Mens forhøyet ionestyrke reduserer viskositeten av formuleringen (slik som med NaCl) kan den imidlertid også resultere i økt turbiditet av løsningen, som ofte er assosiert med dannelse av proteinpartikler (f. eks. aggregering). En optimal formulering med høy proteinkonsentrasjon må således overvinne utfordringene med stabilitet, viskositet, osmolaritet og turbiditet.

Oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse gjelder høykonsentrerte formuleringer av anti-IgE antistoffet E25 som er stabile og med lav viskositet og turbiditet, som definert i kravene.

Den foreliggende beskrivelse vedrører høykonsentrerte antistoff-formuleringer med lav turbiditet som omfatter protein eller antistoff (100-260 mg/ml), histidin (10-100 mM), arginin-HCl (50-200 mM) og polysorbat (0,01%-0,1%) med en pH på 5,5-7,0, en viskositet på 50 cs eller mindre og en osmolaritet fra 200 mOsm/kg-450 mOsm/kg. Alternativt kan konsentrasjonen av antistoff i formuleringene variere fra 120-260 mg/ml, alternativt 150-260 mg/ml, alternativt 180-260 mg/ml, alternativt 200-260 mg/ml antistoff. Alternativt varierer osmolariteten fra 250 mOsm/kg - 350 mOsm/kg. Alternativt varierer konsentrasjonen av arginin HCl fra 100 - 200 mM, alternativt 150-200 mM, alternativt 180-200 mM.

Også beskrevet her er en høykonsentrert antistoff-formulering med lav turbiditet som omfatter antistoff (40-150 mg/ml), histidin (10-100 mM), sukker (f.eks. trehalose eller sukrose, 20-350 mM) og polysorbat (0,01 % - 0,1 %).

Beskrevet her er en formulering som inneholder høye konsentrasjoner av høymolekylære proteiner, som er antistoffer eller immunglobuliner. Antistoffene er rettet mot et bestemt forutbestemt antigen, som er antigenet IgE rhuMabE-25 beskrevet i U.S. patentskrift nr. 6 329 509 og WO99/01556.

Formuleringene ifølge foreliggende oppfinnelse kan være farmasøytiske formuleringer. I et spesifikt aspekt tilføres formuleringen subkutan.

I en utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen medisinsk anvendelse av formuleringene beskrevet her omfattende en terapeutisk effektiv mengde av antistoffet i profylaktisk eller terapeutisk behandling av en forstyrrelse som kan behandles med det formulerte antistoffet. Slike formuleringer er spesielt anvendbare for subkutan administrering. I et spesifikt aspekt er forstyrrelsen en IgE-mediert forstyrrelse. I nok et spesifikt aspekt er den IgE-medierte forstyrrelse allergisk rhinitt, astma (f.eks. allergisk

astma eller ikke-allergisk astma), atopisk dermatitt, allergisk gastroenteropati, hypersensitivitet (f.eks. anafylakse, urtikaria, matallergi osv.), allergisk bronkopulmonær aspergillose, parasitt sykdom, interstitiell cystikk, hyper-IgE-syndrom, ataksia-telagiektasia, Wiskott-Aldrich-syndromet, alymfoplasia tymica, IgE-myelom og graft-versus-host reaksjon.

I en utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen en fremstilt artikkel som omfatter en beholder som omslutter en formulering som beskrevet her. I ett aspekt er den fremstilte artikkelen en forhåndsfylt sprøyte. I nok et spesifikt aspekt inneholder den forhåndsfylt sprøyte ytterligere i en injeksjonsinnretning. I nok et spesifikt aspekt er injeksjonsinnretningen en autoinjektor.

Kort beskrivelse av figurene

Figur 1. Hydrofob interaksjonskromatografi av et pepsin spaltet anti-IgE monoklonalt antistoff. Prøver ble formulert ved forskjellige pH-verdier og buffere: (●) 20 mM acetat, (Δ) 20 mM suksinat, (▲) 20 mM Na₂HPO₄ (▽) 20 mM K₂PO₄ og (*) 20 mM Tris-buffer. Prøvene ble lagret ved 30°C i 6 måneder.

Figur 2. Størrelseseksklusjonskromatografi av et anti-IgE- monoklonalt antistoff lagret ved 40°C i 6 måneder. Prøver ble formulert ved forskjellige pH-verdier og buffere. (■) 20 mM glutamat, (●) 20 mM acetat, (Δ) 20 mM suksinat, (□) 20 mM histidin, (▲) 20 mM Na₂HPO₄, (▼) 20 mM K₂PO₄ og (*) 20 mM Tris-buffer.

Figur 3. Aktivitet av et anti-IgE monoklonalt antistoff lagret ved 30°C i 6 måneder. Prøver ble formulert ved forskjellige pH-verdier og buffere: (●) 20 mM acetat, (Δ) 20 mM suksinat, (□) 20 mM histidin, (▲) 20 mM Na₂HPO₄, (▼) 20 mM K₂PO₄ og (*) 20 mM Tris-buffer.

Figur 4. Virkningene av polysorbat 20 på turbiditeten av det stressede anti-IgE-monoklonale antistoffet. Prøver inneholder 100 mg/ml antistoff, 20 mM suksinat, 192 mM trehalose og forskjellige mengder av polysorbat 20 ved pH 6,0. Polysorbatkonsentrasjonene er (■) 0, (▲) 0,01 %, (●) 0,02% og (Δ) 0,05%.

Figur 5. Turbiditeten av et anti-IgE-monoklonalt antistoff ved ~150 mg/ml med forskjellige eksipienter (▲) CaCl₂, (▽) MgCl₂ og (Δ) arginin-HCl.

Figur 6. Turbiditeten av anti-IgE- monoklonalt antistoff ved ~150 mg/ml med forskjellige eksipienter. Prøver ble lagret ved (▲) -70°C, (■) 2-8°C, (Δ) 15°C, (□) 30°C og (▽) 40°C.

Figur 7. Hydrofob interaksjonskromatografisk analyse av papain spaltet anti-IgE-monoklonalt antistoff. Prøver ble formulert ved ~150 mg/ml med forskjellige eksipienter og lagret ved (▼) -70°C, (■) 2-8°C, (▲) 15°C, (Δ) 30°C og (□) 40°C.

Figur 8. Størrelseseksklusjonskromatografi av anti-IgE- monoklonalt antistoff ved ~150 mg/ml i (■) 200 mM arginin-HCl, 23 mM histidin, pH 6,0 (▲) 182 mM argininHCl, 20 mM histidin, pH 6,0, (●) 180 mM arginin-HCl, 20 mM histidin, 91 mM sukrose, pH 6,0 (□) 50

mM MgCl₂, 27 mg/ml trehalose, 0,01 % acetat, (Δ) 50 mM MgCl₂, 30 mM MgAc₂, 0,01% acetat og (○) 50 mM MgCl₂, 45 mM MgAc₂, 0,01% acetat. Prøver ble lagret ved 30°C i 6 måneder.

Figur 9. Hydrofob interaksjonskromatografisk analyse av papain spaltet anti-IgE-monoklonalt antistoff. Prøver ble formulert i (■) 200 mM arginin-HCl, 23 mM histidin, (▲) 182 mM arginin-HCl, 20 mM histidin, (●) 182 mM arginin-HCl, 20 mM histidin, 91 mM sukrose, (□) 50 mM MgCl₂, 27 mg/ml trehalose, 0,01% acetat, (Δ) 50 mM MgCl₂, 30 mM MgAc₂, 0,01% acetat og (○) 50 mM MgCl₂, 45 mM MgAc₂, 0,01% acetat. Prøver ble lagret ved 30°C i 6 måneder.

Figur 10. Viser en sammenligning mellom fullengdesekvensene til både variabel og konstant kjeder av anti-IgE-antistoffene E25, E26 og Hu-901. CDR-områdene i Hu-901 er vist ved understreking. For E25 og E26 er CDR-områdene som definert av Chothia vist med uthevet skrift, mens CDR-området som definert av Kabat er satt innenfor parenteser. Figur 10A viser den lette kjedens sekvenser i E25, E26 og Hu-901 (SEKV ID NR 1-3), mens Figur 10B viser den tunge kjedens sekvenser i E25, E26 og Hu-901 (SEKV ID NR 4-6).

Detaljert beskrivelse av den foretrukne utførelsesformen

1. Definisjoner

Med «protein» menes en sekvens av aminosyrer i hvilken kjedelengden er tilstrekkelig til å danne høyere nivåer av tertiær og/eller katernær struktur. På det viset skilles proteiner fra «peptider», som også er aminosyrebaserte molekyler, som ikke har slik struktur. Typisk vil et protein for anvendelse her ha en molekylvekt på minst omkring 15-20 kD, fortrinnsvis omtrent 20 kD.

Eksempler på proteiner som omfattes av definisjonen her inkluderer pattedyrproteiner som f.eks. veksthormon, inkludert humant veksthormon og veksthormon fra storfe, veksthormonfrigjørende faktor, parathyroidhormon, thyroidstimulerende hormon, lipoproteiner, α-1-antitrypsin, insulin A-kjede, insulin B-kjede, proinsulin, folikkelstimulerende hormon, kalcitonin, luteiniserende hormon, glukagon, koagulasjonsfaktorer slik som faktor VIIIC, faktor IX, vevsfaktor og von Willebrandts faktor, anti-koagulasjonsfaktorer som protein C, atrial natriuretisk faktor, lungesurfaktant, en plasminogenaktivator slik som urokinase eller vevstype plasminogenaktivator (t-P-A, f. eks. «Activase», «TNKase», «Retevase»), bombazin, trombin, tumor nekrosefaktor-α og β, enkefalinase, RANTES (regulert ved aktivering normalt T-celle uttrykt og utskilt), human makrofag inflammatorisk protein (MIP-1-α), serumalbumin, slik som humant serumalbumin, mullerian-inhiberende substans, relaksin A-kjede, relaksin B-kjede, prorelaksin, gonadotropinforbundet peptid fra mus, DNase, inhibin, aktivin, vaskulær endotelvekstfaktor (VEGF), reseptorer for hormoner eller vekstfaktorer, et integrin, protein A eller D, reumatoide faktorer, en neurotrofisk faktor, slik som beinavledet neurotrofisk faktor (BDNF), neurotrofin-3, -4, -5 eller -6 (NT-3, NT-4, NT-5 eller NT-6) eller en nervevekstfaktor som NGF-β, blodplateavledet vekstfaktor (PDGF),

en fibroblastvekstfaktor slik som aFGF og bFGF, epidermal vekstfaktor (EGF),
transformerende vekstfaktor (TGF) slik som TGF- α og TGF- β , inkludert TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 eller TGF- β 5, insulinlignende vekstfaktor-I og II (IGF-I og IGF-II), des (1-3)-IGF-I (IGF-1 fra hjerne), insulinlignende vekstfaktorbindende proteiner, CD-proteiner som CD3,
5 CD4, CD8, CD19 og CD20, erythropoietin (EPO), trombopoietin (TPO), osteoinduserende faktorer, immuntoksiner, et beinmorfogent protein (BMP), et interferon som interferon- α , - β og γ , kolonistimulerende faktorer (CSF'er), f.eks. M-CSF, GM-CSF og G-CSF, interleukiner (IL'er), f.eks. IL-1 til IL-10, superoksid-dismutase, T-cellerreseptorer, overflatemembran-proteiner, nedbrytningsakselerende faktor (DAF), et virus antigen slik som for eksempel en
10 del av AIDS-kappen, transportproteiner, «homing»-reseptorer, addressiner, regulatoriske proteiner, immunadhesiner, antistoffer og biologisk aktive fragmenter eller varianter av hvilke som helst av de ovenfor opplistede polypeptidene.

Proteinet som formuleres er fortrinnsvis i det vesentlige rent, og ønskelig i det vesentlige homogent (dvs. fritt for kontaminerende proteiner). «I det vesentlige rent»-
15 protein betyr en sammensetning som omfatter minst omkring 90 vekt-% av proteinet, basert på totalvekt til sammensetningen, fortrinnsvis minst omkring 95 vekt-%. «I det vesentlige homogent»-protein betyr en sammensetning som omfatter minst omkring 99 vekt-% av protein, basert på totalvekt til sammensetningen.

Som beskrevet her er proteinet et antistoff. Antistoff kan for eksempel binde seg til
20 hvilket som helst av de ovenfor nevnte molekylerne. Eksempler på molekyler må for antistoffer som omfattes av foreliggende oppfinnelse omfatter IgE, CD-proteinene, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34 og CD40, medlemmer av HER-reseptorfamilien slik som EGFreseptor, HER2-reseptor, HER3-reseptor eller HER4-reseptor, 2c4, 4D5, PSCA, LDP-2, celleadhesjonsmolekyler som LFA-1, Mac1, P150, 95, VLA-4, ICAM-1, VCAM og α v/ β 3-
25 integrin, inkludert α - og subenheter derav (f.eks. anti-CD11a-antistoff, anti-CD18-antistoff eller anti-CD11b-antistoff), vekstfaktorer som VEGF, blodgruppeantigener, flk2/flt3-reseptor, fedme (OB)-reseptor, *mpl*-reseptor, CTLA-4 og protein C.

Begrepet «antistoff» som anvendt her inkluderer monoklonale antistoffer (inkludert full lengde-antistoffer som har et immunglobulin-Fc-område), antistoffsammensetninger
30 med polyepitopisk spesifisitet, multispesifikke antistoffer (f.eks. bispesifikke antistoffer, diastoffer og enkelt-kjede molekyler, så vel som antistoff-fragmenter (f.eks. F(ab')₂ og Fv). Begrepet «immunglobulin» (Ig) anvendes her om hverandre med «antistoff».

Den basale, 4-kjedede antistoffenhet er et heterotetramerisk glykoprotein som består av 2 identiske lette kjeder (L)-kjeder og 2 identiske tunge kjeder (H)-kjeder. Et IgM-
35 antistoff består av 5 av den basale heterotetramerenhet sammen med et tilleggspolypeptid som betegnes en J-kjede, og inneholder 10 antigen-bindingssteder, mens IgA-antistoffer omfatter fra 2-5 av de basale, 4-kjedede enhetene som kan polymeriseres for å danne polyvalente sammenstillinger i kombinasjon med J-kjeden. I tilfelle av IgG'er er 4-kjede-enheten vanligvis omtrent 150000 dalton. Hver L-kjede er bundet til en H-kjede med én

kovalent disulfidbinding, mens de 2 H-kjedene er bundet til hverandre med én eller flere disulfidbindinger avhengig av H-kjede-isotypen. Hver H- og L-kjede har også jevnlig fordelte disulfidbroer innen kjeden. Hver H-kjede har i N-terminus et variabelt domene (V_H) fulgt av tre konstante domener (C_H) for hver av α - og γ -kjedene og fire C_H -domener for μ og ϵ -isotyper. Hver L-kjede har i N-terminus et variabelt domene (V_L), etterfulgt av et konstant domene i dens andre enden. V_L er sammenstilt med V_H , mens C_L er sammenstilt med det første konstante domenet i den tunge kjeden, (C_H). Spesielle aminosyrerester antas å danne et grensesnitt mellom den lette kjedens og den tunge kjedens variable domener. Parringen av en V_H og V_L sammen danner et enkelt antigen-bindingssete. For strukturen og egenskapene til de forskjellige klassene av antistoffer, se f.eks. *Basic and Clinical Immunology*, 8. utgave, Daniel P. Sties, Abba I. Terr og Tristram G. Parslow (red.) Appleton & Lange, Norwalk, CD, 1994, s 71 og kapittel 6.

L-kjeden fra enhver vertebrat art kan tilskrives én av to klart atskilte typer kalt kappa og lambda, basert på aminosyresekvensen i de konstante domener. Avhengig av aminosyresekvensen til det konstante domenet i den tunge kjeden kan immunglobuliner tilskrives to forskjellige klasser eller isotyper. Det finnes fem klasser av immunglobuliner: IgA, IgD, IgE, IgG og IgM, som har tunge kjeder betegnet α , δ , ϵ , γ henholdsvis μ . γ -klassen og μ -klassen er videre oppdelt i underklasser basert på relativt små forskjeller i CH-sekvensen og funksjonen, f.eks. uttrykker mennesker følgende subklasser: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 og IgA2.

Begrepet «varibel» viser til det faktum at visse segmenter i de variable domenene varierer mye i sekvens blant antistoffer. V-domenet formidler antigenbinding og definerer spesifisiteten av et bestemt antistoff for dets spesielle antigen. Imidlertid er ikke variabiliteten jevnt fordelt over hele lengden av de variable domenene. I stedet består V-områdene av relativt ikke-variable strekk som betegnes rammeverksområder (FR'er), på omtrent 15-30 aminosyrerester, separert av kortere områder med ekstrem variabilitet betegnet «hypervariable områder», eller av og til «komplementaritetsbestemmende områder» (CDR'er), som hver er omtrent 9-12 aminosyrerester i lengde. De variable domenene i native tunge og lette kjeder omfatter hver fire FR'er, som stort sett inntar en β -plate-konfigurasjon, sammenbundet av tre hypervariable områder, som danner løkker som sammenbinder og i noen tilfeller danner en del av β -platestrukturen. De hypervariable områdene i hver kjede holdes sammen i umiddelbar nærhet av FR'ene, og bidrar sammen med de hypervariable områdene fra den andre kjeden til dannelsen av antigen-bindingssete av antistoffer (se Kabal *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5. utgave, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991). De konstante domenene er ikke involvert direkte i binding av et antistoff til et antigen, men utviser diverse effektorfunksjoner slik som deltakelse i antistoffavhengig cellulær cytotoxicitet (ADCC).

Begrepet «hypervariabelt område (også betegnet som «komplementaritetsbestemmende område» eller CDR'er) viser, når anvendt her, til aminosyrerestene i et antistoff, vanligvis tre eller fire korte områder med ekstrem sekvensvariabilitet), inne i V-område domenet i et immunglobulin som danner antigen-bindingssetet, og er de viktigste determinanter for antigenspesifisitet. Det finnes minst to fremgangsmåter for identifisering av CDR-aminosyrerestene: (1) En tilnærming basert på sekvensvariabilitet mellom artene (dvs. Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institute of Health, Bethesda, MS 1991), og (2) en tilnærming basert på krystallografiske undersøkelser av antigen-antistoffkomplekser (C. Chotia, *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196: 901:917 (1987)).

Imidlertid, i den grad to identifikasjonsteknikker for aminosyrerester definerer områder i overlappende, men ikke identiske områder kan de kombineres til å definere en hybrid CDR.

Begrepet «monoklonalt antistoff» som anvendt her henviser til et antistoff oppnådd fra en populasjon av vesentlig homogene antistoffer, dvs. at de individuelle antistoffene som utgjør populasjonen er identiske, bortsett fra mulige naturlig forekommende mutasjoner og/eller posttranslasjonelle modifikasjoner (f.eks. isomeriseringer, amideringer) som kan være tilstede i mindre mengder. Monoklonale antistoffer er svært spesifikke og er rettet mot ett enkelt antigensete. I motsetning til konvensjonelle (polyklonale) antistoffsammensetninger, som typisk inkluderer forskjellige antistoffer rettet mot forskjellige determinanter (epitoper), er dessuten hvert monoklonale antistoff rettet mot en enkelt determinant på antigenet. I tillegg til deres spesifisitet er de monoklonale antistoffene fordelaktige ved at de syntetiseres av hybridomkulturen, ikke-forurenses av andre immun-globuliner. Adjektivet «monoklonalt» indikerer karakteren til antistoffet som blir oppnådd fra en vesentlig homogen populasjon av antistoffer, og skal ikke tolkes som at det kreves at antistoffet er fremstilt på noen spesiell måte. For eksempel kan de monoklonale antistoffene som skal anvendes i samsvar med den foreliggende oppfinnelse fremstilles ved hybridomfremgangsmåten, først beskrevet av Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975), eller kan fremstilles ved rekombinante DNA-fremgangsmåter (se f.eks. U.S. patentskrift nr. 4 816 567). De «monoklonale antistoffene» kan også isoleres fra bakteriofag-antistoffbiblioteker ved anvendelse av teknikkene beskrevet f. eks. i Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) og Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991).

De monoklonale antistoffene her inkluderer spesifikt «kimere» antistoffer (immunglobuliner) hvor en del av den tunge og/eller den lette kjeden er identisk med eller homolog til tilsvarende sekvenser i antistoffer avledet fra en bestemt art eller tilhørende en bestemt antistoffklasse eller subklasse, mens resten av kjeden(e) er identisk med eller homolog med tilsvarende sekvenser i antistoffer avledet fra en annen art eller tilhørende en annen antistoffklasse eller subklasse, så vel som fragmenter fra slike antistoffer, så lenge som de viser den ønskede biologiske aktivitet (U.S. patentskrift nr. 4 816 567, Morrisson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Kimere antistoffer av interesse her inkluderer «primatiserte» antistoffer, som omfatter antigenbindingssekvenser i det variable

domenet som er avledet fra en ikke-human primat (f.eks. øst-ape, ape osv.) og humane konstant-områdesekvenser.

Et «intakt» antistoff er et antistoff som omfatter et antigen-bindingssete, så vel som en C_L og i det minste tung kjededomenene C_{H1} , C_{H2} og C_{H3} . De konstante domenene kan
 5 være konstante domener med nativ sekvens (f.eks. konstante domener med human nativ sekvens) eller aminosyresekvensvarianter derav. Det intakte antistoff har fortrinnsvis én eller flere effektorfunksjoner.

Et «antistoff-fragment» omfatter en del av et intakt antistoff, fortrinnsvis det antigenbindende og/eller variable området i det intakte antistoff. Eksempler på antistoff-
 10 fragmenter omfatter Fab, Fab', $F(ab')_2$ og Fv-fragmenter, diastoffer, lineære antistoffer (se U.S. patentskrift nr. 5 641 870, Eksempel 2, Zapata *et al.*, *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995], enkeltkjedede antistoffmolekyler og multispesifikke antistoffer fremstilt av antistoff-fragmenter.

Papainspalting av antistoffer gir 2 identiske antigenbindende fragmenter som
 15 betegnes «Fab»-fragmenter og et gjenværende «Fc»-fragment, en betegnelse som reflekterer evnen til å krystallisere lett. Fab-fragmentet består av en hel L-kjede sammen med det variable område domenet fra H-kjeden (V_H) og det første konstante domenet fra én tung kjede (C_{H1}). Hvert Fab-fragment er monovalent med hensyn til antigenbinding, dvs. at det har et enkelt antigen-bindingssete. Pepsinbehandling av et antistoff gir et enkelt, stort
 20 $F(ab')_2$ -fragment, som grovt sett tilsvarer to disulfid-bunede Fab-fragmenter, som har forskjellig antigen-bindende aktivitet og som fortsatt kan kryssbinde antigen. Fab'-fragmenter avviker fra Fab-fragmenter ved at de har noen få ekstra aminosyrerester ved karboksyterminus av C_{H1} -domenet, inkludert én eller flere cysteinrester fra antistoffets hengselområde. Fab'-SH er her betegnelsen på Fab' hvor cysteinresten(e) i de konstante
 25 domener bærer en fri tiolgruppe. $F(ab')_2$ -antistoff-fragmenter ble opprinnelig fremstilt som par av Fab'-fragmenter som hadde hengselcysteiner mellom seg. Andre former for kjemisk sammenkobling av antistoff-fragmenter er også kjente.

Fc-fragmentet omfatter de karboksyterminale delene av begge H-kjedene, holdt sammen av disulfider. Effektorfunksjonene til antistoffer bestemmes av sekvenser i Fc-
 30 området, området som også gjenkjennes av Fc-reseptorer (FcR) funnet på visse celletyper.

«Fv» er det minste antistoff-fragment som inneholder et komplett antigen-gjenkjennelses- og -bindingssete. Dette fragmentet består av en dimer av ett tungt og ett lett variabelt kjededomene i tett, ikke-kovalent assosiasjon. Fra foldingen av disse to domenene utgår 6 hypervariable løkker (3 løkker hver fra H- og L-kjeden) som bidrar med
 35 aminosyrerestene for antigenbinding og som gir antigenbindende spesifisitet til antistoffet. Men selv et enkelt variabelt domene (eller halvparten av en Fv, omfattende kun tre CDR'er som er spesifikke for et antigen) har evnen til å gjenkjenne og binde antigen, om enn med lavere affinitet enn det hele bindingssetet.

«Enkeltkjedet Fv», også forkortet som «sFv» eller «scFv», er antistoff-fragmenter som omfatter V_H og V_L antistoffdomenene sammenbundet til en enkel polypeptidkjede. Fortrinnsvis omfatter sFv-polypeptidet videre en polypeptidlinker mellom V_H og V_L -domenet noe som gjør det mulig for sFv å danne den ønskede struktur for antigenbinding. For en
 5 oversikt over sFv, se Pluckthun i *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg og Moore red., Springer-Verlag, New York, s 269-315 (1994).

Begrepet «diastoffer» refererer til små antistoff-fragmenter fremstilt ved å konstruere sFv-fragmenter (se avsnittet ovenfor) med korte linkere (omtrent 5-10 aminosyrerester) mellom V_H - og V_L -domenet, slik at inter-kjede men ikke intra-kjede parring av V -
 10 domenene oppnås, noe som resulterer et bivalent fragment, dvs. et fragment med to antigen-bindings seter. Bispesifikke diastoffer er heterodimerer av 2 «crossover» sFv-fragmenter hvor V_H - og V_L -domenene i de to antistoffene foreligger på forskjellige polypeptidkjeder. Diastoffer er beskrevet mer detaljert i f.eks. EP 404 097, WO93/11161, Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993).

15 Et antistoff som «spesifikt bindes til» eller er «spesifikt for» et bestemt polypeptid eller en epitop på et bestemt polypeptid er ett som bindes til dette bestemte polypeptidet eller epitopen på et bestemt polypeptid uten i vesentlig grad å bindes til et polypeptider eller polypeptidepitoper.

Begrepet «fast fase» beskriver et ikke-vandig matriks som antistoffet ifølge
 20 foreliggende oppfinnelse kan festes til. Eksempler på faste faser som omfattes her inkluderer de som helt eller delvis er dannet av glass (f.eks. glass med kontrollert porestørrelse), polysakkarider (f.eks. agarose), polyakrylamider, polystyren, polyvinylalkohol og silikoner. I visse utførelsesformer, avhengig av sammenhengen, kan den faste fase omfatte brønnen i en analyseplate, i andre er den en rensekolonnie (f.eks. en affinitetskromatografikolonnie).
 25 Dette begrepet inkluderer også en diskontinuerlig fast fase av atskilte partikler, slik som de som er beskrevet i U.S. patentskrift nr. 4 275 149.

«Humaniserte» former av ikke-humane (f.eks. murine) antistoffer er kimere immunglobuliner, immunglobulinkjeder eller fragmenter derav (slik som Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ eller andre antigenbindende undersekvenser fra antistoffer) av hovedsakelig humane
 30 sekvenser som inneholder minimal sekvens avledet fra ikke-humant immunglobulin. For det meste er humaniserte antistoffer humane immunglobuliner (mottaker-antistoffer) hvor aminosyrerester fra et hypervariabelt område (også CDR) i mottakeren er erstattet av aminosyrerester fra et hypervariabelt område fra en ikke-human art (donorantistoff), slik som mus, rotte eller kanin, som har den ønskede spesifisitet, affinitet og kapasitet. I noen
 35 tilfeller er Fv-rammeverksområde-(FR)aminosyrerester i det humane immunglobulinet erstattet med tilsvarende ikke-humane aminosyrerester. Videre kan «humaniserte antistoffer» som anvendt her også omfatte aminosyrerester som verken finnes i mottaker-antistoffet eller i donorantistoffet. Disse modifikasjonene er gjort for ytterligere å forfine og optimalisere antistoffets ytelse. Det humaniserte antistoff vil optimalt også omfatte minst en

del av et konstant immunglobulinområde (Fc) typisk fra et humant immunglobulin. For ytterligere detaljer, se Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986), Reichmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988) og Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992).

Et «artsavhengig antistoff», f.eks. et anti-human-IgE-antistoff fra et pattedyr, er et antistoff som har høyere bindingsaffinitet for et antigen fra en første pattedyrsart enn det har for en homolog av dette antigen fra en andre pattedyrsart. Normalt vil det artsspesifikke antistoff «bindes spesifikt» til et humant antigen (dvs. at det har en bindingsaffinitet (Kd)-verdi på ikke mer enn omkring $1 \times 10^{-7}\text{M}$, alternativt ikke mer enn omkring $1 \times 10^{-8}\text{M}$, alternativt ikke mer enn omkring $1 \times 10^{-9}\text{M}$), men har en bindingsaffinitet for en homolog av antigenet fra en andre, ikke-human pattedyrsart som er minst omkring 50 ganger, minst omkring 500 ganger, eller minst omkring 1000 ganger lavere enn dens bindingsaffinitet for det ikke-humane antigenet. Det artsavhengige antistoff kan være av enhver av de forskjellige typene av antistoffer som er definert ovenfor, men er fortrinnsvis et humanisert eller humant antistoff.

Antistoffers «effektorfunksjoner» refererer til de biologiske aktiviteter som kan tilskrives Fc-området (et nativ sekvens Fc-området eller en aminosyresekvensvariant av Fc-området) i et antistoff og varierer med antistoff-isotypen. Eksempler på antistoffers effektorfunksjoner omfatter: C1q-binding og komplementavhengig cytotoksitet, Fc-reseptorbinding, antistoffavhengig cellemediert cytotoksitet (ADCC), fagocytose, nedregulering av celleoverflatereseptorer (f.eks. B-cellereseptorer) og B-celleaktivering.

«Antistoffavhengig cellemediert cytotoksitet» eller ADCC refererer til en form for cytotoksitet hvor utskilt Ig er bundet til Fc-reseptorer (FcR'er) som er tilstede på visse cytotoksiske celler (f.eks. naturlige dreperceller (NK)-celler, neutrofile celler og makrofager) og gjør disse cytotoksiske effektorcellene istand til å bindes spesifikt til en antigenbærende målcelle og deretter drepe målcellen med cytokiner. Antistoffene «bevæpner» de cytotoksiske cellene og er nødvendige for dreping av målcellen ved denne mekanismen. De primære cellene for mediering av ADCC, NK-cellene, uttrykker kun $\text{Fc}\gamma/\text{RIII}$, mens monocyttene uttrykker $\text{Fc}\gamma\text{RI}$, $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ og $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$. Fc-ekspresjonen på hematopoietiske celler er oppsummert i Tabell 3 på side 464 i Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457:92 (1991). For å anslå ADCC-aktiviteten til et molekyl av interesse kan en *in vitro* ADCC-analyse, slik som den beskrevet i U.S. patentskrift nr. 5 500 362 eller 5 821 337, utføres. Anvendbare effektorceller for slike analyser inkluderer mononukleære celler fra perifert blod (PBMC) og naturlige dreperceller (NK)-celler. Alternativt eller i tillegg kan ADCC-aktiviteten til molekylet av interesse vurderes *in vivo*, f.eks. i en dyremodell slik som den som er beskrevet i Clynes et al. *PNAS USA* 95:652-656 (1998).

«Fc-reseptor» eller «FcR» beskriver en reseptor som binder til Fc-området til et antistoff. Den foretrukne FcR er en human FcR med nativ sekvens. Videre er en foretrukket FcR én som binder et IgG-antistoff (en gamma-reseptor) og inkluderer reseptorer av $\text{Fc}\gamma\text{RI}$, $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ og $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ underklassene, inkludert alleliske varianter og alternativt spleisede former

av disse reseptorene. Fc γ II-reseptorer inkluderer Fc γ RIIA (en «aktiverende reseptor») og Fc γ RIIB (en «inhiberende reseptor»), som har lignende aminosyresekvenser og som primært avviker i de cytoplasmatiske domenene derav. Aktiverende reseptor Fc γ RIIA inneholder et tyrosinbasert immunreseptoraktiveringsmotiv (ITAM) i dets cytoplasmatiske domene.

- 5 Inhiberende reseptor Fc γ RIIB inneholder et tyrosinbasert immunreseptorinhiberingsmotiv (ITIM) i dets cytoplasmatiske domene (se M. Dacron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997). FcR'er er gjennomgått i Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991), Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994) og de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Andre FcR'er, inkludert de som vil påvises i fremtiden, omfattes her av begrepet
- 10 «FcR». Begrepet inkluderer også den neonatale reseptor, FcRn, som er ansvarlig for overføring av maternale IgG'er til fosteret. Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) og Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994).

- «Humane effektorceller» er leukocytter som uttrykker én eller flere FcRer og utfører effektorfunksjoner. Cellene uttrykker fortrinnsvis minste Fc γ RIII og utfører ADCC-effektor
- 15 funksjon. Eksempler på humane leukocytter som medierer ADCC inkluderer mononukleære celler fra perifert blod (PBMC), naturlige dreperceller (NK)-celler, monocytter, cytotoksiske T-celler og nøytrofile celler, hvor PBMC og MNK-celler foretrekkes. Effektorcellene kan isoleres fra en nativ kilde, f.eks. blod.

- «Komplementavhengig cytotoxissitet» eller «CDC» refererer til lysis av en målcelle i
- 20 nærvær av komplement. Aktiveringen av den klassiske komplementreaksjonsveien initieres ved binding av den første komponenten av komplementsystemet (C1q) til antistoffer (av egnet underklasse) som er bundet til deres beslektede antigen. For å vurdere komplement-aktivering kan en CDC-analyse f.eks. som beskrevet i Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996) utføres.

- 25 «Isolert» når det anvendes for å beskrive de forskjellige polypeptidene og antistoffene beskrevet her, betyr et polypeptid eller antistoff som har blitt identifisert, separert og/eller gjenvunnet fra en komponent av dens produksjonsmiljø. Det isolerte polypeptid er fortrinnsvis fritt for assosiasjon med alle andre komponenter av dets produksjonsmiljø. Kontaminerende bestanddeler fra dets produksjonsmiljø, slike som det
- 30 som stammer fra rekombinant transfekterte celler, er materialer som typisk vil interferere med diagnostisk eller terapeutisk anvendelse av polypeptidet og kan inkludere enzymer, hormoner og andre løste stoffer av protein- eller ikke-proteininnatur. I foretrukne utførelsesformer vil polypeptidet renses (1) til en grad som er tilstrekkelig til å oppnå minst 15 aminosyrerester av N-terminal eller intern aminosyresekvens ved anvendelse av en «spinnende
- 35 kopp»-sekvenator, eller (2) til homogenitet ved SDS-PAGE under ikke-reduserende eller reduserende betingelser ved anvendelse av Coomassie-blue, eller fortrinnsvis sølvfarging. Vanligvis vil imidlertid et isolert polypeptid eller antistoff være fremstilt ved minst ett rensetrinn.

Et «isolert» nukleinsyremolekyl som koder for polypeptidene og antistoffene beskrevet her er et nukleinsyremolekyl som er påvist og separert fra minst ett kontaminerende nukleinsyremolekyl som det normalt er assosiert med i det miljø hvor det ble fremstilt. Den isolerte nukleinsyren er fortrinnsvis fri fra assosiasjon med alle bestanddeler forbundet med produksjonsmiljøet. De isolerte nukleinsyremolekylene som koder for polypeptidene og antistoffene her er i en annen form enn den form eller sammenheng som de finnes i naturen. Isolerte nukleinsyremolekyler skiller seg av den grunn fra nukleinsyrer som koder for polypeptidene og antistoffene her som eksistere naturlig i celler.

Begrepet «kontrollsekvenser» referer til DNA-sekvenser som er nødvendige for ekspresjon av en operativt linket kodende sekvens i en bestemt vertsorganisme. Kontrollsekvensene som er egnede for prokaryoter inneholder for eksempel en promoter, en ønskelig en operatorsekvens og et ribosombindingssete. Eukaryote celler er kjent for å benytte promotere, polyadenyleringssignaler og enhancere.

En nukleinsyre er «operativt linket» dersom den er plassert i et funksjonelt forhold til en annen nukleinsyresekvens. For eksempel er DNA for en presekvens eller en sekretorisk ledersekvens operativt linket til DNA for et polypeptid hvis det uttrykkes som et preprotein som deltar i sekresjon av polypeptidet, en promoter eller enhancer er operativt linket til en kodende sekvens hvis den påvirker transkripsjonen av sekvensen, eller et ribosombindingssete er operativt linket til en kodende sekvens hvis den er plassert slik for å lette translasjonen. Vanligvis betyr «operativt linket» at DNA-sekvensene som er linket er kontinuerlige, og i tilfellet av en sekretorisk ledersekvens, kontinuerlige og i samme leseramme. Enhancere må imidlertid ikke være kontinuerlige. Linkingen oppnås ved ligering i egnede restriksjonsseter. Dersom slike seter ikke eksisterer anvendes syntetiske oligonukleotidadaptere eller linkere i samsvar med konvensjonell praksis.

Begrepet «epitopmerket» som anvendt her refererer til et kimert polypeptid som omfatter et polypeptid eller antistoff som beskrevet her fusjonert til et «tag-polypeptid». Tag-polypeptidet har nok aminosyrerester til å gi en epitop som et antistoff kan fremstilles mot, men er kort nok slik at den ikke interfererer med aktiviteten til polypeptidet som det er fusjonert til. Tag-polypeptidet er fortrinnsvis også temmelig unikt, slik at antistoffet ikke i vesentlig grad kryssreagerer med andre epitoper. Egnede tag-polypeptider har vanligvis minst seks aminosyrerester, og vanligvis mellom omkring 8 og 50 aminosyrerester (fortrinnsvis mellom omkring 10 og 20 aminosyrerester).

Som anvendt her betegner begrepet «immunadhesin» antistofflignende molekyler som kombinerer bindingsspesifisiteten til et heterologt protein (et «adhesin») med effektorfunksjonene til immunglobuliners konstante domener. Strukturelt omfatter immunadhesinene en fusjon av en aminosyresekvens med den ønskede bindingsspesifisitet, som er forskjellig fra det antigengjenkjennings- og -bindingssetet i et antistoff (dvs. er «heterologt»), og et immunglobulins konstante domenesekvens. Adhesindelen av et immun-

adhesinmolekyl er typisk en kontinuerlig aminosyresekvens som omfatter i det minste bindingssetet for en reseptor eller ligand. Immunglobulinets konstante domenesekvens i immunadhesinet kan være fremskaffet fra ethvert immunglobulin, slik som undertypene IgG-1, IgG-2, IgG-3 eller IgG-4, IgA (inkludert IgA-1 og IgA-2), IgE, IgD eller IgM. Ig-fusjonene inkluderer fortrinnsvis substitusjon av et domene i et polypeptid eller antistoff som beskrevet her i stedet for minst ett variabelt område i et Ig-molekyl. I en spesielt foretrukket utførelsesform inkluderer immunglobulinfusjonen hengselområdet, CH2- og CH3-, eller hengselområdet CH1-, CH2- og CH3-området fra et IgG1-molekyl. For fremstillingen av immunglobulinfusjoner, se også U.S. patentskrift nr. 5 428 130, tildelt 27. juni 1995.

En «stabil» formulering er en hvor proteinet deri i det vesentlige beholder sin fysiske og kjemiske stabilitet og integritet ved lagring. Forskjellige analytiske teknikker for måling av proteinstabilitet er tilgjengelige innen faget, og er gjennomgått i *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee, red., Marcel Dekker, Inc., New York, New York Pubs. (1991) og A. Jones, *Adv. Drug Delivery Rev.* 10:29-90 (1993). Stabilitet kan måles ved en utvalgt temperatur over et utvalgt tidsrom. For rask screening kan formuleringen holdes ved 40 °C i fra 2 uker til 1 måned, ved hvilken tid stabilitet måles. Dersom formuleringen skal lagres ved 2-8 °C bør den vanligvis være stabil ved 30 °C eller 40 °C i minst 1 måned og/eller stabil ved 2-8 °C i minst 2 år. Dersom formuleringen skal lagres ved 30 °C bør den vanligvis være stabil i minst 2 år ved 30 °C og/eller stabil ved 40 °C i minst 6 måneder. For eksempel kan omfanget av aggregering under lagringen anvendes som indikator på protein stabilitet. Således kan en «stabil» formulering være én hvor mindre enn omkring 10 %, fortrinnsvis mindre enn omkring 5 % av proteinet foreligger som et aggregat i formuleringen. I andre utførelsesformer kan enhver økning av aggregatdannelsen under lagring av formuleringen bestemmes.

En «rekonstituert» formulering er én som har blitt fremstilt ved å løse en frysetørket protein- eller antistoff-formulering i et fortynningsmiddel slik at proteinet foreligger i det hele. Den rekonstituerte formuleringen er egnet for administrasjon (f.eks. parenteral administrasjon) til en pasient som skal behandles med proteinet av interesse og kan, i visse utførelsesformer av oppfinnelsen, være én som er egnet for subkutan administrering.

En «isoton» formulering er én som i alt vesentlig har det samme osmotiske trykk som humant blod. Isotone formuleringer vil vanligvis ha et osmotisk trykk på mellom 250 og 350 mOsm. Begrepet «hypoton» beskriver en formulering med et osmotisk trykk som er lavere enn det til humant blod. Tilsvarende anvendes begrepet «hyperton» for å beskrive en formulering som har et osmotisk trykk høyere enn det til humant blod. Isotonisitet kan for eksempel måles ved anvendelse av et osmometer av damptrykktype eller isfrysingstype. Formuleringene ifølge foreliggende oppfinnelse er hypotone som en følge av tilsetning av salt og/eller buffer.

En «rekonstituert» formulering er én som har blitt fremstilt ved å løse en frysetørket proteinformulering i et fortynningsmiddel slik at proteinet er fordelt i den rekonstituerte formuleringen. Den rekonstituerte formuleringen er egnet for administrasjon (f.eks. parenteral administrasjon) til en pasient som skal behandles med proteinet av interesse, og kan i visse utførelsesformer av oppfinnelsen være en formulering som er egnet for subkutan administrasjon.

En «farmasøytisk aksepterbare syre» inkluderer uorganiske og organiske syrer som er ikke-toksiske ved den konsentrasjonen og på den måten som de er formulert. Egnede uorganiske syrer inkluderer for eksempel saltsyre, perklorisyre, hydrogenbromid, hydrogenjodid, salpetersyre, svovelsyre, sulfonsyre, sulfinsyre, sulfanilsyre, fosforsyre, karbonsyre osv. Egnede organiske syrer inkluderer alkylsyrer med uforgrenet og forgrenet kjede, aromatiske syrer, cykliske syrer, cykloalifatiske syrer, arylalifatiske syrer, heterocykliske syrer, mettede syrer, umettede syrer, mono-, di- og trikarboksylsyrer, inkludert for eksempel maursyre, eddiksyre, 2-hydroksyeddiksyre, trifluoredediksyre, fenyleddiksyre, trimetyleddiksyre, *t*-butyleddiksyre, antranilinsyre, propansyre, 2-hydroksypropansyre, 2-oksopropansyre, propandionsyre, cyklopentanpropionsyre, cyklopentanpropionsyre, 3-fenylpropionsyre, smørsyre, butanoinsyre, butandionsyre, benzosyre, 3-(4-hydroksybenzoyl)benzosyre, 2-acetoksy-benzosyre, askorbinsyre, kannelsyre, laurylsvovelsyre, stearinsyre, slimsyre, mandelsyre, ravsyre, embonsyre, fumarsyre, eplesyre, maleinsyre, hydroksymaleinsyre, malonsyre, melkesyre, sitronsyre, vinsyre, glykolsyre, glykonsyre, glukonsyre, pyrodruesyre, glyoksalsyre, oksalsyre, mesylsyre, ravsyre, salicylsyre, ftalsyre, palmesyre, palmeinsyre, tiocyansyre, metansulfonsyre, etansulfonsyre, 1,2-etandisulfonsyre, 2-hydroksyetansulfonsyre, benzensulfonsyre, 4-klorbenzensulfonsyre, naftalen-2-sulfonsyre, *p*-toluensulfonsyre, kamfersulfonsyre, 4-metyl bicyclo[2.2.2]-okt-2-en-1-karboksylsyre, glukohexonsyre, 4,4'-metylenbis-3-(hydroksy-2-en-1-karboksylsyre), hydroksynaftonsyre.

«Farmasøytisk aksepterbare baser» inkluderer uorganiske og organiske baser som er ikke-toksiske ved den konsentrasjonen og på den måte som de er formulert. Egnede baser inkluderer for eksempel de som er dannet fra uorganiske, basedannende metaller som litium, natrium, kalium, magnesium, kalsium, ammonium, jern, sink, kobber, mangan, aluminium, *N*-metylglukamin, morfolin, piperidin og organiske, ikke-toksiske baser, inkludert primære, sekundære og tertiære aminer, substituerte aminer, cykliske aminer og basiske ionebytterresiner [f.eks. $N(R')_4^+$ hvor R' uavhengig er H eller C_{1-4} alkyl, f. eks. ammonium, Tris]], for eksempel isopropylamin, trimetylamin, dietylamin, trietylamin, tripropylamin, etanolamin, 2-dietylamin, etanol, trimetamin, dicykloheksylamin, lysin, arginin, histidin, koffein, prokain, hydrabamin, cholin, betain, etylendiamin, glukosamin, metylglukosamin, teobromin, puriner, piperazin, piperidin, *N*-etyl piperidin, polyaminresiner o.l. Spesielt foretrukne, organiske, ikke-toksiske baser er isopropylamin, dietylamin, etanolamin, trimetamin, dicykloheksylamin, cholin og koffein.

Ytterligere farmasøytisk aksepterbare syrer og baser som er anvendbare i foreliggende oppfinnelse inkluderer de som er avledet fra aminosyrene, for eksempel histidin, glycin, fenylalanin, asparaginsyre, glutaminsyre, lysin og asparagin.

«Farmasøytisk aksepterbare» buffere og salter inkluderer de som er avledet fra både syre- og baseaddisjonssalter av de ovenfor angitte syrene og basene. Spesifikke buffere og/eller salter omfatter histidin, suksinat og acetat.

Et «lyobeskyttende middel» er et molekyl som når kombinert med et protein av interesse signifikant forhindrer eller reduserer kjemisk og/eller fysisk ustabilitet av proteinet ved frysetørking og påfølgende lagring. Eksempler på lyobeskyttende midler inkluderer sukkere og de korresponderende sukkeralkoholer, en aminosyre slik som mononatriumglutamat eller histidin, et metylamin slik som betain, et lyotropt salt slik som magnesiumsulfat, en polyol, slik som trihydriske sukkeralkoholer eller sukkeralkoholer med høyere molekylvekt, f.eks. glyserin, dekstran, erytritol, glyserol, arabitol, xylitol, sorbitol og mannitol, propylenglykol, polyetylenglykol, «Pluronic» og kombinasjoner av disse.

Ytterligere eksempler på lyobeskyttende midler inkluderer glyserol og gelatin, og sukrene mellibiose, melezitose, raffinose, mannotriose og staktyose. Eksempler på reduserende sukkere inkluderer glukose, maltose, laktose, maltulose, isomaltulose og laktulose. Eksempler på ikke-reduserende sukkere inkluderer ikke-reduserende glykosider av polyhydroksyforbindelser valgt fra sukkeralkoholer og andre rett-kjeded polyalkoholer.

Foretrukne sukkeralkoholer er monoglykosider, fortrinnsvis de forbindelsene som oppnås ved reduksjon av disakkarider slik som laktose, maltose, laktulose og maltulose. Glukosid-sidegruppen kan enten være glukosidisk eller galaktosidisk. Ytterligere eksempler på sukkeralkoholer er glukitol, maltitol, laktitol og isomaltulose. Det foretrukne lyobeskyttende middel er de ikke-reduserende sukrene trehalose og sukrose.

Det lyobeskyttende middel tilsettes til formuleringen før frysetørkingen i en «lyobeskyttende mengde», hvilket betyr at etter frysetørking av proteinet i nærvær av den lyobeskyttende mengden av det lyobeskyttende middel beholder proteinet i det vesentlige sin fysiske og kjemiske stabilitet og integritet ved frysetørking og lagring.

Ved fremstilling av formuleringen med redusert viskositet ifølge oppfinnelsen bør man være nøye med å anvende de ovenfor angitte eksipienter så vel som andre tilsetningsstoffer, særlig når disse tilsettes i høy konsentrasjon, slik at formuleringens viskositet ikke forhøyes.

Et «farmasøytisk aksepterbart sukker» er et molekyl som når det blandes med et protein av interesse signifikant forhindrer eller reduserer kjemisk og/eller fysisk ustabilitet av proteinet ved lagring. Dersom formuleringen er beregnet på frysetørking og så rekonstituering kan «farmasøytisk aksepterbare sukkere» også være kjent som «lyobeskyttende midler». Eksempler på sukkere og deres korresponderende sukkeralkoholer inkluderer: en aminosyre slik som mononatriumglutamat eller histidin, et metylamin slik som betain, et lyotropt salt slik som magnesiumsulfat, en polyol slik som trihydriske

sukkeralkoholer eller sukkeralkoholer med høyere molekylvekt, f.eks. glyserol, dekstran, erytritol, glyserol, arabitol, xylitol, sorbitol og mannitol, propylenglykol, polyetylenglykol, «Plurronics» og kombinasjoner derav. Ytterligere eksempler på lyobeskyttende midler inkluderer glyserol og gelatin og sukrene mellibiose, melezitose, raffinose, mannotriose og staktyose. Eksempler på reduserende sukkere inkluderer glukose, maltose, laktose, maltulose, isomaltulose og laktulose. Eksempler på ikke-reduserende sukkere inkluderer ikke-reduserende glykosider av polyhydroksyforbindelser valgt fra sukkeralkoholer og andre rettkjedede polyalkoholer. Foretrukne sukkeralkoholer er monoglykosider, fortrinnsvis forbindelsene som oppnås ved reduksjon av disakkarider som laktose, maltose, laktulose og maltulose. Glykosidsidegruppen kan enten være glukosidisk eller galaktosidisk. Ytterligere eksempler på sukkeralkoholer er glucitol, maltitol, laktitol og isomaltulose. De foretrukne farmasøytisk aksepterbare sukkere er de ikke-reduserende sukrene trehalose eller sukrose.

Farmasøytisk aksepterbare sukkere tilsettes til formuleringen i en «beskyttende mengde» (f.eks. før frysetørking), hvilket vil si at proteinet i det vesentlige beholder sin fysiske og kjemiske stabilitet og integritet under lagring (f.eks. etter rekonstituering og lagring).

«Fortynningsmidlet» av interesse er ett som er farmasøytisk aksepterbart (sikkert og ikke-toksisk for administrasjon til et menneske) og som er anvendbart til fremstilling av en flytende formulering slik som en formulering som rekonstitueres etter frysetørking.

Eksempler på fortynningsmidler inkluderer sterilt vann, bakteriostatisk vann for injeksjon (BWFI), en pH-bufret løsning (f.eks. fosfatbufret saltvann), steril saltløsning, Ringer's løsning eller dekstroseløsning. I en alternativ utførelsesform kan fortynningsmidler inkludere vandige løsninger av salter og/eller buffere.

Et «konserveringsmiddel» er en forbindelse som kan tilsettes til formuleringene her for å redusere bakteriell aktivitet. Tilsetning av et konserveringsmiddel kan for eksempel lette fremstillingen av en fler-bruks-(flerdose) formulering. Eksempler på mulige konserveringsmidler omfatter oktadecyldimetylbenzylammoniumklorid, heksametoniumklorid, benzalkoniumklorid (en blanding av alkylbenzyldimetylammmoniumklorider hvor alkylgruppene er langkjede forbindelser) og benzetoniumklorid. Andre typer av konserveringsmidler inkluderer aromatiske alkoholer slik som fenol, butyl og benzylalkohol, alkylparabener som metyl- eller propylparaben, catechol, resorcinol, cykloheksanol, 3-pentanol og *m*-kresol. Det mest foretrukne konserveringsmiddel her er benzylalkohol.

«Behandling» viser til både terapeutisk behandling og profylaktisk eller forebyggende tiltak. Individer med behov for behandling omfatter individer som allerede har forstyrrelsen, så vel individer i hvilke forstyrrelsen skal forhindres.

«Pattedyr» for behandlingsformål viser til ethvert dyr som er klassifisert som et pattedyr, inkludert mennesker, husdyr og gårdsdyr, dyr i zoologiske hager, sportsdyr og kjæledyr, f.eks. hunder, hester, kaniner, storfe, griser, hamstere, ørkenrotter, mus, ildere, rotter, katter osv. Fortrinnsvis er pattedyret et menneske.

En «forstyrrelse» er enhver tilstand som kan dra fordel av behandling med proteinet. Dette omfatter kroniske og akutte forstyrrelser eller sykdommer, inkludert de patologiske tilstander som predisponerer pattedyret for forstyrrelsen det gjelder. Ikke-begrensende eksempler på forstyrrelser som skal behandles her omfatter karcinomer og allergier.

En «terapeutisk effektiv mengde» er minst den minimale konsentrasjon som er nødvendig for å oppnå en målbar forbedring eller forebyggelse av en bestemt forstyrrelse. Terapeutisk effektive mengder av kjente proteiner er velkjente innen faget, mens de effektive mengder av proteiner som vil bli oppdaget i fremtiden kan bestemmes ved standardteknikker som ligger godt innenfor kunnskapsområdet til en erfaren fagperson, slik som en vanlig lege.

«Viskositet» som anvendt her kan være «kinematisk viskositet» eller «absolutt viskositet». «Kinematisk viskositet» er et mål for den resistive strømmen til en væske under påvirkning av tyngdekraften. Når to væsker med samme volum plasseres i identiske kapillærviskometere og får flyte drevet av tyngdekraften, bruker en viskøs væske lengre tid enn en mindre viskøs væske på å strømme gjennom kapillæret. Hvis én væske bruker 200 sek. på å fullføre gjennomstrømningen, mens en annen væske bruker 400 sek. er den andre væsken 200 ganger mer viskøs enn den første på en kinematisk viskositets-skala. «Absolutt viskositet», noen ganger kalt dynamisk eller enkel viskositet, er produktet av kinematisk viskositet og væskens tetthet.

Absolutt viskositet = Kinematisk viskositet x Tetthet.

Dimensjonen for kinematisk viskositet er L^2/T , hvor L er en lengde og T er en tid. Vanligvis uttrykkes kinematisk viskositet i centistokes (cSt). SI-enheten for kinematisk viskositet er mm^2/s , som tilsvarer 1 cSt. Den absolutte viskositet uttrykkes i enheten centipoise (cP). SI-enheten for absolutt viskositet er milliPascal-sekund (mPa-s), hvor 1 cp = 1 mPa-s.

Et «antihistamin» som anvendt her er et middel som antagoniserer den fysiologiske effekten av histamin. Binding av histamin til dens reseptorer, H_1 og H_2 , resulterer i de karakteristiske allergiske symptomene og effektene, eller kløe, rødhet, oppsvulming osv. Mange antihistaminer virker ved å blokkere bindingen av histamin til dets reseptorer, H_1 og H_2 , andre antas imidlertid å virke ved å inhibere frigjøringen av histamin. Eksempler på antihistaminer er klorfeniramin, difenhydramin, prometazin, kromolynnatrium, astemizol, azatadinmaleat, brofeniraminmaleat, karbonoksaminmaleat, cetirizinhydroklorid, klemastin-fumarat, cyproheptadinhydroklorid, deksbromfeniraminmaleat, deksklorfeniraminmaleat, dimenhydrinat, difenhydraminhydroklorid, doksylaminsuksinat, feksofendadinhydroklorid, terferadinhydroklorid, hydroksyzinhydroklorid, loratidin, meklizinhydroklorid, tripelannamin-citrat, tripelennaminhydroklorid, triprolidinhydroklorid.

En «bronkodilator» som anvendt her beskriver midler som antagoniserer eller reverserer bronkokonstriksjon, en fysiologisk begivenhet som typisk opptrer i den tidlige

fase av astmatiske reaksjoner og som resulterer i redusert lungekapasitet og kortpustethet. Eksempler på bronkodilatorer inkluderer epinefrin, et bredt virkende alfa- og beta-adrenergiskmiddel og de beta-adrenergiske midlene albuterol, pirbuterol, metaproterenol, salmeterol og isoetarin. Bronkodilasjon kan også oppnås ved administrasjon av xantiner, inkludert aminofyllin og teofyllin.

Et «glukokortikoid» som anvendt her beskriver steroidbaserte midler med anti-inflammatorisk aktivitet. Glukokortikoid anvendes vanligvis for å dempe en astmatisk reaksjon i sen fase. Eksempler på glukokortikoider inkluderer prednison, beklometason-dipropionat, triamcinolonacetamid, flunisolid, betametason, budesonid, deksametason, fludrokortisonacetat, flunisolid, flutikasonpropionat, hydrokortison, metylprednison, prednisolon, prednison og triamcinolon.

Et «ikke-steroid anti-inflammatorisk medikament» eller «NSAID» som anvendt her beskriver midler med anti-inflammatorisk aktivitet som ikke er steroide-basert. Eksempler på NSAID'er inkluderer acetaminofen, aspirin, bromfenacnatrium, diklofenacnatrium, diflunisal, etodolac, fenoprofenkalsium, flurbiprofen, ibuprofen, indometacin, ketoprofen, meklofenamatnatrium, mefenaminsyre, nabumeton, naproksen, naproksennatrium, oksyfenbutazon, fenylbutzon, piroksikam, sulindac, tolmetinnatrium.

II. Måter å utføre oppfinnelsen på

A. Polypeptid- og antistoff-fremstilling

Den påfølgende beskrivelse gjelder primært fremstilling av polypeptidene eller antistoffene beskrevet her ved å dyrke celler som er transformert eller transfektert med en vektor som inneholder nukleinsyre som koder for disse og rensing av det resulterende protein eller antistoff. Det er selvsagt underforstått at alternative fremgangsmåter som er kjente innen faget kan benyttes for fremstilling av slike polypeptider eller antistoffer. For eksempel kan slike sekvenser eller deler av dem fremstilles ved direkte peptidsyntese ved anvendelse av fast fase-teknikker [se f.eks. Stewart *et al.*, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969), Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 (1963)]. *In vitro*-proteinsyntese kan utføres ved anvendelse av manuelle teknikker eller automatisering. Automatisert syntese kan for eksempel oppnås ved anvendelse av en Peptide Synthesizer fra Applied Biosystems (Foster City, CA), ved å følge produsentens instruksjoner. Forskjellige deler av proteinene eller antistoffene beskrevet her kan kjemisk syntetiseres separat og kombinert ved anvendelse av kjemiske eller enzymatiske fremgangsmåter.

1. Isolering av DNA som koder for proteinene beskrevet her

DNA som koder for proteinene beskrevet her kan oppnås fra et cDNA-bibliotek fremstilt fra vev som antas å inneholde det tilsvarende mRNA og uttrykke det i et påvisbart

nivå. Følgelig kan slik human, proteinkodende DNA med fordel fremskaffes fra et cDNA-bibliotek fremstilt fra et humant vev, slik som beskrevet i eksemplene. Det proteinkodende genet kan også fremskaffes fra et genomisk bibliotek eller ved kjente syntetiske fremgangsmåter (f.eks. automatisert nukleinsyresyntese).

5 Biblioteker kan screenes med prober (slik som oligonukleotider på minst omkring 20-80 baser) som er utviklet for å identifisere genet av interesse. Screening av cDNA- eller det genomiske bibliotek med den valgte proben kan utføres ved anvendelse av standard-fremgangsmåter, slik som beskrevet i Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). En alternativ måte å isolere
10 genet som koder for det ønskede genet, er å anvendt PCR-metodologi [Sambrook et al., *supra*; Dieffenbach et al., *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Eksemplene nedenfor beskriver teknikker for screening av et cDNAbibliotek. Oligonukleotidsekvensene som er valgt som prober bør ha tilstrekkelig lengde og være
15 tilstrekkelig entydige slik at falske positiver minimaliseres. Oligonukleotidet er fortrinnsvis merket, slik at det kan påvises etter hybridisering til DNA i biblioteket som screenes. Fremgangsmåter for merking er velkjente innen faget og inkludere anvendelse av radioaktive isotoper som ^{32}P -merket ATP, biotinylering eller enzymmerking. Hybridiseringsbetingelser, inkludert moderat stringens og høy stringens, fremgår av Sambrook et al.,
20 *supra*.

Sekvenser som identifiseres ved slike fremgangsmåter for screening av biblioteker kan sammenlignes og sammenstilles med andre kjente sekvenser som er deponerte og tilgjengelige i offentlig tilgjengelige databaser, slik som Genbank, eller i andre, private sekvensdatabaser. Sekvensidentiteten (på enten aminosyre- eller nukleotidnivå) innenfor
25 definerte områder i molekylet eller over fullengde-sekvenser kan bestemmes ved anvendelse av fremgangsmåter som er kjente innen faget og som beskrevet her.

Nukleinsyrer med proteinkodende sekvens kan fremskaffes ved å screene utvalgte cDNA-biblioteker eller genomiske biblioteker ved anvendelse av den utledede aminosyre-sekvens beskrevet her for første gang, og om nødvendig ved anvendelse av konvensjonelle
30 fremgangsmåter for primer-forlengelse, som beskrevet i Sambrook et al., *supra*, for påvisning av forløpere og prosesseringsintermediater av mRNA som ikke nødvendigvis er blitt revers-transkribert til cDNA.

2. Seleksjon og transformasjon av vertsceller

35 Vertscellene transfekteres eller transformeres med ekspresjons- eller kloningsvektorer som inneholder proteinene eller antistoffene beskrevet her for fremstilling og dyrket i konvensjonelle næringsmedier, modifisert etter behov for induksjon av promotere, seleksjon av transformanter eller amplifisering av genene som koder for de ønskede sekvensene. Dyrkningsbetingelsene, slik som media, temperatur, pH og lignende kan

velges av den erfarne fagperson uten omfattende eksperimentering. Generelt kan prinsipper, fremgangsmåter og praktiske teknikker for maksimering av produksjonsevnen til cellekulturer finnes i *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butler, red. (IRL Press, 1991) og i Sambrook *et al.*, *supra*.

- 5 Fremgangsmåter for eukaryot celletransfeksjon og prokaryot celletransformasjon er kjente for gjennomsnittsfagfolk, for eksempel CaCl_2 , CaPO_4 , liposom-mediert og elektro-porering. Avhengig av den anvendte vertscelle utføres transformasjonen ved anvendelse av standardteknikker som er egnede for slike celler. Kalsiumbehandlingen ved anvendelse av kalsiumklorid, som beskrevet i Sambrook *et al.*, *supra*, eller elektroporering er vanligvis
- 10 benyttet for prokaryoter. Infeksjon med *Agrobacterium tumefaciens* anvendes for transformasjon av visse planteceller, som beskrevet av Shaw *et al.*, *Gene*, 23:315 (1983) og WO89/05859, publisert 29. juni 1989. For pattedyrceller uten slike cellevegger kan kalsium-fosfat -presipitasjonsmetoden til Graham og van der Eg, *Virology*, 52:456-457 (1978) anvendes. Generelle aspekter ved transfeksjon av pattedyrcelle-vertssystemer er beskrevet i
- 15 U.S. patentskrift nr. 4.399.216. Transformasjoner av gjærceller er typisk utført etteri fremgangsmåten til Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, 130:946 (1977) og Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829 (1979). Andre fremgangsmåter for innføring av DNA i celler, slik som ved mikroinjeksjon i cellekjernen, elektroporering, bakteriell protoplast-fusjon med intakte celler eller polykationer, f.eks. polybren eller polyornitin, kan imidlertid også
- 20 anvendes. For forskjellige teknikker for transformasjon av pattedyrceller, se Keown *et al.*, *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) og Mansour *et al.*, *Nature*, 336:348-352 (1988).

- Egnede vertsceller for kloning eller ekspresjon av DNA i vektorene her inkluderer prokaryoter, gjær eller høyere eukaryote celler. Egnede prokaryoter inkludere eubakterier
- 25 slik som gram-negative, eller gram-positive organismer, for eksempel Enterobacteriaceae slik som *E. coli*. Forskjellige *E. coli*-stammer er offentlig tilgjengelig, slik som *E. coli* K12 stamme MM294 (ATCC 31.446), *E. coli* X1776 (ATCC 31.537), *E. coli* stamme W3110 (ATCC 27.325) og K5 772 (ATCC 53.635). Andre egnede prokaryote vertsceller inkluderer Enterobacteriaceae slik som *Escherichia*, f.eks. *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*,
- 30 *Proteus*, *Salmonella*, f.eks. *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, f.eks. *Serratia marcescans* og *Shigella*, så vel som *Bacilli* slik som *B. subtilis* og *B. licheniformis* (f.eks. *B. licheniformis* 41P, beskrevet i DD 266.710, publisert 12. april 1989), *Pseudomonas*, slik som *P. aeruginosa*, og *Streptomyces*. Disse eksemplene er illustrerende. Stamme W3110 er én spesielt foretrukket vert eller utgangsvært, siden den er en vanlig vertsstamme for rekombinant DNA-produkt
- 35 fermentering. Vertscellen utskiller fortrinnsvis minimale mengder av proteolytiske enzymer. For eksempel kan stamme W3110 modifiseres til å bevirke en genetisk mutasjon i genene som koder for proteiner som er endogene for verten, eksempler på slike verter inkluderer *E. coli* W3110 stamme 1A2, som har den fullstendige genotypen *tonA*, *E. coli* W3110 stamme 9E4, som har den fullstendige genotypen *tonA ptr3*, *E. coli* W3110 stamme 17C7

(ATCC 55.244), som har den fullstendige genotypen *tonA ptr 3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan^r*, *E. coli* W3110 stamme 37D6, som har den fullstendige genotypen *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r*, *E. coli* W3110 stamme 40B4, som er stamme 37D6 med en ikke-kanamycinresistent *degP*-delesjonsmutasjon, og en *E. coli*-
 5 stamme som har mutant periplasmatisk protease, beskrevet i U.S. patentskrift nr. 4.946.783, tildelt 7. august 1990. Alternativt er *in vitro*fremgangsmåter for kloning, f.eks. PCR eller andre nukleinsyrepolimerasereaksjoner, egnede.

I tillegg til prokaryoter er eukaryoter mikrober, slik som filamentøs sopp eller gjær egnede klonings- eller ekspresjonsverter for vektorer som koder for proteinene eller
 10 antistoffene beskrevet her. *Saccharomyces cerevisiae* er en vanlig anvendt lavere eukaryotisk vertsmikroorganisme. Andre inkluderer *Schizosaccharomyces pombe* (Beach og Nurse, *Nature*, 290:140 [1981], EP 139.383 utgitt 2. mai 1985), *Kluyveromyces* hosts (U.S. patentskrift nr. 4.943.529, Fleer *et al.*, *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)) slik som f.eks. *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574, Louvencourt *et al.*, *J. Bacteriol.*, 154(2):737-42
 15 [1983], *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906), Van den Berg *et al.*, *Bio/Technology*, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans*, og *K. marxianus*, *Yarrowia* (EP 402.226), *Pichia pastoris* (EP 183.070), Sreekrishna *et al.*, *J. Basic Microbiol.*, 28:265-278 [1988], *Candida*, *Trichoderma reesia* (EP 244.234), *Neurospora crassa* (Case *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:5259-5263 [1979], *Scwanniomycetes*, slik som *Scwanniomycetes occidentalis* (EP 394.538, publisert 31. oktober 1990) og filamentøs sopp, slik som f.eks. *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO91/00357, publisert 10. januar 1991), og *Aspergillus*-verter
 20 slik som *A. nidulans* (Ballance *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112:284-289 [1983], Tilburn *et al.*, *Gene*, 26:205-221 [1983] Yelton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:1470-
 25 1474 [1984] og *A. Niger* (Kelly and Hynes, *EMBO J.*, 4:475-479 [1985]). Metylotope gjær er egnede her og inkluderer gjær som er istand til å vokse på metanol, valgt fra slektene bestående av *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* og *Rhodotorula*. En liste over spesifikke arter som eksempler på denne klassen av gjær kan finnes i C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982).

30 Egnede vertsceller for ekspresjonen av glykosilert form av polypeptidene og antistoffene beskrevet her er avledet fra flercellede organismer. Eksempler på invertebratceller inkluderer insektceller som *Drosophila* S2 og *Spodoptera* Sf9, så vel som planteceller. Eksempler på egnede pattedyr-vertscellelinjer omfatter Kinesisk hamster ovarieceller (CHO)-celler og COS-celler. Mer spesifikke eksempler inkluderer apenyre-
 35 cellelinje CV1 transformert med SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), human embryonal nyrecellelinje (293 eller 293-celler subklonet for vekst i suspensjonskultur, Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 36:59 (1977)), Kinesisk hamster ovarieceller/-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)), muse-sertoli-celler (TM7, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980), humane lungeceller (W138, ATCC CCL 75), humane leverceller

(Hep G2, HB 8065) og musebrysttumor (MMT 060562, ATCC CCI51). Valget av den egnede vertscellen anses å ligge innenfor teknikkens stand.

3. Seleksjon og anvendelse av en replikerbar vektor

Nukleinsyre (f.eks. cDNA eller genomisk DNA) som koder for polypeptidene og antistoffene beskrevet her kan settes inn i en replikerbar vektor for kloning (amplifisering av DNAet) eller for ekspresjon. Forskjellige vektorer er offentlig tilgjengelig. Vektoren kan for eksempel foreligge i form av et plasmid, et kosmid, en viruspartikkel eller en bakteriofag. Den ønskede nukleinsyresekvens kan settes inn i vektoren ved en rekke forskjellige fremgangsmåter. Vanligvis settes DNA inn i ett eller flere egnede restriksjons- endonukleaseseter ved anvendelse av teknikker som er kjente innen faget. Vektorens bestanddeler inkluderer vanligvis én eller flere av en signalsekvens, et replikasjonsorigo, ett eller flere markørgener, et enhancerelement, en promoter og en transkripsjonstermineringssekvens. Konstruksjon av egnede vektorer som inneholder én eller flere av disse bestanddelene benytter standard ligeringsteknikker som er kjente blant fagfolk.

Rekombinant fremstilling av polypeptidene eller antistoffene kan oppnås ikke bare direkte, men også som et fusjonspolypeptid med et heterologt polypeptid. Den heterologe delen kan være en signalsekvens eller et annet polypeptid med et spesifikt spaltingssete i N-terminus av det modnede proteinet eller polypeptidet. Generelt kan signalsekvensen være en bestanddel av vektoren, eller den kan være en del av det DNAet som koder for polypeptidet eller antistoffet som settes inn i vektoren. Signalsekvensen kan være en prokaryot signalsekvens, for eksempel valgt fra gruppen som består av ledersekvenser for alkalisk fosfatase, penicillinase, lpp, eller varmestabilt enterotoksin II. For sekresjon i gjær kan signalsekvensen f.eks. være ledersekvensen fra invertase, ledeseekvensen fra alfafaktor (inkludert alfa-faktorledersekvensen fra *Saccaromyces* og *Kluyveromyces*, den siste er beskrevet i U.S. patentskrift nr. 5 010 182) eller ledersekvensen fra sur fosfatase, ledersekvensen fra glukamylase fra *C. albicans* (EP 362.179, publisert 4. april 1990), eller signalsekvensen som er beskrevet i WO90/13646, publisert 15. november 1990. For ekspresjon i pattedyrceller kan pattedyrsignalsekvenser anvendes for å styre sekresjon av proteinet, slik som signalsekvenser fra utskilte polypeptider fra samme art eller beslektede arter, så vel som virale sekretoriske ledersekvenser.

Både ekspresjonsvektorer og kloningsvektorer inneholder en nukleinsyresekvens som gjør vektoren istand til å replikere i én eller flere utvalgte vertsceller. Slike sekvenser er velkjente for en rekke bakterier, gjær og virus. Replikasjonsorigo fra plasmidet pBR322 er egnet for de fleste Gram-negative bakterier, origo fra 2 μ -plasmidet er egnet for gjær, og forskjellige virale replikasjonsorigo (SV40, polyoma, adenovirus, VSV eller BPV) er egnede for kloningsvektorer i pattedyrceller.

Ekspresjon- og kloningsvektorer vil typisk inneholde et seleksjonsgen, også betegnet en seleksjonsmarkør. Typisk seleksjonsgener koder for proteiner som (a) gir resistens overfor antibiotika eller andre toksiner, f.eks. ampicillin, neomycin, metotreksat

eller tetracyklin, (b) komplementerer auksotrofe mangler, eller (c) tilveiebringer nødvendige næringsstoffer som ikke er tilgjengelige fra komplekse medier, f.eks. genet som koder for D-alanin racemase for *Bacilli*.

Et eksempel på egnede seleksjonsmarkører for pattedyrceller er de som tillater
 5 identifikasjon av celler som er kompetente til å ta opp DNA-sekvensen som koder for polypeptidene eller antistoffene beskrevet her, f.eks. DHFR eller thymidinkinase. En egnet vertscelle når villtype DHFR benyttes, er CHO-cellelinjen som mangler DHFRaktivitet, fremstilt og oppformert som beskrevet av Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980). Et egnet seleksjonsgen for anvendelse i gjær er *trp1*-genet som foreligger i
 10 gjærplasmidet Yrp7 [Stinchcomb *et al.*, *Nature*, 282:39 (1979)], Kingsman *et al.*, *Gene*, 7:141 (1979), Tschemper *et al.*, *Gene*, 10:157 (1980)]. *trp1*-genet tilveiebringer en seleksjonsmarkør for en mutant stamme av gjær som mangler evnen til å vokse i tryptofan, for eksempel ATCC nr 44076 eller PEP4-1 [Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)].

Ekspresjons- og kloningsvektorer inneholder vanligvis en promoter som er operativt
 15 linket til de angjeldende DNA-sekvenser for å styre mRNA-syntesen. Promotere som gjenkjennes i en rekke mulige vertsceller er velkjente. Promotere som er egnede for anvendelse med prokaryote verter inkluderer β -laktamase og laktose-promotersystemer [Chang *et al.*, *Nature*, 275:615 (1978), Goeddel *et al.*, *Nature*, 281:544 (1979), alkalisk fosfatase, et tryptofan (*trp*)-promotersystem [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980),
 20 EP 36.776] og hybride promotere, f.eks. *tac*-promoteren [deBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983)]. Promotere for anvendelse i bakterielle systemer vil også inneholde en Shine-Dalgarno (S.D.)-sekvens som er operativt linket til slike DNA-sekvenser.

Eksempler på egnede promotersekvenser for anvendelse med gjærverter inkluderer promoteren for 3-fosfoglyceratkinase [Hitzeman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)] eller
 25 andre glykolytiske enzymer [Hess *et al.*, *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149 (1968), Holland, *Biochemistry*, 17:4900 (1978)], slik som enolase, glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase, heksokinase, pyruvat dekarboksylase, fosfofruktokinase, flukose-6-fosfat isomerase, 3-fosfoglyseratmutase, pyruvatkinase, triosefosfatisomerase, fosfoglukoseisomerase og glukokinase.

30 Andre gjærpromotere som er induserbare promotere med den ekstra fordel at transkripsjonen kontrolleres av vekstbetingelsene, er promoterområdene for alkohol-dehydrogenase 2, isocytokrom C, sur fosfatase, degraderende enzymer forbundet med nitrogenmetabolismen, metallotionein, glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase og enzymer som er ansvarlige for utnyttelsen av maltose og galaktose. Egnede vektorer og promotere
 35 for anvendelse ved ekspresjon i gjær er beskrevet videre i EP 73 657.

Transkripsjonen fra vektorer i pattedyrvertsceller kan for eksempel kontrolleres av promotere fremskaffet fra virusgenomer, slik som polyomavirus, fuglekoppevirus (UK 2 211 504, publisert 5. juni 1989), adenovirus (f.eks. adenovirus 2), bovin papillomavirus, fuglesarkomvirus, cytomegalovirus, et retrovirus, hepatitt-B-virus og apevirus 40

(SV40), fra heterologe pattedyrs promotere, f. eks. aktinpromoteren eller en immunglobulin-promoter, og fra varmesjokkpromotere, forutsatt at slike promotere er forenlige med vertscellesystemene.

Transkripsjon av nukleinsyre som koder for polypeptidene eller antistoffene her i
 5 høyere eukaryoter kan økes ved å sette en enhancersekvens inn i vektoren. Enhancere er
 cis-virkende DNA-elementer, vanligvis fra omkring 10 til 300 bp, som virker på en promoter
 slik at transkripsjonen økes. Mange enhancersekvenser er nå kjente fra pattedyrsgener
 (globin, elastase, albumin, α -fetoprotein og insulin). Typisk vil man imidlertid anvende en
 enhancer fra et eukaryot cellevirus. Eksempler inkluderer SV40-enhanceren fra den sene
 10 siden av replikasjonsorigo (bp 100-270), den tidlige promoterenhancer fra cytomegalovirus,
 polyomaenhanceren på den sene side av replikasjonsorigo og adenovirusenhancere.
 Enhanceren kan være spleiset inn i vektoren i en posisjon som ligger 5' eller 3' for den
 kodende sekvens, men er fortrinnsvis plassert i et sete som ligger 5' for promoteren.

Ekspresjonsvektorer som anvendes i eukaryote vertsceller (gjær, sopp, insektceller,
 15 planteceller, dyreceller, menneskeceller eller celler med kjerner fra andre flercellede
 organismer) vil også inneholde sekvenser som er nødvendige for termineringen av
 transkripsjonen og for stabilisering av mRNA. Slike sekvenser er alminnelig tilgjengelige fra
 de 5'- og, av og til 3' ikke-translaterte områdene i eukaryote eller virale DNA eller cDNA.
 Disse områdene inneholder nukleotidsegmenter som transkriberes som polyadenylerte
 20 fragmenter i den ikke-translaterte delen av mRNA som koder for polypeptidene eller
 antistoffene beskrevet her.

Ytterligere andre fremgangsmåter, vektorer og vertsceller som er egnede for å
 tilpasses til syntese av polypeptidene eller antistoffene beskrevet her i rekombinant
 vertebratcellekultur er beskrevet i Gething *et al.*, *Nature*, 293:620-625 (1981), Mantei
 25 *et al.*, *Nature*, 281:40-46 (1979), EP 117 060, og EP 117 058.

4. Deteksjon av genamplifisering/ekspresjon

Genamplifisering og/eller -ekspresjon kan måles direkte i en prøve, for eksempel i
 ved konvensjonell Southern-blotting, Northern-blotting for å kvantitere transkripsjonen av
 30 mRNA [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5202 (1980)], dot-blotting (DNA-
 analyse) eller *in situ*-hybridisering ved anvendelse av en hensiktsmessig merket probe,
 basert på sekvensene som tilveiebringes her. Alternativt kan det benyttes antistoffer som
 kan gjenkjenne spesifikke duplekser, inkludert DNA-duplekser, RNA-duplekser og DNA-RNA-
 hybridduplekser eller DNA-proteinduplekser. Antistoffene kan på sin side være merket, og
 35 analysen kan utføres hvor duplekset er bundet til en overflate, slik at ved dannelse av
 dupleks på overflaten kan nærvær av antistoff bundet til duplekset påvises.

Genekspresjonen kan alternativt måles ved immunologiske fremgangsmåter, slik
 som immunhistokjemisk farging av celler eller vevssnitt og analyse av cellekulturer eller
 kroppsvæsker for direkte kvantifisering av ekspresjonen av genproduktet. Antistoffer som er

anvendbare for immunhistokjemisk farging og/eller analyse av kroppsvæsker kan enten være monoklonale eller polyklonale, og de kan være fremstilt i ethvert pattedyr. Antistoffene kan med fordel være fremstilt mot polypeptidene beskrevet her eller mot et syntetisk peptid basert på DNA-sekvensene som tilveiebringes her, eller mot en eksogen sekvens fusjonert til DNA som koder for slike polypeptider og antistoffer og som koder for en spesifikk antistoffepitop.

5. Rensing av polypeptid

Former av polypeptidet kan gjenvinnes fra dyrkningsmedium eller fra vertscelle-lysater. Dersom proteinet er membranbundet kan det frigjøres fra membranen ved anvendelse av en egnet detergentløsning (f.eks. Triton-X 100) eller ved enzymatisk spalting. Celler som benyttes for ekspresjon av polypeptidene eller antistoffene beskrevet her kan brytes opp ved forskjellige fysiske eller kjemiske midler, slik som fryse-tine sykluser, ultralydbehandling, mekanisk oppbryting eller cellelyserende midler.

Det kan være ønskelig å rense polypeptidene eller antistoffene beskrevet her fra proteiner fra den rekombinante cellen eller fra andre polypeptider. De påfølgende fremgangsmåter er eksempler på egnede rensefremgangsmåter: ved fraksjonering på en ionebytterkolonne, etanol-felling, revers fase HPLC, kromatografi-på-kisegel eller på et kationbytterresin, slik som DEAE, kromatofokusering, SDS-PAGE, ammoniumsulfat-felling, gelfiltrering ved anvendelse av for eksempel Sephadex G-75, protein A Sepharosekolonne for å fjerne kontaminanter slik som IgG, og metallchelaterende kolonner for binding av epitopmerkede former av polypeptidet eller antistoffet. Forskjellige fremgangsmåter for proteinrensing kan benyttes, og slike fremgangsmåter er kjente innen faget og er beskrevet for eksempel i Deutscher, *Methods in Enzymology*, **182** (1990), Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982). Det/de valgte rensetrinn(ene) vil for eksempel avhenge av egenskapene til fremstillingsprosessen som anvendes og det angjeldende polypeptid eller antistoff som fremstilles.

B. Fremstilling av antistoff

I visse utførelser er det valgte protein et antistoff. Teknikker for fremstilling av antistoffer, inkludert polyklonale, monoklonale, humaniserte, dispesifikke og hetero-konjugerte antistoffer, følger.

1) *Polyklonale antistoffer*

Polyklonale antistoffer frembringes vanligvis i dyr ved multiple subkutane (sc) eller intraperitoneale (ip) injeksjoner av det relevante antigen og en adjuvans. Det kan være nyttig å konjugere det relevante antigen til et protein som er immunogent i artene som skal immuniseres, f.eks. hemocyanin fra albueskjell (KLH), serumalbumin, bovint thyroglobulin eller trypsininhibitor fra soyabønne, ved anvendelse av et bifunksjonelt middel eller

derivatiseringsmiddel, f.eks. maleimidobenzoylsulfosuksinimidester (konjugering via cysteinrester), N-hydroksysuksinimid (via lysinrester), glutaraldehyd, ravsyreanhydrid, SOCl_2 eller $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, hvor R og R^1 uavhengig av hverandre er lavere alkylgrupper. Eksempler på adjuvanser som kan benyttes inkluderer Freund's komplette adjuvans og MPL-
 5 TDM-adjuvans (monofosforyl Lipid A syntetisk trehalose dikorynomykolat). Immuniseringsprotokollen kan velges av en fagperson uten omfattende eksperimentering.

Dyrene immuniseres mot antigenet, de immunogene konjugatene eller derivatene ved å blande f.eks. 100 μg eller 5 μg av proteinet eller konjugatet (for kaniner henholdsvis mus) med 3 volumer Freund's komplette adjuvans og injiserer løsningen intradermalt på
 10 flere steder. Én måned senere gis dyrene en forsterkerinjeksjon med 1/5 til 1/10 av den opprinnelige mengden av peptid eller konjugat i Freund's komplette adjuvans ved subkutan injeksjon på flere steder. Sju til fjorten dager senere tappes dyrene for blod, og serumet analyseres for antistofftiter. Dyrene gir forsterkerinjeksjoner inntil titeret flater ut. Konjugater kan også fremstilles i rekombinant cellekultur som proteinfusjoner.
 15 Aggregeringsmidler som alum er også egnet til å forsterke immunresponsen.

2) Monoklonale antistoffer

Monoklonale antistoffer fremskaffes fra en populasjon i det vesentlige homogene antistoffer, dvs. at de enkelte antistoffene som utgjør populasjonen er identiske, bortsett fra
 20 mulige naturlig forekommende mutasjoner og/eller posttranslasjonelle modifikasjoner (f.eks. isomeriseringer, amideringer) som kan foreligge i mindre mengder. Adjektivet «monoklonal» indikerer på det vis karakteren til antistoffet som ikke å være en blanding av adskilte antistoffer.

De monoklonale antistoffer kan for eksempel fremstilles ved anvendelse av hybridomfremgangsmåten først beskrevet av Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), eller fremstilles ved rekombinant DNA-fremgangsmåter (U.S. patentskrift nr. 4 816 567).
 25

I hybridomfremgangsmåten immuniseres en mus eller et annet egnet vertsdyr, slik som en hamster, som beskrevet ovenfor for å frembringe lymfocytter som produserer eller er i stand til å produsere antistoffer som spesifikt vil bindes til proteinet som anvendes
 30 for immuniseringen. Alternativt kan lymfocytter immuniseres *in vitro*. Lymfocytene fusjoneres så med myelomceller ved anvendelse av et egnet fusjonsmiddel, slik som polyetylenglykol, slik at det dannes en hybridomcelle (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, s. 59-103 (Academic Press, 1986).

Immuniseringsmidlet vil typisk inkludere det antigene protein eller en fusjonsvariant
 35 derav. Vanligvis anvendes enten lymfocytter fra perifert blod («PBL'er») hvis celler av humant opphav er ønskelig, eller miltceller eller lymfeknuteceller hvis ikke-humane pattedyrskilder er ønskelig. Lymfocytene fusjoneres så til en immortalisert cellelinje ved anvendelse av et egnet fusjonsmiddel, slik som polyetylenglykol, for å danne en hybridom-

celle. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), s. 59-103.

Immortaliserte cellelinjer er vanligvis transformerte pattedyrsceller, fortrinnsvis myelomceller fra gnagere, storfe eller menneske. Vanligvis benyttes rotte- eller musemyelomcellelinjer. De således fremstilte hybridomcellene utsåes og dyrkes i et egnet dyrkningsmedium som fortrinnsvis inneholder én eller flere forbindelser som inhiberer vekst eller overlevelse av de ikke-fusjonerte utgangsmyelomcellene. Dersom f.eks. utgangsmyelomcellene mangler enzymet hypoxantin guanin fosforibosyl transferase (HGPRT eller HPRT) vil dyrkningsmediet for hybridomene typisk omfatte hypoxantin, aminopterin og thymidin (HAT-medium), hvor de foreliggende forbindelsene vil forhindre vekst av de HGPRT-manglende celler.

Foretrukne immortaliserte myelomceller er de som fusjonerer effektivt, understøtter stabil dannelse av antistoff i høyt nivå av de valgte antistoffproduserende cellene og er følsomme for et medium slik som HAT-medium. Blant disse foretrekkes musemyelomlinjer, slik som de som er avledet fra musetumorene MOPC-21 og MPC-11, tilgjengelige fra Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, USA, og SP-2-celler (og derivater av disse, f.eks. X63-Ag8-653), som er tilgjengelige fra American Type Culture Collection, Manassus, Virginia, USA. Humane myelomcellelinjer og muse-humane heteromyelomcellelinjer er også beskrevet forproduksjon av humane monoklonale antistoffer (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984), Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, s. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York. 1987).

Dyrkningsmedium som hybridomcellene vokser i, analyseres for produksjon av monoklonale antistoffer rettet mot antigenet. Bindingsspesifisiteten til de monoklonale antistoffene som dannes av hybridomceller bestemmes fortrinnsvis ved immunpresipitering eller ved en *in vitro*-bindingsanalyse, slik som radioimmunanalyse (RIA) eller enzymkoblet immunabsorpsjonsanalyse (ELISA).

Dyrkningsmediet som hybridomcellene er dyrket i, kan analyseres for nærvær av monoklonale antistoffer rettet mot det ønskede antigen. Bindingsaffiniteten og spesifisiteten til det monoklonale antistoffet kan fortrinnsvis bestemmes ved immunpresipitering eller ved en *in vitro*-bindingsanalyse, f.eks. en radioimmunanalyse (RIA) eller enzymkoblet analyse (ELISA). Slike teknikker og analyser er kjente innen faget. For eksempel kan bindingsaffiniteten kan bestemmes ved Scatchard analyse ifølge Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Etter identifisering av hybridomceller som produserer antistoffer med den ønskede spesifisiteten, affiniteten og/eller aktiviteten, kan klonene subklones ved begrensende fortynnings prosedyrer og dyrkes ved standardfremgangsmåter (Goding, *supra*). Egnede dyrkningsmedier for dette formål inkluderer for eksempel D-MEM, eller RPMI-1640-medium. I tillegg kan hybridomcellene dyrkes *in vivo* som ascites-tumorer i et pattedyr.

De monoklonale antistoffer som utskilles av subklonene separeres fortrinnsvis fra dyrkningsmediet, ascites-væsken eller serum ved konvensjonelle fremgangsmåter for rensing av immunglobulin, f.eks. protein A-Sepharose, hydroksyapatitkromatografi, gelelektroforese, dialyse eller affinitetskromatografi.

- 5 Monoklonale antistoffer kan også fremstilles ved rekombinant DNA-fremgangsmåter, slik som de som er beskrevet i U.S. patentskrift nr. 4 816 567 og som beskrevet ovenfor. DNA som koder for de monoklonale antistoffene kan lett isoleres og sekvenseres ved anvendelse av konvensjonelle fremgangsmåter (f.eks. ved anvendelse av oligonukleotid-prober som er istand til å bindes spesifikt til gener som koder for tunge og lette kjeder fra
10 museantistoffer). Hybridomcellene fungerer som en foretrukket kilde for slik DNA. Når det først er isolert kan det DNA plasseres inn i ekspresjonsvektorer, som så transfekteres inn i vertsceller som *E. coli*-celler, ape-COS-celler, kinesisk hamster-ovarieceller (CHO)-celler eller myelomceller som ellers ikke produserer immunglobulinprotein, for å syntetisere monoklonale antistoffer i slike rekombinante vertsceller. Oversiktsartikler om rekombinant
15 ekspresjon i bakterier av DNA som koder for antistoffet inkluderer Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) og Pluckthun, *Immunol. Revs.* 130:151-188 (1992).

- I en videre utførelsesform kan antistoffer isoleres fra antistoffbiblioteker i bakteriofager, fremstilt ved anvendelse av teknikkene beskrevet i McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) og Marks *et al.*, *J. Mol.*
20 *Biol.*, 222:581-597 (1991) beskriver isolering av museantistoffer henholdsvis humane antistoffer ved anvendelse av bakteriofagbiblioteker. Senere publikasjoner beskriver fremstilling av humane antistoffer med høy affinitet (i nM-området) ved kjedestokking (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), så vel som kombinatorisk infeksjon og *in viro*-rekombinasjon som en strategi for konstruksjon av svært store bakteriofagbiblioteker
25 (Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993)). På det vis er disse teknikkene levedyktige alternativer til tradisjonelle monoklonale antistoff hybridomteknikker for isolering av monoklonale antistoffer.

- DNAet kan også modifiseres, for eksempel ved å erstatte den kodende sekvens for humane konstante tunge og lette kjededomener i stedet for de homologe muse-sekvensene
30 (U.S. patentskrift nr. 4 816 567, Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), eller ved kovalent å koble hele eller en del av den kodende sekvens for et ikke-immunglobulinpeptid til den kodende immunglobulinsekvens. Slike ikke-immunglobulin-polypeptider erstatter typisk de konstante domenene i et antistoff, eller de erstatter de variable domenene i ett antigen-bindingssete i et antistoff for å danne et kimert, bivalent
35 antistoff som omfatter ett antigen-bindingssete med spesifisitet for et antigen og et annet antigen-bindingssete med spesifisitet for et annet antigen.

De monoklonale antistoffene beskrevet her kan være monovalente, og fremstilling av slike er velkjent innen faget. Én fremgangsmåte involverer for eksempel rekombinant ekspresjon av immunglobulin lett kjede og en modifisert tung kjede. Den tunge kjeden er

avkortet, vanligvis i hvilket som helst punkt i Fc-området, for å forhindre kryssbinding mellom den tunge kjedene. Alternativt kan de relevante cysteinrestene være erstattet med en annen aminosyrerest eller delert, slik at kryssbinding forhindres. *In vitro*-fremgangsmåter er også egnede for fremstilling av monovalente antistoffer. Spalting av antistoffer for fremstilling av fragmenter derav, fortrinnsvis Fab-fragmenter, kan oppnås ved anvendelse av rutinemessige teknikker som er kjente innen faget.

Kimere eller hybridantistoffer kan også fremstilles *in vitro* ved anvendelse av kjente fremgangsmåter innen syntetisk proteinkjemi, inkludert de som involverer kryssbindende midler. For eksempel kan immuntoksiner konstrueres ved anvendelse av en disulfid-utbyttingsreaksjon eller ved dannelse av en tioeterbinding. Eksempler på egnede reagenser for dette formål inkluderer iminotiolat og metyl-4-merkaptobutyrimidat.

3) Humaniserte antistoffer

Antistoffene kan videre omfatte humaniserte eller humane antistoffer. Humaniserte former av ikke-humane antistoffer (f.eks. fra mus) er kimere immunglobuliner, immunglobulinkjeder eller fragmenter derav (f.eks. Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ eller andre antigenbindende undersekvenser av antistoffer) som inneholder en minimal mengde sekvens avledet fra ikke-humant immunglobulin. Humaniserte antistoffer inkluderer humane immunglobuliner (mottakerantistoff) hvor aminosyrerester fra et komplementaritetsbestemmende område (CDR) i mottakeren er erstattet med aminosyrerester fra en CDR fra en ikke-human art (donorantistoff), slik som mus, rotte eller kanin, med den ønskede spesifisitet, affinitet og kapasitet. I noen tilfeller erstattes Fv-rammeverksaminosyrerester i det humane immunglobulinet med korresponderende ikke-humane aminosyrerester. Humaniserte antistoffer kan også omfatte aminosyrerester som verken finnes i mottakerantistoffet eller i de importerte CDR eller rammeverkssekvensene. Generelt vil det humaniserte antistoffet omfatte i det vesentlige hele av minst ett, typisk to variable domener, hvor alle eller i det vesentlige alle CDR-områdene tilsvarer de fra et ikke-humant immunglobulin, og alle, eller i det vesentlige alle FR-områdene er de fra en human immunglobulin-konsensussekvens. Det humaniserte antistoff kan også om ønskelig omfatte i det minste en del av et konstant immunglobulinområde (Fc), typisk det fra et humant immunglobulin. Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986), Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988) og Presta, *Curr. Opin. Struc. Biol.* 2:593-596 (1992).

Fremgangsmåter for humanisering av ikke-humane antistoffer er velkjente innen faget. Vanligvis har et humanisert antistoff fått innført én eller flere aminosyrerester i seg fra en kilde som er ikke-human. Disse ikke-humane aminosyrerestene betegnes ofte som «import» aminosyrerester og er typisk tatt fra et variabelt «import»-domene.

Humaniseringen kan i det vesentlige utføres ved å følge fremgangsmåten til Winter og medarbeidere, Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986), Riechmann et al., *Nature* 332:323-327 (1988), Verhoeyen et al., *Science* 239:1534-1536 (1988), eller ved å erstatte CDR'er

eller CDR-sekvenser fra gnagere med de tilsvarende sekvensene i et humant antistoff. Følgelig er slike «humaniserte» antistoffer kimere antistoffer (U.S. patentskrift nr. 4 816 567) hvor vesentlig mindre enn et intakt humant variabelt domene er blitt erstattet med den tilsvarende sekvens fra en ikke-human art. I praksis er humaniserte antistoffer typisk humane antistoffer i hvilke noen CDR-aminosyrerester, og muligens noen FR-aminosyrerester, er erstattet med aminosyrerester fra analoge steder i gnagerantistoffer.

Valget av humane variable domener, både lette og tunge, som skal anvendes for fremstilling av de humaniserte antistoffene er svært viktig for å redusere antigenisiteten. Ifølge den såkalte «beste tilpasning»-fremgangsmåten screenes sekvensen av det variable domenet i et gnagerantistoff mot hele biblioteket av kjente humane variabelt domene-sekvenser. Den humane sekvens som ligger nærmest til den fra gnageren velges så som det humane rammeverk (FR) for det humaniserte antistoffet. Sims *et al.*, *J. Immunol.*, **151**:2296 (1993), Chotia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **196**:901 (1987). En annen fremgangsmåte anvender et bestemt rammeverk avledet fra konsensussekvensen til alle humane antistoffer fra en bestemt undergruppe av lette eller tunge kjeder. Det samme rammeverk kan anvendes for flere forskjellige humaniserte antistoffer. Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**:4285 (1992), Presta *et al.*, *J. Immunol.*, **151**:2623 (1993).

Det er videre viktig at antistoffer humaniseres med bevaring av den høye affinitet for antigenet og andre fordelaktige biologiske egenskaper. For å oppnå dette målet fremstilles humaniserte antistoffer ifølge en foretrukket fremgangsmåte ved en prosess med analyse av utgangssekvensene og forskjellige tenkte humaniserte produkter ved anvendelse av tredimensjonelle modeller av utgangssekvensen og de humaniserte sekvensene. Tredimensjonelle immunglobulinmodeller er alminnelig tilgjengelig og er velkjente blant fagfolk. Datamaskinprogrammer er tilgjengelig som illustrerer og fremviser sannsynlige tredimensjonelle konformasjonsstrukturer av utvalgte immunglobulinsekvenskandidater. Undersøkelse av disse fremvisningene tillater analyse av den sannsynlige rollen til aminosyrerestene når det gjelder funksjonen til immunglobulinsekvenskandidaten, dvs. analysen av aminosyrerester som påvirker immunglobulinkandidatens evne til å binde sitt antigen. På denne måten kan FR-aminosyrerester velges og kombineres fra mottaker og importsekvensene slik at de ønskede antistoffegenskaper, slik som forhøyet affinitet for målantigenet/ene oppnås. Generelt er det CDR-aminosyrerestene som direkte og i størst grad er involvert i å påvirke antigenbindingen.

Forskjellige former av det humaniserte antistoff er påtenkt. Det humaniserte antistoff kan for eksempel være et antistoff-fragment, slik som et Fab, som om ønskelig er konjugert til ett eller flere cytotoksiske midler slik at det dannes et immunkonjugat. Alternativt kan det humaniserte antistoffet være et intakt antistoff, slik som et intakt IgG1-antistoff.

4) Humane antistoffer

Som et alternativ til humanisering kan humane antistoffer frembringes. Det er for eksempel nå mulig å fremstille transgene dyr (f.eks. mus) som etter immunisering er istand til å danne et fullt repertoar av humane antistoffer i fravær av endogen immunglobulin-dannelse. Det har for eksempel blitt beskrevet at homozygot delesjon av genet for antistoffets tunge kjede-koblingsområde (J_H) i kimere og kimcellelinje-muterte mus fører til fullstendig inhibering av den endogene antistoffdannelsen. Overføring av den humane kimcellelinje-immunglobulingensamling til slike kimcellelinjemutante mus vil føre til dannelse av humane antistoffer etter stimulering med antigen. Se f.eks. Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:2551 (1993), Jakobovits *et al.*, *Nature*, **362**:255-258 (1993), Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*, **7**:33 (1993), U.S. patentskrift nr. 5 591 669 og WO97/17852.

Alternativt kan bakteriofagfremvisningsteknologi anvendes for fremstilling av humane antistoffer og antistoff-fragmenter *in vitro* fra repertoarer av immunglobuliners variable (V) domene-gen fra ikke-immuniserte donorer. McCafferty *et al.*, *Nature* **348**:552-553 (1990), Hoogenboom og Winter, *J. Mol. Biol.* **227**:381 (1991). Ifølge denne teknikken klones antistoff-V-domenegener med opprettholdt leseramme inn i enten et stort eller mindre kappeproteingen fra en filamentøs bakteriofag, slik som M13 eller fd, og fremvises som funksjonelle antistoff-fragmenter på overflaten av bakteriofagpartikkelen. Fordi den filamentøse partikkelen inneholder en enkelttrådet DNA-kopi av bakteriofaggenomet fører seleksjon basert på de funksjonelle egenskapene til antistoffet også til seleksjon av genet som koder for antistoffet som oppviser disse egenskapene. Således etterligner bakteriofagen noen av egenskapene til B-cellen. Bakteriofagfremvisning kan utføres i en rekke formater, gjennomgått i f.eks. Johnson, Kevin S. og Chiswell, David J. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **3**:564-571 (1993). Flere kilder for V-gensegmenter kan anvendes for bakteriofagfremvisning. Clackson *et al.*, *Nature* **352**:624-628 (1991) isolerte et bredt utvalg av anti-oksazolon-antistoffer fra et lite, tilfeldig kombinatorisk bibliotek av V-gener avledet fra milten fra immuniserte mus. Et repertoar av V-gener fra ikke-immuniserte humane donorer kan konstrueres, og antistoffer mot et bredt utvalg av antigener (inkludert selvantigener) kan isoleres ved i det vesentlige å følge teknikkene - Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* **222**:581-597 (1991) eller Griffith *et al.*, *EMBO J.* **12**:725-734 (1993). Se også US-Patentskrifter Nr 5.565.332 og 5.573.905.

Teknikkene til Cole *et al.*, og Boerner *et al.*, er også tilgjengelige for fremstilling av humane monoklonale antistoffer (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, s. 77 (1985) og Boerner *et al.*, *J. Immunol.* **147**(1):86-95 (1991). På tilsvarende måte kan humane antistoffer fremstilles ved å introdusere humane immunglobulinloci inn i transgene dyr, f.eks. mus hvor de endogene immunglobulingenene delvis eller fullstendig er blitt inaktivert. Etter stimulering observeres en produksjon av humant antistoff som i stor grad likner på den som sees hos mennesker i alle henseender, inkludert genrearrangering, gensammensetting og antistoffrepertoar. Denne tilnærmingen er

beskrevet f.eks. i U.S. patentskrift nr. 5 545 807, 5 545 806, 5 569 825, 5 625 126, 5 633 425, 5 661 016 og i følgende vitenskapelige publikasjoner: Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992), Lonberg *et al.*, *Nature* 368:856-859 (1994), Morrison, *Nature* 368:812-13 (1994), Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14:845-51 (1996), Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996) og Lonberg og Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995).

Endelig kan humane antistoffer også dannes *in vitro* av aktiverte B-celler (se U.S. patentskrift nr. 5 567 610 og 5 229 275).

10 5) Antistoff-fragmenter

Under visse forhold er det fordelaktig å anvende antistoff-fragmenter heller enn hele antistoffer. Mindre fragmentstørrelse tillater hurtig clearance og kan føre til forbedret tilgang til faste tumorer.

Forskjellige teknikker er blitt utviklet for fremstilling av antistoff-fragmenter.

15 Tradisjonelt ble disse fragmentene fremskaffet ved proteolytisk spalting av intakte antistoffer (se f. eks. Morimoto *et al.*, *J. Biochem. Biophys. Method.* 24:107-117 (1992), og Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985)). Disse fragmentene kan imidlertid nå fremstilles direkte av rekombinante vertsceller. Fab-, Fv- og scFv-antistoff-fragmenter kan alle uttrykkes i, og utskilles av *E. coli*, noe som tillater den lettvinde produksjonen av store
20 mengder av disse fragmentene. Antistoff-fragmenter kan isoleres fra antistoffbibliotekene i bakteriofager som diskutert ovenfor. Alternativt kan Fab'-SH-fragmenter gjenvinnes direkte fra *E. coli* og sammenkobles kjemisk for å danne F(ab')₂-fragmenter (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Ifølge en annen tilnærming kan F(ab')₂-fragmenter isoleres direkte fra rekombinante vertscellekulturer. Fab og F(ab')₂ med forlenget
25 halveringstiden *in vivo*, er beskrevet i U.S. patentskrift nr. 5 869 046. I andre utførelsesformer er det valgte antistoff et enkeltkjedet Fv-fragment (scFv). Se WO93/16185, U.S. patentskrift nr. 5 571 894 og U.S. patentskrift nr. 5 587 458. Antistoff-fragmentet kan også være et «lineært antistoff», f.eks. som beskrevet i U.S. patentskrift nr. 5 641 870. Slike lineære antistoff-fragmenter kan være monospesifikke eller bispesifikke.

30

6) Antistoffavhengig enzym-mediert prodrugbehandling (ADEPT)

Antistoffene ifølge foreliggende oppfinnelse kan også anvendes i ADEPT ved å konjugere antistoffet til et prodrugaktiverende enzym som omdanner et prodrug (f.eks. et peptidylderivat av et kjemoterapeutisk middel, se WO81/01145) til et aktivt anti-canser
35 medikament. Se for eksempel WO88/07378 og U.S. patentskrift nr. 4 975 278.

Enzymbestanddelen i immunkonjugatet som er anvendbart for ADEPT inkluderer ethvert enzym som kan virke på et prodrug på en slik måte at det omdannes til dets mer aktive, cytotoksiske form.

Enzymer som er anvendbare i fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter, glykosidase, glukoseoksidase, humant lysozym, human glukoronidase, alkalisk fosfatase, anvendbar for å omdanne fosfatholdige prodruger til frie medikamenter, arylsulfatase, anvendbar for å omdanne sulfatholdige prodruger til frie medikamenter, cytosindeaminase, anvendbar for å omdanne ikke-toksisk 5-fluorcytosin til kreft- medikamentet 5-fluoruracil, protease slik som serratia-protease, termolysin, subtilisin, karboksypeptidaser (f.eks. karboksypeptidase G2 og karboksypeptidase A) og katepsiner (slik som katepsin B og L), som er anvendbare for å omdanne peptidholdige prodruger til frie medikamenter, D-alanylkarboksypeptidaser, anvendbare for å anvende prodruger som inneholder D-aminosyresubstituent, karbohydratspaltende enzymer som β -galaktosidase og neuraminidase, anvendbare for å omdanne glykosilerte prodruger til frie medikamenter, β -laktamase, anvendbar for å omdanne medikamenter derivatisert med β -laktamer til frie medikamenter, og penicillinamidaser, slik som penicillin Vamidase eller penicillin G amidase, anvendbare for å omdanne medikamenter derivatisert i aminnitrogenene med fenoksyacetyl- eller fenylacetylgrupper til frie medikamenter. Alternativt kan antistoffer med enzymatisk aktivitet, også kjent innen faget som «abzymer», anvendes for å omdanne prodrugene ifølge oppfinnelsen til frie, aktive medikamenter (se f.eks. Massey, *Nature* 328:457-458 (1987)). Antistoff-abzymkonjugater kan fremstilles som beskrevet her for levering av abzymet til en tumorcellepopulasjon.

Enzymene som er nevnt ovenfor kan bindes kovalent til polypeptidet eller anti-stoffene beskrevet her ved teknikker som er velkjente innen faget, slik som anvendelse av de heterobifunksjonelle kryssbindende midlene som er diskutert ovenfor. Alternativt kan det konstrueres fusjonsproteiner som omfatter i det minste det antigenbindende området fra antistoffet, koblet til i det minste en funksjonell aktiv del av et enzym ifølge oppfinnelsen ved anvendelse av rekombinant DNA-teknikker som er velkjente innen faget (se f.eks. Neuberger *et al.*, *Nature* 312:604-608 (1984)).

7) Bispesifikke og polyspesifikke antistoffer

Bispesifikke antistoffer (BsAbs) er antistoffer med bindingsspesifisitet for minst to forskjellige epitoper, inkludert epitoper på samme protein eller på forskjellige proteiner. Alternativt kan én arm være utstyrt slik at den bindes til målantigenet, mens en annen arm kan være kombinert med en arm som bindes til et utløsende molekyl på en leukocyt, slik som et T-cellereseptor molekyl (f.eks. CD3) eller Fc-reseptorer for IgG (Fc γ R), f.eks. Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) og Fc γ RIII (CD16), slik at cellulære forsvarsmekanismer fokuseres og lokaliseres til den målantigenuttrykkende celle. Slike antistoffer kan avledes fra fullengde-antistoffer eller antistoff-fragmenter (f.eks. F(ab')₂-bispesifikke antistoffer).

Bispesifikke antistoffer kan også anvendes for å lokalisere cytotoksiske midler til celler som uttrykker målantigenet. Slike antistoffer innehar én arm som binder det ønskede antigen og en annen arm som binder det cytotoksiske middel (f.eks. saporin, antiinterferon-

a, vinca-alkaloid, ricin A-kjede, metotreksat eller radioaktiv isotop-hapten). Eksempler på kjente bispesifikke antistoffer inkluderer anti-ErbB2/anti-FcgRIII (WO96/16673), anti-ErbB2/anti-FcgRI (U.S. patentskrift nr. 5.837.234) og anti-ErbB2/anti-CD3 (U.S. patentskrift nr. 5.821.337).

5 Fremgangsmåter for fremstilling av bispesifikke antistoffer er kjente innen faget. Tradisjonell fremstilling av fullengde bispesifikke antistoffer bygger på koekspresjon av to immunglobulin tung kjede-lett kjedepar hvor de to kjedene har forskjellig spesifisitet. Millstein *et al.*, *Nature*, 305:537-539 (1983). På grunn av tilfeldig utvalg av immunglobulin-tunge og lette kjeder danner disse hybridomene (kvadromer) en teoretisk blanding av 10
10 forskjellige antistoffmolekyler, av hvilke kun ett har den korrekte, bispesifikke struktur. Rensing av det korrekte molekyl, noe som vanligvis gjøres ved affinitetskromatografitrinn, er temmelig tungvint, og produktutbyttet er lavt. Tilsvarende fremgangsmåter er beskrevet i WO93/08829 og i Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

Ifølge en annen tilnærming fusjoneres variable antistoffdomener med den ønskede
15 bindingsspesifisitet (antistoff-antigen-bindings seter) til konstante immunglobulindomene-sekvenser. Fusjonen er fortrinnsvis med et konstant domene fra en immunglobulinkjede som omfatter i det minste en del av hengselområdet, CH2-området og CH3-området. Det foretrekkes å ha det første konstante tung kjedområdet (CH1), som inneholder setet som er nødvendig for binding av den lette kjeden, tilstede i minst én av fusjonene. DNA som
20 koder for immunglobulin-tung kjedefusjonene og, om ønskelig, immunglobulinden lette kjeden, settes inn i separate ekspresjonsvektorer og kotransfekteres inn i en egnet vertsorganisme. Dette tillater stor fleksibilitet når det gjelder å justere det relative forhold mellom de tre polypeptidfragmentene i utførelser hvor et ujevnt forhold mellom de tre polypeptidkjedene som anvendes i konstruksjonen gir optimalt utbytte. Det er imidlertid
25 mulig å innsette den kodende sekvensen på to eller alle tre polypeptidkjeder i én ekspresjonsvektor dersom ekspresjonen av minst to polypeptidkjeder i samme forhold fører til høyt utbytte eller dersom forholdet mellom kjedene ikke er av spesiell betydning.

I en foretrukket utførelse av denne tilnærmingen består de bispesifikke antistoffene av en hybrid immunglobulin-tung kjede med en første bindingsspesifisitet i én arm og et
30 hybrid immunglobulinkjede-lett kjedepar (som tilveiebringer en andre bindingsspesifisitet) i den andre armen. Det ble funnet at denne asymmetriske strukturen letter separasjon av den ønskede, bispesifikke forbindelse fra uønskede immunglobulinkjede kombinasjoner, i og med at nærvær av en immunglobulin lett kjede i kun én halvpart av de bispesifikke molekylerne tilveiebringer en enkel fremgangsmåte for separasjons. Denne tilnærmingen er beskrevet i
35 WO94/04690. For ytterligere detaljer vedrørende fremstilling av bispesifikke antistoffer, se for eksempel Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology* 121:210(1986).

Ifølge en annen tilnærming beskrevet i WO96/27011 eller U.S. patentskrift nr. 5.731.168, kan grenseflaten mellom et par av antistoffmolekyler modifiseres for å maksimere prosentandelen av heterodimerer som gjenvinnes fra en rekombinant cellekultur.

Den foretrukne grenseflate omfatter i det minste en del av CH₃-området i et konstant antistoffdomene. I denne fremgangsmåten erstattes én eller flere små aminosyresidekjeder fra grenseflaten i det første antistoffmolekyl med større sidekjeder (f.eks. tyrosin eller tryptofan). Kompenserende «hulrom» med identisk eller tilsvarende størrelse som den eller de store sidekjedene dannes på grenseflaten til det andre antistoffmolekylet ved å erstatte store aminosyresidekjeder med mindre (f.eks. alanin eller treonin). Dette tilveiebringer en mekanisme for å øke utbyttet av heterodimeren fremfor andre, uønskede sluttprodukter, slik som homodimerer.

Teknikker for fremstilling av bispesifikke antistoffer fra antistoff-fragmenter er beskrevet i litteraturen. For eksempel kan bispesifikke antistoffer fremstilles ved anvendelse av kjemisk sammenkobling. Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985) beskriver en fremgangsmåte hvor intakte antistoffer spaltes proteolytisk for å danne F(ab')₂ fragmenter. Disse fragmentene reduseres i nærvær av det tiolkompleksbindende middel natriumarsenitt for å stabilisere vicinale ditioler og forhindre intermolekylær disulfiddannelse. De dannede Fab'-fragmentene omdannes så til tionitrobenzoat (TNB)derivater. Ett av Fab'-TNB-derivatene tilbakedannes så til Fab'-TNB-derivatet for å danne det bispesifikke antistoff. De fremstilte bispesifikke antistoffene kan anvendes som midler for selektiv immobilisering av enzymer.

Fab'-fragmenter kan direkte gjenvinnes fra *E. coli* og sammenkobles kjemisk for å danne bispesifikke antistoffer. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992) beskriver fremstilling av fullt ut humaniserte, bispesifikke antistoff-F(ab')₂-molekyler. Hvert av Fab'-fragmentene ble separat utskilt fra *E. coli* og utsatt for en styrt kjemisk sammenkobling *in vitro* for å danne det bispesifikke antistoff. Det således dannede bispesifikke antistoff var istand til å bindes til celler som overuttrykker ErbB2-reseptoren og normale humane T-celler, så vel som utløse den lytiske aktivitet av humane cytotoksiske lymfocytter mot humane brysttumormål.

Forskjellige teknikker for fremstilling og isolering av bivalente antistoff-fragmenter direkte fra rekombinant cellekultur er også beskrevet. For eksempel er bivalente heterodimerer blitt fremstilt ved anvendelse av leucin-«zipper». Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Leucin-«zipper»-peptidene fra proteinene Fos og Jun ble koblet til Fab'-delene fra to forskjellige antistoffer ved genfusjon. Antistoff-homodimerene ble redusert i hengselområdet for å danne monomerer, og så reoksidert for å danne antistoff-heterodimerene. «Diastoff»-teknikken beskrevet av Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) utgjør en alternativ mekanisme for fremstilling av bispesifikke/bivalente antistoff-fragmenter. Fragmentene omfatter et variabelt tung kjededomene (V_H) bundet til et variabelt lett kjededomene (V_L) via en linker som er for kort til å tillate parring mellom de to domenene i samme kjede. Følgelig tvinges V_H og V_L-domenet i ett fragment til å danne par med de komplementære V_L og V_H-domenene i et annet fragment, hvorved det dannes to antigen-bindings seter. En annen strategi for

fremstilling av bispesifikke/bivalente antistoff-fragmenter ved anvendelse av enkeltkjede Fv (sFv)-dimerer er også rapportert. Se Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Antistoffer med mer enn to valenser er påtent. For eksempel kan det fremstilles trispesifikke antistoffer. Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147:60 (1991).

Eksempelvis bispesifikke antistoffer kan bindes til to forskjellige epitoper på et bestemt molekyl. Alternativt kan en anti-proteinarm kombineres med en arm som bindes til et utløsende molekyl på en leukocyt, f.eks. et T-cellereseptormolekyl (f.eks. CD2, CD3, CD28 eller B7), eller Fc-reseptorer for IgG (Fc γ R), f.eks. Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) og Fc γ RIII (CD16), slik at de cellulære forsvarsmekanismene fokuseres på cellen som uttrykker det angjeldende protein. Bispesifikke antistoffer kan også anvendes for å lokalisere cytotoksiske midler til celler som uttrykker et bestemt protein. Slike antistoffer innehar en proteinbindende arm og en arm som binder et cytotoksisk middel eller en chelator for en radioaktiv isotop, f.eks. EOTUBE, DPTA, DOTA eller TETA. Et annet bispesifikt antistoff av interesse binder proteinet av interesse og videre vevsfaktor (TF).

6) Heterokonjugatantistoffer

Heterokonjugatantistoffer består av to kovalent sammenbundne antistoffer. Ett av antistoffene i heterokonjugatet kan for eksempel være koblet til avidin og det andre til biotin. Slike antistoffer er for eksempel blitt foreslått for å styre immunsystemceller til uønskede celler, U.S. patentskrift nr. 4 676 980, og for behandling av HIV-infeksjon, WO91/00360, WO92/200373 og EP 0308936. Det er påtenkt at antistoffene kan fremstilles *in vitro* ved kjente fremgangsmåter innen syntetisk proteinkjemi, inkludert fremgangsmåter som omfatter kryssbindingsmidler. For eksempel kan immuntoksiner fremstilles ved anvendelse av en disulfidutbytningsreaksjon eller ved dannelsen av en tioeterbinding. Eksempler på egnede reagenser for dette formål inkluderer iminotiolat og metyl-4-merkaptobutyrimidat og midlene som for eksempel er beskrevet i U.S. patentskrift nr. 4 676 980. Heterokonjugatantistoffer kan fremstilles ved anvendelse av enhver egnet kryssbindingsfremgangsmåte. Egnede kryssbindingsmidler er velkjente innen faget og er beskrevet i U.S. patentskrift nr. 4 676 980, sammen med en rekke kryssbindingsteknikker.

7) Modifisering av effektorfunksjoner

Det kan være ønskelig å modifisere antistoffet ifølge oppfinnelsen med hensyn til effektorfunksjoner, for å forsterke effektiviteten til antistoffet når det gjelder behandling av kreft. For eksempel kan én eller flere cysteinrester innføres i Fc-området, slik at disulfidbindingsdannelse mellom kjedene tillates i dette området. Det således fremstilte homodimere antistoff kan ha forbedret internaliseringsevne og/eller økt komplementmediert celledreping og antistoffavhengig cellulær cytotoxicitet (ADCC). Se Caron *et al.*, *J. Exp. Med.* 176:1191-1195 (1992) og Shopes, *J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992). Homodimere antistoffer med forbedret anti-tumoraktivitet kan også fremstilles ved

anvendelse av heterobifunksjonelle kryssbindere som beskrevet i Wolff *et al.*, *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). Alternativt kan et antistoff modifieres slik at det har to Fc-områder, og som derfor kan ha forhøyet komplementlyseevne og ADCC-evne. Se Stevenson *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989).

5

8) Immunkonjugater

Oppfinnelsen relaterer også til immunkonjugater som omfatter et antistoff konjugert til et cytotoxisk middel, slik som et kjemoterapeutisk middel, et toksin (f.eks. et enzymatisk aktivt toksin fra bakterier, sopp, planter eller dyr, eller fragmenter derav) eller en radioaktiv isotop (dvs. et radiokonjugat).

10

Kjemoterapeutisk aktive midler som er anvendbare for fremstilling av slike immunkonjugater omfatter BCNU, streptozocin, vincristin, vinblastin, adriamycin og 5-fluoruracil.

Enzymatisk aktive toksiner og fragmenter av slike som kan anvendes omfatter difteri A-kjede; ikke-bindende, aktive fragmenter av difteritoksin, eksotoksin A-kjede (fra *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A-kjede, abrin A-kjede, modeccin A-kjede, alfa-sarcin, *Aleuritis fordii*-proteiner, diantinproteiner, *Phytolaca americana*-proteiner (PAPI, PAPII og PAP-S), momordica charantia-inhibitor, curcin, krotin, sapaonaria officinalis-inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, fenomycin, enomycin og tricotecener.

15

20

Konjugater mellom antistoffet og det cytotoxiske middel fremstilles ved anvendelse av en rekke bifunksjonelle proteinkoblingsmidler, slik som N-suksinimidyl-3-(2pyridylditiol) propionat (SPDP), iminotiolan (IT), bifunksjonelle derivater av imidoestere (slik som dimetyladiipimidat-HCL), aktive estere (slik som disuksinimidylsuberat), 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 ricin-immuntoksin fremstilles som beskrevet i Vitetta *et al.*, *Science*, 238:1098 (1987). Karbon-14-¹ isotiocyanatobenzyl-3-metyldietylen triaminpentaeddiksyre (MX-DTPA) er et eksempel på et chelateringsmiddel for konjugering av en radioaktiv isotop til antistoffet. Se WO94/11026. Linkeren kan være en «spaltbar linker», noe som letter frigjøringen av det cytotoxiske medikament i cellen. For eksempel kan en syrelabil linker, en peptidasesensitiv linker, en dimetyl linker eller en disulfidholdig linker (Chari *et al.*, *Cancer Res.* 52:127-131 (1992) anvendes.

25

30

35

I tillegg påtenkes også lavmolekylære toksiner som calicheamicin, maytansin (U.S. patentskrift nr. 5 208 020), trioten og CC1065 også som konjugerbare toksiner for anvendelse i formuleringen ifølge oppfinnelse. I én utførelse kan fullengde-antistoff eller antigenbindende fragmenter derav konjugeres til ett eller flere maytansinoidmolekyler (f.eks. fra omkring 1 til omkring 10 maytansinoidmolekyler pr. antistoffmolekyl). Maytansinoider er mitoseinhibitorer som virker ved å inhibere polymeriseringen av tubulin.

Maytansinoider, isolert fra naturlige kilder eller fremstilt syntetisk, inkludert maytainsin, maytansinal og derivater og analoger derav, er beskrevet, se f.eks. U.S. patentskrift nr. 5 208 020 og referanser som siteres der (se kolonne 2, linje 53 til kolonne 3, linje 10) og U.S. patentskrift nr. 3 896 111 og 4 151 042. Fremgangsmåter for fremstilling av antistoff-
 5 maytansinoidkonjugater er også beskrevet i U.S. patentskrift nr. 5.208.020. I en foretrukket utførelse er et maytansinoid bundet til antistoffet via en disulfidbinding eller en annen svovelholdig linkergruppe. Maytansin kan for eksempel omdannes til May-SS-Me, som kan reduseres til May-SH3 og så reageres med modifisert antistoff slik at det dannes et maytansinoid-antistoff-immunkonjugat. Chari *et al.*, *Cancer Res.* 52:127-131 (1992).
 10 Antistoffet kan modifiseres ved kjente fremgangsmåter, og antistoff inneholdende frie eller beskyttede tiolgrupper får så reagere med et disulfidholdig maytansinoid for å danne konjugatet. Cytotoksiteteten til antistoff-maytansinoidkonjugatet kan måles *in vitro* eller *in vivo* ved kjente fremgangsmåter, og IC_{50} kan bestemmes.

Calicheamicin er et annet immunkonjugat av interesse. Calicheamicinfamilien av
 15 antibiotika kan gi dobbelttrådede DNA-brudd i sub-picomolare konsentrasjoner. Struktur-analoger av calicheamicin som kan anvendes omfatter γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetyl- γ_1^1 , PSAG og θ_1^1 (Hinman *et al.* *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993) og Lode *et al.*, *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)). Andre anti-tumormedikamenter som antistoffet kan konjugeres til inkluderer QFA, som er et antifolat. Både calicheamicin og QFA har intracellulære virkningssteder og krysser
 20 ikke lett plasmamembranen. Cellulært opptak av disse midlene ved antistoff-formidlet internalisering forsterker således i stor grad deres cytotoxiske virkninger.

Immunkonjugater dannet mellom et antistoff og en forbindelse med nukleolytisk aktivitet (f.eks. en ribonuklease eller DNA-endonuklease, slik som deoksyribonuklease DNase) er også påtenkt.

25 Antistoffet kan også konjugeres til et svært radioaktivt atom. En rekke radioaktive isotoper er tilgjengelige for radiokonjugerte antistoffer. Eksempler omfatter Ar^{211} , Bi^{212} , I^{131} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , P^{32} og Pb^{212} og radioaktive isotoper av Lu. Dersom konjugatet anvendes for diagnose kan det omfatte et radioaktivt atom for scintigrafiske undersøkelser, for eksempel Tc^{99} eller I^{123} , eller en spinnmerking for kjernemagnetisk resonans (nmr)-
 30 billedannelse (også betegnet magnetisk resonansbilledannelse, mri), slik som jod-123, jod-131, indium-111, fluor-19, karbon-13, nitrogen-15, oksygen-17, gadolinium, mangan eller jern.

De radioaktive atomene eller andre merkingsgrupper kan innkorporeres i konjugatet på kjente måter. Peptidet kan for eksempel biosyntetiseres eller syntetiseres ved kjemisk
 35 aminosyresyntese ved anvendelse av egnede aminosyreforløpere, for eksempel fluor-19, i stedet for hydrogen. Merkede atomer som Tc^{99} eller I^{123} , Re^{186} , Re^{188} og In^{111} kan tilkobles via en cysteinrest i peptidet. Yttrium-90 kan tilkobles via en lysinrest. «*IODOGEN*»®-fremgangsmåten kan anvendes for innføring av jod-123, Fraker *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80:49-57 (1978). Andre fremgangsmåter for konjugering av radioaktive

isotoper er beskrevet i «Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy», (Chatal, CRC Press 1989).

Alternativt kan et fusjonsprotein som omfatter antistoffet og det cytotoxiske middel fremstilles ved rekombinante teknikker eller peptidsyntese. DNA-molekylet kan omfatte
5 områder som koder for de to konjugatdelene, enten i nabostilling til hverandre eller atskilt av et område som koder for et linkerpeptid som ikke ødelegger konjugatets ønskede egenskaper.

I en annen utførelse kan antistoffet konjugeres til en «reseptor» (slik som streptavidin) for anvendelse i målstyring til tumorer, hvor antistoff-reseptorkonjugatet
10 administreres til pasienten, etterfulgt av fjerning av ubundet konjugat fra sirkulasjonen ved anvendelse av et klaringsmiddel, og så tilførsel av en «ligand» (f.eks. avidin) som er konjugert til et cytotoxisk middel (f.eks. et radionucleotid).

9) Immunliposomer

15 Antistoffene beskrevet her kan også formuleres som immunliposomer. Et «liposom» er en liten vesikkel som består av forskjellige typer av lipider, fosfolipider og/eller overflate-aktive midler som er anvendbare for tilførsel av et medikament til et pattedyr. Bestanddelene i liposomet er vanligvis arrangert i en dobbeltlag formasjon som likner på lipidarrangementet i biologiske membraner.

20 Liposomer som inneholder antistoffet fremstilles ved fremgangsmåter som er kjente innen faget, slik som som beskrevet i Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**:3688 (1985), Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**:4030 (1980) og U.S. patentskrift nr. 4 485 045 og 4 544 545. Liposomer med forlenget sirkulasjonstid er beskrevet i U.S. patentskrift nr. 5 013 556.

25 Spesielt anvendbare liposomer kan fremstilles ved revers fase-inndampings-fremgangsmåten med et lipidsammensetning som omfatter fosfatidylcholin, kolesterol og PEGderivatisert fosfatidyletanolamin (PEG-PE). Liposomer ekstruderes gjennom filteret med definert porestørrelse for fremskaffelse av liposomer med den ønskede diameter. Fab'-fragmenter av antistoffet ifølge foreliggende oppfinnelse kan konjugeres til liposomene som
30 beskrevet i Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **257**:286-288 (1982) ved hjelp av en disulfid-utbyttingsreaksjon. Et kjemoterapeutisk middel (f.eks. Doxorubicin) kan om ønskelig foreligge inne i liposomet. Se Gabizon *et al.*, *J. National Cancer Inst.* **81**(19):1484 (1989).

10. Andre antistoffmodifikasjoner

35 Andre modifikasjoner av antistoffet er påtenkt her. Antistoffet kan for eksempel kobles til én av en rekke ikke-proteinpolymerer, f. eks. polyetylenglykol, polypropylenglykol, polyoksyalkylener eller kopolymerer av polyetylenglykol og polypropylenglykol. Antistoffet kan også være innfanget i mikrokapsler, for eksempel fremstilt ved flokkuleringsteknikker eller ved interfasepolymerisering (for eksempel mikrokapsler av hydroksymetylcellulose eller

gelatin henholdsvis mikrokapsler av poly-(metylmetakrylat), i kolloidale medikamenttilførselssystemer (for eksempel liposomer, albuminmikrokuler, mikroemulsjoner, nanopartikler og nanokapsler) eller i makroemulsjoner. Slike teknikker og andre egnede formuleringer er beskrevet i *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20. utgave, Alfonso Gennaro, Ed., Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000).

C. Frysetørkede formuleringer

Formuleringene beskrevet her kan også fremstilles som rekonstituerte frysetørkede formuleringer. Proteinene eller antistoffene beskrevet her frysetørkes og rekonstitueres så for å danne de stabile, flytende formuleringene med redusert viskositet ifølge oppfinnelsen. I denne spesielle utførelsen fremstilles en «pre-frysetørket formulering» etter fremstilling av proteinet av interesse som beskrevet ovenfor. Mengden av protein som foreligger i pre-frysetørkingsformuleringen bestemmes, idet det tas hensyn til de ønskede dosevolumer, tilførselsmåten osv. Utgangskonsentrasjonen av et intakt antistoff kan f.eks. være fra omkring 5 mg/ml til omkring 50 mg/ml, fortrinnsvis fra omkring 5 mg/ml til omkring 40 mg/ml, og mest foretrukket fra omkring 20-30 mg/ml.

1. Fremstilling av frysetørkede formuleringer

Proteinet som skal formuleres foreligger generelt i løsning. I formuleringene med høy ionestyrke og redusert viskositet ifølge oppfinnelsen, kan proteinet f.eks. foreligge i en pH-bufret løsning ved en pH på mellom 4 og 8, fortrinnsvis mellom 5 og 7. Bufferkonsentrasjonen kan være fra omkring 1 mM til omkring 20 mM, alternativt fra omkring 3 mM til omkring 15 mM, avhengig for eksempel av bufferen og formuleringens ønskede tonisitet (f.eks. for den rekonstituerte formulering). Eksempler på buffere og/eller salter er buffere og salter som er farmasøytisk aksepterbare og som kan dannes fra egnede syrer, baser og salter, slik som de som er definert under «farmasøytisk aksepterbare» syrer, baser eller buffere.

I én utførelsesform tilsettes et lyobeskyttende middel til pre-frysetørkingsformuleringen. Mengden av lyobeskyttende middel i pre-frysetørkingsformuleringen er generelt slik at den resulterende formulering etter rekonstituering vil være isoton. Hypertone rekonstituerte formuleringer kan imidlertid også være egnede. I tillegg må mengden av lyobeskyttende middel ikke være så lav at en uakseptabel grad av degradering/aggregering av proteinet skjer etter frysetørkingen. Eksemplariske konsentrasjoner av lyobeskyttende middel i pre-frysetørkingsformuleringen er imidlertid fra omkring 10 mM til omkring 400 mM, alternativt fra omkring 30 mM til omkring 300 mM, alternativt fra omkring 50 mM til omkring 100 mM. Eksempler på lyobeskyttende midler omfatter sukker og sukkeralkoholer som sukrose, mannose, trehalose, glukose, sorbitol og mannitol. Under visse omstendigheter kan imidlertid visse lyobeskyttende midler også bidra til en økning av formuleringens viskositet. Således bør man være nøye med å velge spesielle lyobeskyttende

midler som minimaliserer eller nøytraliserer denne virkningen. Ytterligere lyobeskyttende midler er beskrevet ovenfor under definisjonen av «lyobeskyttende midler», her også betegnet «farmasøytisk aksepterbare sukkere».

Forholdet mellom protein og lyobeskyttende middel kan variere for en bestemt kombinasjon av protein eller antistoff og lyobeskyttende middel. I tilfelle av et antistoff som det valgte protein og et sukker (f.eks. sukrose eller trehalose) som det lyobeskyttende middel for fremstilling av en isoton rekonstituert formulering med høy proteinkonsentrasjon kan det molare forhold mellom lyobeskyttende middel og antistoff være fra omkring 100 til omkring 1500 mol lyobeskyttende middel til 1 mol antistoff, fortrinnsvis fra omkring 200 til omkring 1000 mol lyobeskyttende middel til 1 mol antistoff, f.eks. fra omkring 200 til omkring 600 mol lyobeskyttende middel til 1 mol antistoff.

I en foretrukket utførelse kan det være ønskelig å tilsette et overflateaktivt middel til pre-frysetørkingsformuleringen. Alternativt eller i tillegg kan det overflateaktive middel tilsettes til den frysetørkede formuleringen og/eller den rekonstituerte formuleringen. Eksempler på overflateaktive midler omfatter ikke-ioniske overflateaktive midler som polysorbater (f.eks. polysorbat 20 eller 80), polyoksamerer (f.eks. poloksamer 188), triton, natriumoktylglykosid, lauryl-, myristyl-, linoleyl- eller stearylsulfobetain, lauryl-, myristyl-, linoleyl- eller stearylsarkosin, linoleyl-, myristyl- eller cetylbetain, lauroamidopropyl-, cocamidopropyl-, linoleamidopropyl-, myristamidopropyl-, palmidopropyl- eller isostearamidopropylbetain (f.eks. lauroamidopropyl), myristamidopropyl-, palmidopropyl- eller isostearamidopropyldimetylamin, natriummetylcocoyl- eller dinatriummetyloleyltaurat og «MONAQUA»™ serien (Mona Industries, Inc. Paterson, New Jersey), polyetylglykol, polypropylglykol og kopolymerer av etylen- og propylenglykol (f.eks. Pluronic, PF68 osv.). Mengden av overflateaktivt middel som tilsettes et slik at den reduserer dannelsen av partikler av det rekonstituerte protein og minimaliseres dannelsen av partikler etter rekonstituering. Det overflateaktive middel kan for eksempel foreligge i pre-frysetørkingsformuleringen i en mengde fra omkring 0,001-0,5 %, alternativt fra omkring 0,005-0,05 %.

En blanding av det lyobeskyttende middel (slik som sukrose eller trehalose) og et massegivende middel (f.eks. mannitol eller glysin) kan anvendes ved fremstilling av pre-frysetørkingformuleringen. Det massegivende middel kan tillate fremstilling av en enhetlig frysetørket kake uten for store hulrom o.l. Andre farmasøytisk aksepterbare bærestoffer, eksipienter eller stabilisatorer, slik som de beskrevet i *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16. utgave, Osol, A. red (1980) kan inngå i pre-frysetørkingsformuleringen (og/eller den frysetørkede formuleringen og/eller den rekonstituerte formuleringen), forutsatt at det ikke påvirker formuleringens ønskede egenskaper på en uheldig måte. Aksepterbare bærestoffer, eksipienter eller stabilisatorer er ikke-toksiske for mottakeren i de benyttede doser og konsentrasjoner og omfatter: ytterligere bufringsmidler, konserveringsmidler, ko-løsemidler, antioksidanter, inkludert askorbinsyre og metionin, chelateringsmidler som EDTA,

metallkomplekser (f.eks. Zn-proteinkomplekser), biodegraderbare polymerer, slik som polyestere, og/eller saltdannende motioner, slik som natrium.

Formuleringen beskrevet her kan også inneholde mer enn ett protein, ut fra hva som er nødvendig for den angjeldende indikasjon som behandles, fortrinnsvis proteiner med komplementerende aktiviteter som ikke på uønsket måte påvirker det andre protein. Det kan for eksempel være ønskelig å tilføre to eller flere antistoffer som kan bindes til det ønskede mål (f.eks. en reseptor eller et antigen) i én enkelt formulering. Slike proteiner kan med fordel foreligge i kombinasjonen i mengder som er effektive for det påtenkte formål.

Formuleringer som skal anvendes for tilførsel *in vivo* må være sterile. Dette oppnås lett ved filtrering gjennom sterile filtreings membraner før eller etter frysetørking og rekonstituering. Alternativt kan sterilisering av hele blandingen oppnås ved autoklaving av bestanddelene, bortsett fra proteinet, ved for eksempel omkring 120 °C i omkring 30 min.

Etter at proteinet, om ønskelig et lyobeskyttende middel og andre valgfrie bestanddeler er sammenblandet, frysetørkes formuleringen. Mange forskjellige frysetørkere er tilgjengelige for dette formål, f. eks. «Hull50» (Hull, USA), eller «GT20» (Leybold-Heraeus, Tyskland). Frysetørking oppnås ved å fryse formuleringen og deretter sublimere is fra det nedfrosede innholdet ved en temperatur som er egnet for primærtørking. Under disse forholdene ligger produkttemperaturen under formuleringens eutektiske punkt eller kollapstemperatur. Hylletemperaturen for primærtørkingen vil typisk ligge mellom -30 og 25 °C (forutsatt at produktet forblir frosset under primærtørkingen) ved et egnet trykk, typisk mellom omkring 50 og 250 mTorr. Formuleringen, størrelsen og typen av beholder som holder prøven (f.eks. en glassbeholder) og væskevolumet vil stort sett avgjøre tiden som er nødvendig for tørkingen, som kan variere fra noen få timer til flere dager (f.eks. 40-60 t). Om ønskelig kan et sekundært tørkettrinn også utføres, avhengig av det ønskede nivå av gjenværende fuktighet i produktet. Temperaturen som sekundærtørkingen utføres ved, varierer fra omkring 0-40 °C, hovedsakelig avhengig av type og størrelse av beholder og type av protein som benyttes. For eksempel kan hylletemperaturen gjennom hele vannfjerningsfasen av frysetørkingen være fra omkring 15-30 °C (f.eks. omtrent 20 °C). Tiden og trykket som er nødvendig for sekundærtørkingen vil være en tid og et trykk som gir en egnet frysetørket kake, avhengig f.eks. av temperaturen og andre parametere. Sekundærtørkingstiden bestemmes av det ønskede nivå av gjenværende fuktighet i produktet og vil typisk ta minst omkring 5 t (f.eks. 10-15 t). Trykket kan være det samme som ble benyttet under primærtørkettrinnet. Frysetørkingsbetingelsene kan varieres avhengig av formuleringen og beholderstørrelsen.

2. Rekonstituering av en frysetørket formulering

Før administrering til pasienten rekonstitueres den frysetørkede formulering med et farmasøytisk aksepterbart fortynningsmiddel, slik at proteinkonsentrasjonen i den rekonstituerte formulering er minst omkring 50 mg/ml, for eksempel fra omkring 50 mg/ml

til omkring 400 mg/ml, alternativt fra omkring 80 mg/ml til omkring 100 mg/ml, alternativt fra omkring 90 mg/ml til omkring 150 mg/ml. Slike høye proteinkonsentrasjoner i den rekonstituerte formuleringen anses som spesielt anvendbare dersom subkutan administrasjon av den rekonstituerte formulering er påtenkt. For andre tilførselsveier, slik som intravenøs tilførsel, kan det imidlertid være ønskelig med lavere proteinkonsentrasjoner i den rekonstituerte formulering (for eksempel fra omkring 5-50 mg/ml eller fra omkring 10-40 mg/ml protein i den konstituerte formulering). I visse utførelser er proteinkonsentrasjonen i den rekonstituerte formuleringen signifikant høyere enn i pre-frysetørkingsformuleringen. For eksempel kan proteinkonsentrasjonen i den rekonstituerte formulering være omtrent 2-40 ganger høyere, alternativt 3-10 ganger høyere, alternativt 3-6 ganger høyere (f.eks. minst tre ganger høyere eller minst fire ganger høyere) enn for prefrysetørkingsformuleringen.

Rekonstitueringen finner vanligvis sted ved en temperatur på omtrent 25 °C for å sikre fullstendig hydrering, selv om andre temperaturer kan benyttes om ønskelig. Tiden som er nødvendig for rekonstitueringen vil f.eks. avhenge av typen fortynningsmiddel og mengden av eksipienter og protein. Eksempler på fortynningsmidler omfatter sterilt vann, bakteriostatisk vann for injeksjon (BWFI), en pH-bufret løsning (f.eks. fosfatbufret saltvann), steril saltløsning, Ringer's løsning eller dekstroseløsning. Fortynningsmidlet inneholder om ønskelig et konserveringsmiddel. Eksempler på konserveringsmidler er beskrevet ovenfor, hvor aromatiske alkoholer som benzyl- eller fenylalkohol er de foretrukne konserveringsmidlene. Mengden av konserveringsmiddel som benyttes avgjøres av en vurdering av forskjellige konserverende konsentrasjoner for kompatibilitet med proteinet og en analyse av konserveringsmidlets effektivitet. Dersom for eksempel konserveringsmidlet er en aromatisk alkohol (slik som benzylalkohol) kan det foreligge i en mengde fra omkring 0,1-2 %, fortrinnsvis fra omkring 0,5-1,5 %, men mest foretrukket fra omkring 1,0-1,2 %.

Den rekonstituerte formuleringen har fortrinnsvis mindre enn 6000 partikler med diameter $\geq 10 \mu\text{m}$ pr. beholder.

D. Flytende formuleringer

Terapeutiske formuleringer fremstilles for lagring ved å blande den aktive bestanddel med den ønskede renhetsgrad med valgfrie farmasøytisk aksepterbare bærestoffer, eksipienter eller stabilisatorer (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18. utgave, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042 [1990]). Aksepterbare bærestoffer, eksipienter eller stabilisatorer er ikke-toksiske for mottakeren i de benyttede doser og konsentrasjoner og omfatter buffere, antioksidanter, inkludert askorbinsyre, metionin, vitamin E, natriummetabisulfitt, konserveringsmidler, isotonifiserende midler, stabilisatorer, metallkomplekser (f.eks. Zn-proteinkomplekser), chelateringsmidler slik som EDTA og/eller ikke-ioniske overflateaktive midler.

Dersom det terapeutiske middel er et antistoff-fragment foretrekkes det minste inhiberende fragment som spesifikt bindes til målproteinets bindingsdomene. Basert på et antistoffs variable områdesekvenser kan for eksempel antistoff-fragmenter, eller til og med peptidmolekyler, som bibeholder evnen til å bindes til målproteinsekvensen utformes. Slike

5 peptider kan syntetiseres kjemisk og/eller fremstilles ved rekombinant DNateknologi (se f.eks. Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7889-7893 [1993]).

10 Buffere anvendes for å kontrollere pH innenfor et område som optimaliserer den terapeutiske virkningen, særlig dersom stabiliteten er pH-avhengig. Buffere foreligger fortrinnsvis i konsentrasjoner i området fra omkring 50 mM til omkring 250 mM. Egnede

10 bufringsmidler for anvendelse i foreliggende oppfinnelse omfatter både organiske og uorganiske syrer og salter av disse. Som eksempler kan nevnes citrat, fosfat, suksinat, tartrat, fumarat, glukonat, oksalat, laktat eller acetat. I tillegg kan buffere omfatte histidin og trimetylaminsalter, slik som Tris.

15 Konserveringsmidler tilsettes for å forsinke mikrobeveksten og foreligger typisk i et område fra 0,2 % - 1,0 % (vekt/vol). Egnede konserveringsmidler for anvendelse i foreliggende oppfinnelse inkluderer slik som oktadecyldimetylbenzylammoniumklorid, heksametoniumklorid, benzalkoniumhalider (f.eks. klorid, bromid, jodid), benzetoniumklorid, timerosal, fenol, butyl- eller benzylalkohol, alkylparabener som metyl- eller propylparaben, catechol, resorcinol, cykloheksanol, 3-pentanol og *m*-cresol.

20 Tonisitetsmidler, noen ganger betegnet «stabilisatorer», foreligger for å justere eller opprettholde tonisiteten av en flytende sammensetning. Anvendt sammen med store, ladede biomolekyler slik som proteiner og antistoffer, betegnes de ofte «stabilisatorer», siden de kan interagere med ladede grupper i aminosyrenes sidekjeder og redusere muligheten for inter- og intramolekylære interaksjoner. Tonisitetsmidler kan foreligge i enhver mengde

25 mellom 0,1 % og 25 % (vekt/vekt), fortrinnsvis mellom 1 og 5 %, idet det tas hensyn til de relative mengder av de andre bestanddelene. Tonisitetsmidler omfatter polyhydriske sukkeralkoholer, fortrinnsvis trihydriske eller høyere sukkeralkoholer, slik som glyserol, erytritol, arabitol, xylitol og mannitol.

30 Ytterligere eksipienter omfatter midler som kan fungere som én eller flere av følgende: (1) massegivende midler, (2) løselighetsfremmende midler, (3) stabilisatorer og (4) midler som forhindrer denaturering eller adheranse til beholderveggen. Stabilisatorer kan foreligge i området fra 0,1 til 10000 deler pr. vekt aktivt protein eller antistoff. Typiske stabilisatorer omfatter: polyhydriske sukkeralkoholer (opplistet ovenfor), aminosyrer slik som alanin, glysin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, lysin, ornitin, leucin, 2-fenylalanin,

35 glutaminsyre, treonin osv., organiske sukkere eller sukkeralkoholer slik som sukrose, laktose, laktitol, trehalose, stachyose, mannose, sorbose, xylose, ribose, ribitol, myoinisitose, myoinisitol, galaktose, galaktitol, glyserol, cyklitol (f.eks. inositol), polyetylenglykol, svovelholdige reduksjonsmidler, slik som urea, glutation, tiosinsyre, natriumtioglykolat, tioglyserol, α -monotioglyserol og natriumtiosulfat, lavmolekylære

proteiner slik som humant serumalbumin, bovint serumalbumin, gelatin eller andre immunglobuliner, hydrofile polymerer slik som polyvinylpyrrolidon, monosakkarider (f.eks. xylose, mannose, fruktose, glukose, disakkarider, f.eks. laktose, maltose, sukrose), trisakkarider slik som raffinose og polysakkarider slik som dekstrin eller dekstran.

5 Ikke-ioniske overflateaktive midler eller detergenter (også betegnet «fuktningsmidler») foreligger for å bidra til å solubilisere det terapeutiske middel, så vel som for å beskytte det terapeutiske proteinet mot agitasjonsindusert aggregering, noe som også gjør at formuleringen kan eksponeres overfor overflateskjærkrefter uten at det aktive terapeutiske protein eller antistoff denatureres. Ikke-ioniske overflateaktive midler foreligger
10 i området fra omkring 0,05 mg/ml til omkring 1,0 mg/ml, fortrinnsvis fra omkring 0,07 mg/ml til omkring 0,2 mg/ml.

Egnede ikke-ioniske overflateaktive midler omfatter polysorbater (20, 40, 60, 65, 80 osv.), polyoksamerer (184, 188 osv.), «Pluronic»-polyoler, «Triton»-polyoksyetylenorbitan-monoetere («Tween-20», «Tween-80» osv.), lauromakrogol 400, polyoksyyl 40-stearat,
15 polyoksyetylenhydrogenert laksérolje 10, 50 og 60, glyserolmonostearat, sukrose-fettsyreester, metylcellulose og karboksymetylcellulose. Anioniske detergenter som kan anvendes omfatter natriumlaurylsulfat, dioktylnatriumsulfosuksinat og dioktylnatrium-sulfonat. Kationiske detergenter omfatter benzalkoniumklorid og benzetoniumklorid.

For at formuleringene skal kunne anvendes for *in vivo*-tilførsel må de være sterile.
20 Formuleringen kan gjøres steril ved filtrering gjennom sterile filtreringsmembraner. De terapeutiske sammensetningene her plasseres vanligvis i en beholder med en steril tilgangsåpning forekseml en pose for intravenøs løsning eller en beholder som har en kork som kan gjennomtrenges av en kanyler for subkutan injeksjon.

Administrasjonsveien er i samsvar med kjente og aksepterte fremgangsmåter, slik
25 som ved en enkelt eller flere bolusinjeksjoner eller infusjon over et lengre tidsrom på en egnet måte, f.eks. injeksjon eller infusjon subkutan, intravenøst, intraperitonealt, intramuskulært, intraarterielt, intralesjonalt eller intraartikulært, ved topisk tilførsel, inhalering eller ved midler som gir vedvarende frigjøring eller forlenget frigjøring.

Formuleringene her kan også inneholde mer enn én aktiv forbindelse, ut fra hva
30 som er nødvendig for den angjeldende indikasjon som skal behandles, fortrinnsvis forbindelser med komplementerende aktiviteter som ikke påvirker hverandre på uønsket måte. Alternativt eller i tillegg kan sammensetningen inneholde et cytotoxisk middel, et cytokin eller et veksthemmerende middel. Slike molekyler foreligger fortrinnsvis i kombinasjonen i mengder som er effektive for det påtenkte formål.

35 De aktive bestanddelene kan også være innfanget i mikrokapsler, for eksempel fremstilt ved utflokkningsteknikker eller ved interfasepolymerisering, for eksempel mikrokapsler av hydroksymetylcellulose eller gelatin og poly-(metylmetakrylat) mikrokapsler, i kolloidale medikamenttilførselssystemer (f.eks. liposomer, albuminmikrokuler, mikro-

emulsjoner, nanopartikler og nanokapsler) eller i makroemulsjoner. Slike teknikker er beskrevet i *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18. utgave, *supra*.

Sammensetninger for vedvarende frigjøring kan fremstilles. Egnede eksempler på sammensetninger for vedvarende frigjøring omfatter semipermeable støttemidler av faste, hydrofobe polymerer som inneholder antistoffet, hvor støttemidlene foreligger i form av utformede gjenstander, f.eks. filmer eller mikrokapsler. Eksempler på støttemidler for vedvarende frigjøring omfatter polyestere, hydrogeler (for eksempel poly-(2-hydroksyetylmetakrylat) eller poly(vinylalkohol)), polylaktider (U.S. patentskrift nr. 3 773 919), kopolymerer av L-glutaminsyre og γ -etyl-L-glutamat, ikke-degraderbart etylen-vinylacetat, degraderbare melkesyre-glykolsyre-kopolymerer som «LUPRON DEPOT» (injiserbare mikrokuler bestående av melkesyre-glykolsyre kopolymer og leuprolidacetat) og poly-D-(-)-3-hydroksysmørsyre. Mikroinnkapsling av rekombinante proteiner for vedvarende frigjøring er med hell blitt utført med humant veksthormon (rhGH), interferon (rHIFN)-interleukin-2 og MN rpg 120. Johnson *et al.*, *Nat. Med.* 2:795-799 (1996), Yashuda *et al.*, *Biomed. Ther.* 27:1221-1223 (1993), Hora *et al.*, *Bio/Technology* 8:755-758 (1990), Cleland, «Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems» i *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Powell and Newman, red., (Plenum Press: New York, 1995), s. 439-462, WO97/03692, WO96/40072, WO96/07399, og U.S. patentskrift nr. 5 654 010.

Formuleringene for vedvarende frigjøring av disse proteinene kan utvikles ved anvendelse av polymelkesyre-koglykolsyre (PLGA)-polymer, grunnet dennes biokompatibilitet og brede spekter av biodegraderbare egenskaper. Degraderingsproduktene av PLGA, melkesyre og glykolsyre, kan raskt fjernes fra menneskekroppen. Dessuten kan degraderbarheten til denne polymeren justeres fra måneder til år, avhengig av molekylvekten og sammensetningen. Lewis, «Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer», i *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (Marcel Dekker, New York, 1990), M. Chasin og R. Langer (red.) s. 1-41.

Mens polymerer som etylen-vinylacetat og melkesyre-glykolsyre muliggjør frigjøring av molekyler i over 100 dager frigjør visse hydrogeler proteiner over kortere tidsrom.

Dersom innkapslede antistoffer forblir i kroppen i lang tid kan de denatureres eller aggregeres som et resultat av eksponering for fuktighet ved 37 °C, noe som resulterer i tap av biologisk aktivitet og muligens endret immunogenisitet. Rasjonelle strategier kan utformes for stabiliseringen, avhengig av mekanismen som inngår. Hvis for eksempel aggregeringsmekanismen oppdages å være intermolekylær S-S-broddannelse ved tiodisulfidbytting, kan stabilisering oppnås ved modifisering av sulfhydrylrester, lyofilisering fra sure løsninger, kontrollering av fuktinnhold, anvendelse av egnede tilsetningsstoffer og utvikling av spesifikke polymermatrikssammensetninger.

Liposomale eller proteinholdige sammensetninger kan også anvendes for å formulere proteinene eller antistoffene angitt her, se U.S. patentskrift nr. 4 925 673 og 5 013 556.

Stabiliteten av antistoffene beskrevet her kan forsterkes ved anvendelse av ikke-
 5 toksiske «vannløselige, polyvalente metallsalter». Eksempler omfatter Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Sn^{2+} , Sn^{4+} , Al^{2+} og Al^{3+} . Eksempler på anioner som kan danne vannløselige salter med de ovenfor nevnte polyvalente metallkationene inkluderer de som er dannet fra uorganiske syrer og/eller organiske syrer. Slike vannløselige salter har en løselighet i vann (ved 20 °C) på minst omkring 20 mg/ml, alternativt minst omkring 100 mg/ml, alternativt
 10 minst omkring 200 mg/ml.

Egnede uorganiske syrer som kan anvendes for å danne de «vannløselige, poly-
 valente metallsaltene» omfatter saltsyre, eddiksyre, svovelsyre, salpetersyre, tiocyanisyre og fosforsyre. Egnede organiske syrer som kan anvendes omfatter alifatiske karboksylsyrer og aromatiske syrer. Alifatiske syrer innen denne definisjonen kan defineres som mettede eller
 15 umettede C_{2-9} karboksylsyre (f.eks. alifatiske mono-, di- og trikarboksylsyrer). Eksempler på monokarboksylsyrer innen denne definisjonen omfatter for eksempel mettede C_{2-9} mono-
 karboksylsyrene, eddiksyre, propionsyre, smørsyre, valeransyre, kaproinsyre, enantinsyre, kaprylsyre, pelargonsyre og kapryonsyre og de umettede C_{2-9} monokarboksylsyrene, akrylsyre, propargylsyre, metakrylsyre, krontonsyre og isokrontonsyre. Eksempler på
 20 dikarboksylsyrer omfatter de mettede C_{2-9} dikarboksylsyrene malonsyre, ravsyre, glutarsyre, adipinsyre og pimelinsyre, mens umettede C_{2-9} dikarboksylsyrer omfatter maleinsyre, fumarsyre, citraconsyre og mesaconsyre. Eksempler på trikarboksylsyrer omfatter de mettede C_{2-9} trikarboksylsyrene tricarballylsyre og 1,2,3-butantrikarboksylsyre. I tillegg kan karboksylsyrene som omfattes av denne definisjonen også inneholde 1 eller 2 hydroksyl-
 25 grupper, slik at det dannes hydroksykarboksylsyrer. Eksempler på hydroksykarboksylsyrer omfatter glykolsyre, melkesyre, glycersyre, tartronsyre, eplesyre, vinsyre og sitrønsyre. Aromatiske syrer som faller innenfor denne definisjonen omfatter benzoesyre og salicylsyre.

Vanlig benyttede, vannløselige polyvalente metallsalter som kan anvendes for å bidra til å stabilisere de innkapslede polypeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse, omfatter
 30 for eksempel: (1) metallsalter av hydrogenhalider (f.eks. sinkklorid, kalsiumklorid), sulfater, nitrater, fosfater og tiocyanater, (2) metallsalter av alifatiske karboksylsyrer (f.eks. kalsiumacetat, sinkacetat, kalsiumpropionat, sinkglykolat, kalsiumlaktat, sinklaktat og sinktartrat), og (3) for aromatiske karboksylsyrer: metallbenzoater (f.eks. sinkbenzoat) og salicylater.

35

E. Behandlingsfremgangsmåter

For forebygging eller behandling av en sykdom vil den passende dosen av et aktivt middel avhenge av hvilken sykdom det er som skal behandles, som definert ovenfor, alvorlighetsgrad og forløp av sykdommen, hvorvidt midlet tilføres for forebyggende eller

terapeutiske formål, tidligere behandling, pasientens kliniske historie og respons på midlet, og den behandlende leges vurderinger. Midlet blir hensiktsmessig administrert til pasienten ved én enkelt behandling eller over en serie av behandlinger.

En foretrukket behandlingsfremgangsmåte er behandling av IgE-formidlede
 5 forstyrrelser. IgE-formidlede forstyrrelser omfatter atopiske forstyrrelser, som særpreges med en medfødt evne til å responsere immunologisk på mange naturlig forekommende inhalerte og inntatte antigener og en kontinuerlig produksjon av IgE-antistoffer. Spesifikke atopiske forstyrrelser omfatter allergisk astma, allergisk rhinitt, atopisk dermatitt og allergisk gastroenteropati. Atopiske pasienter har ofte flere allergier, noe som betyr at de
 10 har IgE-antistoffer mot, og symptomer fra mange allergener i omgivelsene, inkludert pollen, sopp (f.eks. muggsopp), dyre- og insektrester og visse næringsstoffer.

Forstyrrelsene som er forbundet med forhøyet IgE-nivå er imidlertid ikke begrenset til forstyrrelser med en medfødt (atopisk) etiologi. Andre forstyrrelser forbundet med
 15 forhøyet IgE-nivå, som ser ut til å være IgE-mediert og som kan behandles med formuleringene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter hypersensitivitet (f.eks. anafylaktisk hypersensitivitet), eksem, urtikaria, allergisk bronkopulmonal aspergillose, parasittiske sykdommer, hyper-IgE-syndrom, ataksia-telangiectasia, Wiskott-Aldrichsyndromet, thymisk alymfoplasi, IgE-mylom og graft-versus-host-reaksjon.

Allergisk rhinitt, også betegnet allergisk rhinokonjunktivitt eller høysnue er den
 20 vanligste manifestasjon på en atopisk reaksjon på inhalerte allergener, og tilstandens alvorlighetsgrad og varighet korrelerer ofte med intensiteten og lengden av eksponeringen overfor allergenet. Dette er en kronisk sykdom som kan opptre for første gang i enhver alder, men den begynner vanligvis i løpet av barndommen eller ungdommen. Et typisk anfall består av rikelig, vannaktig rhinorrea, paroksymal nysing, tett nese og kløe i nese og gane.
 25 Postnasal slimdrenering gir også sår hals, halsklaring og hoste. Det kan også være symptomer på allergisk blepharokonjunktivitt, med intens kløe i konjunktiva og øyelokk, rødhet, tåredannelse og fotofobi. Alvorlige anfall er ofte ledsaget av systemisk uvelhet, svekkelse, tretthet og, noen ganger, muskelsårhet etter intense perioder med nysing.

Astma, også kjent som reversibel obstruktiv luftveissykdom, er kjennetegnet ved en
 30 hyperreaktivitet i trakeobronkialkanalen overfor respiratoriske irritanter og bronko-konstriktorkjemikalier, noe som utløser anfall av piping, dyspné, tetthet i brystet og hoste som reverseres spontant eller med behandling. Det er en kronisk sykdom som involverer hele luftveiene, men varierer i alvorlighetsgrad fra milde, forbigående episoder, til alvorlig, kronisk, livstruende bronkieobstruksjon. Astma og atopi kan foreligge samtidig, men bare
 35 omtrent halvparten av alle astmatikere er også atopiske, og en enda mindre prosentandel av atopiske pasienter har også astma. Imidlertid er atopi og astma ikke fullstendig uavhengige av hverandre, siden astma opptre hyppigere blant atopiske individer enn blant ikke-atopiske individer, særlig i barndommen. Historisk sett har astma videre blitt brutt ned til to undergrupper, ekstrinsisk astma og intrinsisk astma.

Ekstrinsisk astma, også betegnet allergisk, atopisk eller immunologisk astma, er beskrivende for pasienter som vanligvis utvikler astma tidlig i livet, vanligvis som spedbarn eller barn. Andre manifestasjoner på atopi, inkludert eksem eller allergisk rhinitt, foreligger ofte sammen. Astmaanfall kan opptre under pollensesongen, i nærvær av dyr eller ved eksponering overfor husstøv, dunputer eller andre allergener. Hudanalyser viser positive blemme- og oppflammingsreaksjoner på de utløsende allergenene. Det er av interesse at den totale serumkonsentrasjonen av IgE ofte er forhøyet, men er noen ganger normal.

Intrinsisk astma, også kjent som ikke-allergisk eller idopatisk astma, opptrer typisk for første gang i voksen alder etter en tilsynelatende luftveisinfeksjon. Symptomene omfatter kronisk eller tilbakevendende bronkieobstruksjon uten forbindelse med pollensesonger eller eksponering overfor andre allergener. Hudanalyser er negative for de vanlige atopiske allergenene, og serumkonsentrasjonen av IgE er normal. Ytterligere symptomer omfatter oppkast med blod og eosinofili. Andre skjemaer for klassifisering av astma i undergrupper, slik som aspirinsensitiv, treningsindusert, infektøs og psykologisk, definerer bare ytre utløsende faktorer som påvirker visse pasienter mer enn andre.

Til slutt er det viktig å merke seg at selv om noen klassifiseringer historisk sett bare har forbundet allergisk astma med IgE-avhengighet, er det nå resultater med stor statistisk signifikans som viser en korrelasjon mellom IgE og astma (både allergisk og ikke-allergisk). Kapittel 27, «*The Atopic Diseases*», A.I. Terr i *Medical Immunology*, 9. utgave, Simon and Schuster, Stites *et al.*, red. (1977). Som et resultat omfatter begrepet «IgE-formidlede forstyrrelser» for formålene til denne patentsøknaden både allergisk og ikke-allergisk astma.

Fysiske tegn på et astmaanfall omfatter tachypné, hørbar piping og anvendelse av tilleggsmusklene for respirasjon. Hurtig puls og forhøyet blodtrykk foreligger også typisk, likeså et forhøyet nivå av eosinofile celler i perifert blod og i nesesekreter. Pulmonale funksjoner viser redusert gjennomstrømningshastighet og 1 sekund tvunget ekspirasjonsvolum (FEV₁). Den totale lungekapasitet og den funksjonelle restkapasitet er typisk normal eller litt forhøyet, men kan være redusert med ekstrem bronkospasme.

Patologien bak astma kan atskilles av tidlig fase- og sen fase-reaksjoner. Den tidlige fasen kjennetegnes ved glatt muskelkontraksjon, ødem og hypersekresjon, mens senfasereaksjonene ved cellulær betennelse. Astma kan induseres av forskjellige uspesifikke utlødere, inkludert infeksjoner (f.eks. virale luftveisinfeksjoner), fysiologiske faktorer (f.eks. trening, hyperventilasjon, dyp pusting, psykologiske faktorer), atmosfæriske faktorer (f.eks. svoveldioksid, ammoniakk, kald luft, ozon, destillert vanndamp), inntatte midler (f.eks. propranolol, aspirin, ikke-steroidale anti-inflammatoriske medikamenter), eksperimentelle inhaleringsmidler (f.eks. hypertone løsninger, sitronsyre, histamin, metacholin, prostaglandin F_{2α}) og yrkesmessige inhalerte midler (f.eks. isocyanater). Forskjellige andre yrkesmessige eller miljømessige allergener som gir allergisk astma kan omfatte dyreprodukter, insektstøv, sjødyr, planteprodukter, frukt, frø, blader og pollen, organiske

fargestoffer og blekk, mikrobielle midler, enzymer, terapeutiske midler, steriliseringsmidler og uorganiske og organiske kjemikalier.

Atopisk dermatitt, også kjent som eksem, neurodermatitt, atopisk eksem, Besnier's prurigo, er en vanlig, kronisk hudforstyrrelse som er spesifikk for en undergruppe av pasienter med de familiære og immunologiske egenskaper som er forbundet med atopi. Den viktigste egenskap er en pruritisk, dermal inflammatorisk respons som omfatter en karakteristisk, symmetrisk fordelt huderupsjon med forkjærlighet for visse steder. Det er også hyppig overproduksjon av IgE fra B-lymfocytter. Mens atopisk dermatitt klassifiseres som en kutan form for atopi, siden den er forbundet med allergisk rhinitt og astma og høyt nivå av IgE, korrelerer omfanget av dermatitten imidlertid ikke alltid med eksponering overfor allergener ved hudanalyse, og avsensitivisering er ikke en effektiv behandling (i motsetning til for andre allergiske sykdommer). Selv om høyt IgE-nivå i serum bekrefter en diagnose av allergisk astma vil et normalt nivå ikke utelukke tilstanden. Sykdommens begynnelse kan opptre i enhver alder, og lesjonene begynner akutt med erytematøse, ødematøse blemmer eller flass med avskalling. Kløing leder til væskedannelse og skorpedannelse, og så til kronisk lichenifisering. På det cellulære nivå er den akutte lesjonen ødemøs, og dermis er infiltrert med mononukleære celler, og CD4-lymfocytter. Nøytrofile celler, eosinofile celler, plasmaceller og basofile celler er sjeldne, men degranulerte mastceller foreligger. De kroniske lesjonene omfatter epidermal hyperplasi, hyperkeratose og parakeratose, og dermis er infiltrert med mononukleære celler, Langerhans' celler og mastceller. Det kan også være fokale områder med fibrose, inkludert deltakelse av perineurium fra små nerver.

Allergisk gastroenteropati, også betegnet eosinofil gastroenteropati, er en uvanlig, atopisk manifestasjon hvor flere IgE-baserte næringsmiddelsensitiviteter er forbundet med en lokal, mukosal reaksjon i mage-tarmkanalen. Tilstanden er sjelden hos voksne og vanligere, men forbigående, hos småbarn. Tilstanden oppstår når inntatte matallergener reagerer med lokale IgE-antistoffer i slimhinnene i øvre del av tynntarmen, slik at mastcelleformidlere frigjøres, noe som fører til gastrointestinale symptomer kort tid etter måltidet. Fortsatt eksponering gir kronisk betennelse, noe som fører til proteintap i mage-tarmkanalen og hyperproteinemisk ødem. Blodtapet gjennom de betente slimhinnene i tarmen kan være tilstrekkelig til å gi jernmangelanemi. Den allergiske reaksjonen opptrer lokalt i slimhinnene i den øvre del av mage-tarmkanalen etter eksponering overfor allergen, men forsvinner når allergen unngås.

Anafylakse og urticaria er åpenbart IgE-formidlede, men de mangler genetiske determinanter og har ingen preferanse for atopiske individer. Anafylakse er en akutt, generalisert allergisk reaksjon med samtidig deltakelse av flere organsystemer, vanligvis hjerte-karsystemet, åndedrettsystemet, hudsystemet og mage-tarmsystemet. Reaksjonen er immunologisk formidlet og opptrer ved eksponering overfor et antigen som individet allerede er sensitivisert overfor. Urticaria og angioødem viser til fysisk opphovning, erythem

og kløe som følge av histaminstimulert reseptor i overflatiske, kutane blodkar og er det kutanøse kjennetegn for systemisk anafylakse. Systemisk anafylakse er forekomst av en IgE-formidlet reaksjon samtidig i flere organer som følge av medikamenter, insektgift eller mat. Tilstanden opptrer plutselig ved allergenindusert, mastcelleladet IgE, noe som fører til

5 en omfattende og livstruende endring i funksjonen av forskjellige vitale organer. Vaskulær kollaps, akutt luftveisobstruksjon, kutan vasodilasjon og ødem samt gastrointestinale og genitourinale muskelspasmer opptrer nesten samtidig, om enn ikke alltid i samme grad.

Patologien ved anafylakse omfatter angioødem og hyperinflaterte lunger, med mucøs gjenstopping av luftveiene og fokal atelektase. På det cellulære nivå ser lungene

10 tilsvarende ut som under et akutt astmaanfall, med hypersekresjon av bronkiale submucosale kjertler, mucosalt og submucosalt ødem, peribronkial vaskulær tilstopping og eosinofili i bronkieveggene. Pulmonalt ødem og blødning kan foreligge. Bronkiemuskelspasmer, hyperinflasjon og til og med sprenging av alvioler kan foreligge. Viktige trekk ved human anafylakse omfatter ødem, vaskulær tilstopping og eosinofili i lamina propria i

15 strupe, luftrør, strupelokk og hypofarynx.

Eksponeringen overfor allergenet kan skje ved inntak, injeksjon, inhalering eller kontakt med huden eller slimhinner. Reaksjonen begynner i løpet av sekunder eller minutter etter eksponeringen overfor allergenet. En innledende angst eller følelse av truende ulykker kan opptre, hurtig fulgt av symptomer i ett eller flere målorgansystemer: hjerte-kar-

20 systemet, luftveissystemet, hudsystemet og mage-tarmsystemet.

Allergenene som er ansvarlige for anafylakse er forskjellige fra de som vanligvis er forbundet med atopi. Næringsmidler, medikamenter eller latex er de vanligste kildene. Matallergener omfatter allergener som foreligger i skalldyr, molusker, (f.eks. hummer, reke, krabbe), fisk, belgplanter (f.eks. peanutter, erter, bønner, lakris), frø (f.eks. sesamfrø,

25 bomullsfrø, karve, sennep, linfrø, solsikke), nøtter, bær, eggehvite, bokhvete og melk. Medikamentallergener omfatter allergenene som finnes i heterologe proteiner og polypeptider, polysakkarider og hapteniske medikamenter. Insektallergener omfatter Hymenoptera-insekter, inkludert honningbie, veps, humle og maur.

Mens epinefrin er den typiske behandling for anafylakse foreskrives typisk anti-

30 histamin eller andre histaminblokkere for mindre alvorlig urtikaria eller angiodemisk reaksjon.

F. Kombinasjonsbehandling

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan kombineres med kjente behandlings-

35 fremgangsmåter for IgE-formidlede forstyrrelser, enten som kombinerte behandlingstrinn, som ekstra behandlingstrinn eller som ytterligere bestanddeler i en terapeutisk formulering.

For eksempel kan antihistaminer, fortrinnsvis ikke-bedøvende antihistaminer, tilføres før eller samtidig med anti-IgE-antistoffene ifølge oppfinnelsen. Egnede antihistaminer omfatter alkylaminer (f.eks. klorfeniramin), etanolaminer (f.eks. difenhydramin)

og fenotiaziner (f.eks. prometazin). Mens mange antihistaminer antagoniserer de farmakologiske virkninger av histamin ved å blokkere reseptorsetene på effektorcellene virker andre vanlige anti-histaminmedikamenter ved å blokkere histaminfrigjøring fra mastceller som er blitt sensitiviserte og bevæpnet med allergenspesifikt IgE (f.eks.

5 kromolynnatrimum). Eksempler på antihistaminer omfatter astemizol, azatadin, maleat, brofeniraminmaleat, karbinoksaminmaleat, cetirizinhydroklorid, clemastinfumarat, cyproheptadinhydroklorid, deksbromfeniraminmaleat, deksklorfeniraminmaleat, dimenhydrinat, difenhydraminhydroklorid, doksyaminsuksinat, feksofenadinhydroklorid, terfenadinhydroklorid, hydroksyzinhydroklorid, loratidin, meclizinhydroklorid, tripelanamin-
10 citrat, tripelennaminhydroklorid, triprolidinhydroklorid.

Spesielle symptomer på IgE-formidlede forstyrrelser (f.eks. tidlig fasereaksjoner) kan lindres med sympatomimetika eller medikamenter med bronkodilaterende virkning. Epinefrin er et bredt virkende alfa- og beta-adrenergisk middel som ofte tilføres subkutant i en dose på 0,2-0,5 ml av en 1:100 vandig løsning. En form av epinefrin med lengre virketid
15 (dvs. terbutalin) i 1:200 suspensjon anvendes også når en lengre virketid er ønsket. Egnede andre beta-adrenerge midler omfatter albuterol, pirbuterol, metaproterenol, salmeterol, isoetarin og formoterol for nasal tilførsel (f.eks. håndholdt nebulisator, pusteinnretning med regelmessig positivt trykk eller en trykkinhalator med måledose) eller oralt.

Bronkodilasjon kan også oppnås ved tilførsel av xantiner, særlig dersom disse
20 tilføres i kombinasjon med de ovenfor nevnte sympatomimetiske medikamentene. Eksempel på xantiner omfatter aminofyllin (iv. 250-500 mg) og theofyllin (oral, 10-20 µg/ml serum-konsentrasjon).

Andre symptomer fra forskjellige IgE-formidlede forstyrrelser (f.eks. sen fase reaksjoner) kan lindres ved behandling med glukokortikoider eller andre medikamenter med
25 anti-inflammatorisk virkning. Prednison (30-60 mg daglig) tilføres systemisk for alvorlige anfall, mens beclometasondipropionat, triamcinolonacetonid og flunisolid tilføres i aerosol-form som langtids vedlikeholdsbehandling. Ytterligere kortikosteroider som har anti-inflammatorisk virkning omfatter: betametason, budesonid, deksametason, fludrokortison-acetat, flunisolid, fluticasonpropionat, hydrokortison, metylprednisolon, prednisolon,
30 prednison, triamcinolon.

Ikke-steroider anti-inflammatoriske medikamenter som også kan anvendes i kombinasjon med de terapeutiske fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen omfatter acetaminofen, aspirin, bromfenacnatrium, diklofenacnatrium, diflunisal, etodolac, fenoprofenkalsium, flurbiprofen, ibuprofen, indometacin, ketoprofen, meclofenanatnatrium,
35 mefenaminsyre, nabumeton, naproxen, naproxennatrium, oksyfenbutazon, fenylbutzon, piroksikam, sulindac, tolmetinnatrium.

I tillegg kan den maksimale terapeutiske fordel også oppnås ved tilførsel av dekonjestanter (f.eks. fenylefrin, fenylpropanolamin, pseudoefadrin), hosteundertrykkende

midler (f.eks. dekstrometorfan, kodein eller hydrokodon) eller analgetiske midler (f.eks. acetaminofen, aspirin).

Allergendesensitivisering er en behandlingsform hvor allergener injiseres inn i pasienten med det formål å redusere eller fjerne den allergiske respons. Behandlingen betegnes også allergenimmunterapi, hyposensitivisering eller allergiinjeksjonsterapi. Behandlingen anvendes ofte i kombinasjon med andre allergibehandlinger, men ikke ofte som primær behandling. Den har med hell blitt benyttet når det er umulig å unngå allergenet. En typisk allergendesensitiviseringsbehandling omfatter subkutan injeksjon av sterilt allergen i økende doser 1 eller 2 ganger ukentlig, inntil det oppnås en dose som gir et forbigående lite, lokalt betennelsesområde i injeksjonssetet. Denne dosen gis så som vedlikeholdsdose 1 gang hver 2. til hver 4. uke. Allergidesensitivisering anvendes vanligvis ved behandling av allergisk astma og allergisk rhinitt, selv om den med hell er blitt benyttet for behandling av anafylakse. Desensitivisering er også blitt effektivt brukt ved anvendelse av adjuvanser, f.eks. ufullstendig Freund's adjuvans, som er en emulsjon av vandig antigen i mineralolje. Den fysiologiske virkningen gir et uløselig væskedepot som smådråper av allergen gradvis frigjøres fra. En annen for allergendesensitivisering er å polymerisere monomere allergener med glutaraldehyd for å danne et molekyl med relativt lav allergenisitet (dvs. forårsake allergisk respons), samtidig som en effektiv grad av immunogenisitet opprettholdes.

G. Farmasøytiske doser:

Doser og den ønskede medikamentkonsentrasjon av farmasøytiske sammensetninger ifølge foreliggende oppfinnelse kan variere avhengig av den spesielle bruk man tenker seg. Bestemmelse av egnet dose eller administrasjonsvei ligger godt innenfor kunnskapsområdet til gjennomsnittsfagpersonen. Dyreeksperimenter gir pålitelige retningslinjer for bestemmelse av effektive doser for behandling av mennesker. Skalering av effektive doser mellom artene kan utføres ved å følge prinsippene som er etablert av J. Mordenti og W. Chappell, «The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics», i *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi *et al.*, red. Pergamon Press, New York 1989, s. 42-46.

Dersom *in vivo*-administrasjon av polypeptidene eller antistoffene beskrevet her anvendes, kan normale dosemengder variere fra omkring 10 ng/kg opptil omkring 100 mg/kg kroppsvekt for pattedyret eller mer daglig, fortrinnsvis omtrent 1 mg/kg/dag til 10 mg/kg/dag, avhengig av administrasjonsveien. Retningslinjer vedrørende spesielle doser og administrasjonsfremgangsmåter forefinnes i litteraturen, se for eksempel U.S. patentskrifter nr. 4 657 760, 5 206 344 eller 5 225 212. Det ligger innenfor oppfinnelsens område at forskjellige formuleringer vil være effektive for forskjellige behandlinger og forskjellige forstyrrelser, og at administrasjon beregnet på å behandle et bestemt organ eller vev kan nødvendiggjøre tilførsel på en måte som er forskjellig fra den til et annet organ eller vev.

Videre kan dosene administreres ved én eller flere separate administreringer eller ved kontinuerlig infusjon. For gjentatte administreringer over flere dager eller mer opprettholdes behandlingen avhengig av tilstanden inntil en ønsket undertrykkelse av sykdoms-symptomene opptrer. Andre doseringsskjemaer kan imidlertid også være anvendbare.

- 5 Progresjonen av denne behandlingen kan lett monitoreres ved konvensjonelle teknikker og analyser.

H. Administrering av formuleringen

- Formuleringene ifølge foreliggende oppfinnelse, inkludert rekonstituerte
10 formuleringer, administreres til et pattedyr med behov for behandling med proteinet, fortrinnsvis et menneske, i samsvar med kjente fremgangsmåter, slik som intravenøs administrasjon som en bolusinjeksjon eller ved kontinuerlig infusjon over et tidsrom, intramuskulært, intraperitonealt, intracerebrospinalt, subkutan, intraartikulært, intra-synovialt, intratekalt, oralt, topisk eller ved inhalering.

- 15 I foretrukne utførelser administreres formuleringene til pattedyret ved subkutan (dvs. under huden) administrering. For slike formål kan formuleringen injiseres ved anvendelse av en sprøyte. Imidlertid er andre innretninger for administrering av formuleringen tilgjengelige, slik som injeksjonsinnretninger (f.eks. innretningene «Inject-ease» og «Genject»-innretninger); injeksjonspenner (f. eks. «GenPen»), autoinjeksjons-
20 innretninger, innretninger uten kanyler (f.eks. «MediJector» og «BioJector»), og tilførselssystemer basert på subkutane plastre.

- I en spesifikk utførelse er foreliggende oppfinnelse rettet mot sett for en enkelt-dose administrerings enhet. Slike sett omfatter en beholder med en vandig formulering av terapeutisk protein eller antistoff, inkludert ferdigfylte sprøyter med ett eller flere kammere.
25 Eksempler på ferdigfylte sprøyter er tilgjengelige fra Vetter GmbH, Ravensburg, Tyskland.

- Den egnede dose («terapeutisk effektiv mengde») av proteinet vil for eksempel avhenge av tilstanden som skal behandles, tilstandens alvorlighetsgrad og forløp, hvorvidt proteinet tilføres for forebyggende eller terapeutiske formål, tidligere behandling, pasientens kliniske historie og respons på proteinet, typen protein som anvendes og den behandlende
30 leges vurderinger. Proteinets tilføres med fordel til pasienten ved 1 gangs behandling eller over en serie av behandlinger, og kan tilføres til pasienten på ethvert tidspunkt etter diagnosen og fremover. Proteinets kan tilføres som den eneste behandling eller i forbindelse med andre medikamenter eller behandlingsformer som er anvendbare for behandling av tilstanden det gjelder.

- 35 Dersom det valgte protein er et antistoff er en mulig innledende dose på omtrent 0,1-20 mg/kg, tilført pasienten enten ved én enkelt eller ved flere separate administreringer. Andre doseringsskjemaer kan imidlertid også være anvendbare. Behandlingens forløp kan lett monitoreres ved konvensjonelle teknikker.

Anvendelsesområder for en anti-IgE-formulering (f.eks. rhuMAbE-25, rhMAbE-26, Hu-901) omfatter behandling eller forebyggelse av f.eks. IgE-formidlede allergiske sykdommer, parasittinfeksjoner, interstitiell cystitt og astma. Avhengig av sykdommen eller forstyrrelsen som skal behandles tilføres en terapeutisk effektiv mengde (f.eks. fra omkring 5 1-15 mg/kg) av anti-IgE-antistoffet til pasienten.

I. Fremstilte artikler

I en annen utførelse av oppfinnelsen tilveiebringes en fremstilt artikkel som inneholder formuleringen og som fortrinnsvis gir instruksjoner vedrørende bruken. Den 10 fremstilte gjenstand omfatter en beholder. Egnede beholdere omfatter f.eks. flasker, ampuller (f. eks. ampuller med dobbelt kammer), sprøyter (f.eks. sprøyter eller dobbelt kammer) og reagensrør. Beholderen kan være dannet av en rekke materialer, f.eks. glass eller plast. Beholderen inneholder formuleringen, og merkelappen på eller forbundet med beholderen kan angi retningslinjer for rekonstituering og/eller bruk. Merkelappen kan videre 15 angi at formuleringen er anvendbar eller beregnet for subkutan tilførsel. Beholderen som inneholder formuleringen kan være en flerbruksampulle som tillater gjentatt tilførsel (f.eks. fra 2-6 tilførsler) av den rekonstituerte formulering. Den fremstilte artiklen kan videre omfatte en andre beholder som omfatter et egnet fortynningsmiddel (f.eks. BWFI). Etter sammenblanding av fortynningsmidlet og den frysetørkede formulering vil den endelige 20 proteinkonsentrasjon i den rekonstituerte formuleringen være minst 50 mg/ml. Den fremstilte artiklen kan videre omfatte andre materialer som er ønskelige fra et kommersielt synspunkt eller brukersynspunkt, inkludert andre buffere, fortynningsmidler, filtere, kanyler, sprøyter og pakkevedlegg med instruksjoner for bruk.

Oppfinnelsen vil forstås bedre ved henvisning til de påfølgende eksempler.

25 I en annen utførelse tilveiebringer oppfinnelsen en fremstilt artikkel som omfatter formuleringene som er beskrevet her for tilførsel med en autoinjeksjonsinnretning. En autoinjeksjonsinnretning kan beskrives som en injeksjonsinnretning som ved aktivering vil levere sitt innhold uten at pasienten eller den tilførende person må foreta seg noe ekstra. De er spesielt godt egnet for selvtilførsel av terapeutiske formuleringer dersom tilførsels- 30 hastigheten må være konstant og tilførselstiden er lenger enn noen få øyeblikk.

Eksempel 1

Fremstilling av Anti-IgE rhuMAbE25 («E25»)-formulering

35 Formuleringene av det monoklonale anti-IgE-antistoff rhuMAbE25 ble fremstilt fra E25 masserestporsjon K9094A (40 mg/ml rhuMAb E25, 85 mM trehalose, 5 mM histidin, pH 6, 0,01 % Tween 20) eller rhuMAbE25 Q-porsjon (5 mg/ml rhuMAb E25, 25 mM Tris, 200 mM NaCl).

Vandige løsninger av rhuMAbE25 ble fremstilt ved dialyse mot forskjellige buffere (20 mM His-HCl og 200 mM Arg-HCl, pH 6,0) ved 2-8 °C ved anvendelse av en Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette (Pierce). Prøvene ble så overført til prøvereservoaret i en Centricon-30 sentrifugebasert mikrokonsentrator (Amicon). Proteinene ble konsentrert ved å sentrifugere

5 Centricon-3-konsentratoren ved 4000-5000 g inntil den ønskede proteinkonsentrasjon oppnås.

Prøvene ble så konsentrert til ~150 mg/ml rhuMAb E25 ved ultrafiltrering. Tween 20 ble tilsatt til hver sammensetning i en sluttkonsentrasjon på 0,02 %. Alle formuleringer ble filtrering, fylt aseptisk i 3 ml FormaVitrum-ampuller og korket med 13 mM Diakyo korker i et

10 klasse 100-rom.

Eksempel 2

Fremgangsmåte og materialer:

15

Stabilitetsundersøkelser: Alle formuleringer ble fylt i 3 ml FormaVitrum-glassampuller, 1 ml i hver ampulle, og korket med 13 med mer Diakyo korker i et klasse 100 sterilfyllingsrom. Ampullene ble plassert ved -70, 2-8, 15, 30 og 40 °C i lysugjennomtrengelige beholdere.

20

Omrystingsundersøkelse: Uttak av hver formulering ble plassert i glassampullene. Ampullene ble rystet horisontalt i en Glas-Col Bench Top Shaker ved rt. Rystemaskinen ble justert til 70 med en armlengde på 30 cm (maksimum). Etter omrystingen ble prøvene undersøkt og analysert ifølge følgende fremgangsmåte.

Fryse-tineundersøkelse: Prøver av E25 gjennomgitt tre fryse-tinesykluser. Hver

25 syklus bestod av nedfrysing ved -70 °C over natten, fulgt av opptining til rt over et tidsrom på omtrent 1 t. Etter hver syklus ble prøvene undersøkt visuelt ved anvendelse av en lysboks for å anslå væskens farge og klarhet. Turbiditet og løselige aggregater ble målt ifølge fremgangsmåten som er beskrevet nedenfor.

Analytiske fremgangsmåter: Stabilitetsprøver ble analysert ved

30 fremgangsmåtene som er skissert i Tabell 1

Tabell 1: Analytiske fremgangsmåter

Analyse	Formål
Farge, klarhet, utseende ^a	Visuell inspeksjon av flytende formuleringer
Størrelseseksklusjonskromatografi (SEC) ^b	Måler % monomer, løselige aggregater og lavmolekylære bestanddeler
Hydrofob interaksjonskromatografi (HIC) ^c	Måler nivået av Asp-32-isomerisering og fri tiol

UV-spektrofotometrisk stand (Gravimetrisk) ^f	Måler proteinkonsentrasjonen
Turbiditet (gj.snittl. OD 340-360 nm) ^d	Måler løselige og uløselige aggregater
Aktivitet ^e	Måler bindingsaktiviteten til anti-IgE

^aKrav for farge, utseende og klarhet:

Farge, utseende og klarhet av prøven ble anslått visuelt mot hvit og svart bakgrunn og sammenlignet med et likt volum av negativ kontroll. Prøvene bør forsiktig roteres for å sikre homogen sammenblanding, men ikke så kraftig at det dannes luftbobler.

5

^bStørrelseseksklusionskromatografi:

En TSK SUPER SV3000 - (4,6 x 300 mm) ble anvendt i et HP 1100 kromatografisystem. 20 µg protein ble satt på kolonnen og eluert i 0,1 M kaliumfosfat, pH 6,8. Prøven ble målt ved 280 nm med en UV-detektor.

10

^cHydrofob interaksjonskromatografi (HIC):

HIC-eksperimentene ble utført ved anvendelse av en TSK Fenyl-5PW – (7,5 x 75 mm)-kolonne (TosoHaas) i et HP 1100 væskerkromatografisystem. 28 µg papainkuttete Fab-fragmenter ble satt på kolonnen, som ble eluert med en konsentrasjonsgradient av ammoniumsulfat i 20 mM Tris-buffer fra 2 M til 0 M. Toppene ble detektert ved 210 nm med en UV-detektor.

15

^dTurbiditet:

Prøvenes turbiditet ble bestemt i en kuvette med 1 cm lysveilegde ved anvendelse av et HP-spektrometer. Turbiditeten ble beregnet som den gjennomsnittlige absorbans mellom 340 og 360 nm.

20

^eAktiviteten av det monoklonale anti-IgE-antistoff ble bestemt ved en reseptorbindings-inhiberingsanalyse. Prøvene ble fortynnet slik at de lå innenfor et område av standardkurven fra 100 til 1,56 µg/ml i analysefortynningsmiddel inneholdende fosfatbuffer, 0,5 % BSA, 0,05 % polysorbat 20 og 0,01 % Thimerosol. En mikrotiterplate ble belagt med IgE-reseptor og så inkubert med IgE-biotin og fortynnet anti-IgE-prøven. Mengden av IgE-biotin som ble bundet til reseptoren, en mengde som korrelerer med aktiviteten til det monoklonale anti-IgE-antistoff, ble målt ved anvendelse av Streptavidin-HRP. Resultatene ble analysert ved anvendelse av et 4-parameters logistisk kurvetilpassingsprogram.

25

30

Konsentrasjonen av antistoff ble fremskaffet i et Hewlett Packard 8453 diodematrisespektrofotometer med en 1 cm kvarts-cuvette. Konsentrasjonen ble beregnet ved anvendelse av en absorbans på 1,5 cm⁻¹ (mg/ml)⁻¹.

35

5

Oppsummering av flytende formuleringer

Formuleringer	Proteinområde	Buffer/område	Eksipienter/område
80 mg/ml E25 50 mM histidin-HCl 150 mM trehalose 0,05% polysorbate 20 pH 6,0	40-150 mg/ml	His-HCl eller His-acetat Område: 10 m M – 100 mM	Trehalose eller sukrose Sukkerområde: 20 mM-350 m M Polysorbat: 0,01 % - 0,1 %
150 mg/ml E25 20 m M histidin-HCl 200 m M ArgHCl 0,02% polysorbat 20 pH 6,0	40-260 mg/ml	His-HCl eller His- Acetat Område: 10 mM- 100 mM	ArgHCl-område: 50 m M-200 mM Polysorbat: 0,01 % - 0,1 %

Stabilitetsresultater for 150 mg/ml E25 i histidin og ArgHCl-formulering

Temp (°C)	Tid (måneder)	Visuell	pH	SEC ^a % monomer	Aktivitet	Turbi- ditet
5	0	passerer	99,0	64	106	0,25
	1	passerer	99,2	63	100	0,27
	3	passerer	99,3	63	111	0,25
	16	passerer	98,9	62	83	0,27
30	1	passerer	98,43	54	91	0,25
	3	passerer	97,53	42	65	0,30
	16	passerer	90,63	19	28	0,54

10 Stabilitetsresultater for 80 mg/ml E25 i histidin- og trehaloseformulering

Temp (°C)	Tid måneder	Visuell	pH	SEC ^a % monomer	HIC ^b % av hoved toppen	Akti- vitet ^c	Turbi- ditet ^d
5	0	passerer	5,7	99,1	64	100	0,20
	1	passerer	5,8	98,7	63	92	0,20
	3	passerer	5,7	98,8	63	124	0,20

	6	passerer	5,7	99,1	63	97	0,21
	14	passerer	5,7	99,0	62	83	0,21
	24	passerer	5,7	98,8	62	84	0,20
30	1	passerer	5,8	98,7	55	77	0,20
	3	passerer	5,7	97,4	41	76	0,29
	6	passerer	5,8	95,5	31	48	0,38
	14	passerer	5,7	93,1	22	30	0,48

- a. Størrelseseksklusjonskromatografi for måling av løselige aggregater og Fragmenter.
- b. Hydrofob interaksjonskromatografi for papainkløyyvet E25.
- c. IgE-reseptorbindingsinhiberingsanalyse.
- 5 d. Gjennomsnittlig OD (340-360 nm).

Risteundersøkelse

Formulering	TO			Etter 3 dagers rysting		
	Visuell	SEC (% monomer)	Turbiditet	Visuell	SEC (% monomer)	Turbiditet
1	passerer	99,5	0,18	passerer	99,3	0,18
2	passerer	99,0	0,19	passerer	99,4	0,19

Formulering 1: 156 mg/ml E25, 200 mM ArgCl, 23 mM His, 0,02 % T20

Formulering 2: 150 mg/ml E25, 182 mM ArgCl, 20 mM His, 0,02 % T20

10

Fryse-tine-undersøkelse

Formu- lering	TO			Etter 1. syklus			Etter 3. syklus		
	Visuell	SEC % mono mer	Turbi- ditet	Visuell	SEC % mono mer	Turbi- ditet	Visuell	SEC % mono mer	Turbi- ditet
1	passerer	99,5	0,18	passerer	99,3	0,17	passerer	99,4	0,17
2	passerer	99,0	0,19	passerer	99,2	0,19	passerer	99,2	0,18

Formulering 1: 156 mg/ml E25, 200 mM ArgCl, 23 mM His, 0,02 % T20

Formulering 2: 150 mg/ml E25, 182 mM ArgCl, 20 mM His, 0,02 % T20

15

Eksempel 3

Prøver av de flytende formuleringene av monoklonalt anti-IgE-antistoff (E26) ble

fremstilt i 20 mM buffere, og så lagret ved 30 °C og 40 °C. Stabiliteten av E26 ble bestemt ved kromatografi og stabilitetsmålinger. Størrelseseksklusionskromatografi ble anvendt for å bestemme løselige aggregater, mens hydrofob interaksjons-kromatografi av pepsinkløyvd prøve ble anvendt for måling av isomerisering. Aktiviteten av prøven ble målt ved
 5 anvendelse av en IgE-reseptorbindingsinhiberingsanalyse. Som vist i figurene 1, 2 og 3 er degraderingen av E26 svært avhengig av bufferens pH. E26 ser ut til å være mest stabil rundt pH 6,0.

Eksempel 4

10 Partikkeldannelse er en hovedutfordring når det gjelder fremstilling av flytende formulering med høy proteinkonsentrasjon, siden partikkeldannelsen vanligvis øker med økende proteinkonsentrasjon under stressbetingelser. Fig. 4 viser resultatene fra en omrystingsundersøkelse for en flytende formulering med konsentrert E26. Formuleringen ble
 15 fremstilt i 20 mM suksinat, 192 mM trehalose ved pH 6,0 med forskjellige konsentrasjoner av polysorbat 20. Partikkeldannelsen ble målt ved turbiditetsmåling. Resultatene viser at turbiditeten av E26-løsningen øker med omrystingstiden. Tilsetning av minst 0,01 % polysorbat er avgjørende for å redusere partikkeldannelsen under stressbetingelser. Tilsvarende resultater ble også observert for flytende formulering av konsentrert E25.

Eksempel 5

20 Fig. 5 viser den flytende formulering med 150 mg/ml E25, fremstilt ved rekonstituering av frysetørket E25. En økning av saltkonsentrasjonen inhiberer den reversible partikkeldannelsen og fører til reduksjon av turbiditetsmålingen. Blant alle de analyserte saltene ser formuleringen med Arg-HCl ut til å ha den laveste turbiditet.
 25 Virkningen av saltkonsentrasjonen på reduksjonen av turbiditetsmålingen er også blitt observert for E25 fremstilt ved anvendelse av en TFF-prosess.

Eksempel 6

30 Den flytende formuleringen av E26 i nærvær av Arg-HCl ser også ut til å ha bedre stabilitet enn andre flytende formuleringer. Figurene 6 og 7 viser stabilitetsundersøkelsen av E26 ved en konsentrasjon på 150 mg/ml i flytende formuleringer inneholdende Arg-HCl, CaCl₂ og MgCl₂. For flytende formulering inneholdende Arg-HCl med eller uten sukrose er det liten forskjell i stabiliteten når det gjelder turbiditet, isomerisering og fragmentering. De flytende formuleringene som inneholder Arg-HCl er mer stabile enn formuleringen som
 35 inneholder MgCl₂ og CaCl₂.

Eksempel 7

Fig. 8 viser resultatene fra en stabilitetsundersøkelse av flytende E25-formulering med acetat og histidin. Formuleringen med histidin har høyere pH enn acetatformuleringen.

Resultatene viste tydelig at E25 i en flytende histidin/Arg-HCl-formulering er mer stabil enn under andre betingelser.

5

Eksempel 8

Den høye konsentrasjonen av E25 kan danne en fast gel i nærvær av visse ioner, f.eks. citrat, suksinat og sulfat (Tabell 1), særlig ved en lagringstemperatur på 2-8 °C.

10 Anvendelse av arginin-HCl som eksipient tillater oss å utforme E25 i konsentrasjoner som er høyere enn 200 mg/ml uten geldannelse eller utfelling.

Tabell 1: Virkning av forskjellige eksipienter på geldannelse av E25 ved 125 mg/ml, pH ~6,0

Eksipient	Eksipient Konsentrasjon mM	Sammen- setning	Turbiditet ved T0 (340-360 nm)	Antistoff Konsen- trasjon mg/ml	Visuelt utseende
SWFI		Lyo Recon	0.21	125	Klar
NaCl	188	Lyo Recon	0.25	125	Klar
Suksinat	94	Lyo Recon	0.31	125	Gel
Suksinat	19	Lyo Recon	0.28	125	Gel
Citrat	188	Lyo Recon	Pending	125	Gel
Citrat	19	Lyo Recon	Pending	125	Gel
Na ₂ SO ₄	Pending	Lyo Recon	Pending	125	Gel
Na ₂ SO ₄	Pending	Lyo Recon	Pending	125	Opaliserende
Fosfat	Pending	Lyo Recon	Pending	125	Opaliserende
Acetat	188	Lyo Recon	Pending	125	Klar
Acetat	94	Lyo Recon	Pending	125	Klar
Acetat	19	Lyo Recon	Pending	125	Klar
Histidin	94	Lyo Recon	0.19	125	Klar
Histidin	47	Lyo Recon	0.24	125	Klar
Arginin-HCl	150	Lyo Recon	0.25	137	Klar
Arginin-HCl	200	TFF	0.19	162	Klar
Arginin-SO ₄	150	Lyo Recon	0.27	137	Gel
CaCl ₂	125	TFF	0.32	147	Klar
MgCl ₂	125	TFF	0.48	147	Opaliserende

15 **Eksempel 9**

Ekspresjon av protein eller antistoff i *E. coli*

Dette eksempel illustrerer fremstilling av en ikke-glykosilert form av et ønsket protein eller antistoff ved rekombinant ekspresjon i *E. coli*.

5 DNA-sekvensen som koder for det ønskede protein eller antistoff amplifiseres i utgangspunktet ved anvendelse av utvalgte PCR-primere. Primerene bør inneholde restriksjonsenzymseter som tilsvarer restriksjonsenzymsetene i den valgte ekspresjonsvektor. En rekke ekspresjonsvektorer kan benyttes. Et eksempel på en egnet vektor er pBR322 (avledet fra *E. coli*, se Bolivar *et al.*, *Gene*, 2:95 (1977), som inneholder gener for
10 ampicillin- og tetracyklinresistens. Vektoren kuttet med restriksjonsenzym og defosforyles. De PCR-amplifiserte sekvensene liggeres så inn i vektoren. Vektoren vil fortrinnsvis omfatte sekvenser som koder for et antibiotikaresistent gen, en trp-promoter, en poly-his-ledersekvens (inkludert de første seks STII-kodonene, en poly-his-sekvens og et enterokinasespaltingssete), det kodende området for det ønskede protein eller antistoff,
15 transkripsjonsterminatoren fra bakteriofag lambda og et argU-gen. I tillegg kan vektoren inneholde i det minste ikke ubetydelige deler av de ikke-translaterte 5'- og 3'-områdene fra nukleinsyren med nativ sekvens som koder for det ønskede protein eller antistoff.

Ligeringsblandingen anvendes så for transformasjon av en utvalgt *E. coli*-stamme ved anvendelse av fremgangsmåtene beskrevet i Sambrook *et al.*, *supra*. Transformantene
20 påvises ved deres evne til å vokse på LB-skåler, og antibiotikaresistente kolonier velges så. Plasmid-DNA kan isoleres og bekreftes ved restriksjonsanalyse og DNA-sekvensering.

Utvalgte kloner kan dyrkes over natten i flytende dyrkningsmedium, f.eks. LB-medium tilsatt antibiotika. Over natt-kulturen kan deretter anvendes for inokulering av en kultur i større skala. Cellene dyrkes så til en ønsket optisk tetthet, og i løpet av dyrkingen
25 skrus ekspresjonspromoterer på.

Etter dyrking av cellene i ytterligere flere timer kan cellene høstes ved sentrifugering. De nedsentrifugerte cellene kan solubiliseres ved anvendelse av forskjellige midler som er kjente innen faget, og det solubiliserte ønskede protein eller antistoff kan så
30 renses ved anvendelse av metallchelaterende kolonne under betingelser som tillater sterk binding av det solubiliserte protein eller antistoff.

Det ønskede protein eller antistoff kan uttrykkes i *E. coli* i en poly-His-merket form ved anvendelse av den påfølgende fremgangsmåten. DNA som koder for det ønskede protein eller antistoff amplifiseres i utgangspunktet ved anvendelse av utvalgte PCR-primere. Primerene vil inneholde restriksjonsenzymseter som tilsvarer restriksjonsenzymseter i den
35 valgte ekspresjonsvektor og andre anvendbare sekvenser som gir effektiv og pålitelig translasjonsinitiering, hurtig rensing på en metallchelaterende kolonne og proteolytisk fjerning med enterokinase. De PCR-amplifiserte poly-His-merkede sekvensene liggeres så inn i en ekspresjonsvektor, som anvendes for transformasjon av en *E. coli*-vert basert på stamme 52 (W3110 fuA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)). Transformantene dyrkes først i LB

tilsatt 50 mg/ml karbenicillin ved 30 °C under omrysting inntil en O.D. ved 600 nm på 3-5 nås. Kulturene fortynnes så 50-100 ganger med CRAP-medium (fremstilt ved å sammenblande 3,57 g (NH₄)₂SO₄, 0,75 natriumcitrat.2H₂O, 1,07 g KCl, 5,36 g Difco gjærekstrakt, 5,36 g Sheffield hycase SF i 500 ml vann, så vel som 110 mM MPOS pH 7,3, 0,55% (vekt/vol) glukose og 7 mM MgSO₄) og dyrkes i omtrent 20-30 t ved 30 °C under omrysting. Prøver tas ut for å bekrefte ekspresjonen ved SDS-PAGEanalyse, og cellene i hovedkulturen nedsentrifugeres. De nedsentrifugerte cellene nedfrysas inntil rensing og gjenfolding av proteinet.

E. coli-masse fra 0,5-1 L fermenteringer (6-10 g bakteriemasse) resuspenderes i 10 volumer (vekt/vol) 7 M guanidin, 20 mM Tris, pH 8. Fast natriumsulfitt og natriumtetrationat tilsettes til sluttkonsentrasjoner på 0,1 M, henholdsvis 0,02 M, og løsningen omrøres over natten ved 4°C. Dette trinnet fører til et denaturert protein hvor alle cysteinrester er blokkert ved sulfittolisering. Løsningen sentrifugeres ved 40000 rpm i en Beckman Ultracentrifuge i 30 min. Supernatanten fortynnes med 3-5 volumer metallchelatkolonbuffer (6 M guanidin, 20 mM Tris, pH 7,4) og filtreres gjennom 0,22 µm filtere for klarning. Det klarnede ekstrakt settes på en 5 ml Qiagen Ni-NTA metallchelatkolonne ekvilibrert i metallchelatkolonbuffer. Kolonnen vaskes med ytterligere buffer inneholdende 50 mM imidazol (Calbiochem, Utrol renhet), pH 7,4. Proteinet elueres med buffer tilsatt 250 mM imidazol. Fraksjoner som inneholder det ønskede protein slås sammen og lagres ved 4 °C. Proteinkonsentrasjonen beregnes ut fra absorbansen ved 280 nm ved anvendelse av den beregnede ekstinksjonskoeffisient, basert på aminosyresekvensen.

Proteinene gjenfoldes ved langsam fortynning av prøven med nylagd gjenfoldingsbuffer bestående av 20 mM Tris, pH 8,6, 0,3 M NaCl, 2,5 M urea, 5 mM cystein, 20 mM glycin og 1 mM EDTA. Gjenfoldingsvolumene velges slik at den endelige protein-konsentrasjon er mellom 50 og 100 mikrogram/ml. Gjenfoldingsløsningen omrøres forsiktig ved 4 °C i 12-36 t. Gjenfoldingsreaksjonen stanses ved tilsetning av TFA til en slutt-konsentrasjon på 0,4 % (pH omtrent 3). Før videre rensing av proteinet filtreres løsningen gjennom et 0,22 mikrom filter, og acetonitril tilsettes til en sluttkonsentrasjon på 2-10 %. Det gjenfoldede protein kromatograferes på en Poros RH/1 revers fase-kolonne ved anvendelse av en mobil buffer med 0,1 % TFA og eluering med en gradient av acetonitril fra 10-80 %. Uttak av fraksjoner som absorberer ved 280 nm analyseres ved SDS-polyakrylamidgelelektroforese, og fraksjoner som inneholder homogent, gjenfoldet protein slås sammen. Generelt elueres korrekt foldet utgave av de fleste proteiner ved den laveste acetonitrilkonsentrasjonen, siden disse molekylerne er mest kompakte, med sitt hydrofobe indre beskyttet mot interaksjoner med revers fase-resinet. Aggregererte molekyler elueres vanligvis ved høyere acetonitrilkonsentrasjoner. I tillegg til å fjerne feilfoldede former av proteiner fra den ønskede form vil revers fase-trinnet også fjernet endotoksin fra prøvene.

Fraksjoner som inneholder det foldede ønskede protein eller antistoff slås sammen, og acetonitril fjernes ved anvendelse av en svak nitrogenstrøm rettet mot løsningen.

Proteinene formuleres i 20 mM Hepes, pH 6,8 med 0,14 M natriumklorid og 4 % mannitol ved dialyse eller gelfiltrering ved anvendelse av G25 Superfine (Pharmacia) resin ekvilibrert i formuleringsbuffer og sterilt filtrert.

5 Eksempel 10

Ekspresjon av protein eller antistoff i pattedyrceller

Dette eksempel illustrerer fremstilling av mulig glykosilerte former av det ønskede protein eller antistoff ved rekombinant ekspresjon i pattedyrceller.

- 10 Vektoren pRK5 (se EP 307.247, publisert 15. mars 1989) benyttes som ekspresjonsvektor. Om ønskelig ligeres DNA som koder for det ønskede protein eller antistoff inn i pRK5 med utvalgte restriksjonsenzymer som tillater innsetting av slik DNA, ved anvendelse av ligeringsfremgangsmåter som dem beskrevet i Sambrook *et al.*, *supra*.

- 15 I én utførelse kan de utvalgte vertscellene være 293-celler. Humane 293-celler (ATCC CCL 1573) dyrkes til konfluens i vevskulturplater i medium, f.eks. DMEM tilsatt føtalt kalveserum og om ønskelig andre næringsstoffer og/eller antibiotika. Omtrent 10 µg DNA som koder for det ønskede protein eller antistoff ligert inn i pRK5 blandes med omtrent 1 µg DNA som koder for VA RNA-genet [Thimmappaya *et al.*, *Cell*, 31:543 (1982)], og løses i 500 µl 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 0,227 M CaCl₂. Denne blandingen tilsettes dråpevis 500 µl
20 50 mM Hepes (pH 7,35), 280 mM NaCl, 1,5 mM NaPO₄ og en utfelling får dannes over et tidsrom på 10 min. ved 25 °C. Utfelt materiale suspenderes og tilsettes til 293-cellene, og får sette seg i omtrent 4 t ved 37°. Dyrkningsmediet avsuges, og 2 ml 20 % glyserol i PBS tilsettes i 30 sek. 293-cellene vaskes så med serumfritt medium, friskt medium tilsettes, og cellene inkuberes i omtrent 5 dager.

- 25 Omtrent 24 t etter transfeksjonene fjernes dyrkningsmediet og erstattes med dyrkningsmedium (alene) eller dyrkningsmedium tilsatt 200 µCi/ml ³⁵S-cystein og 200 µCi/ml ³⁵S-metionin. Etter inkubering i 12 t oppsamles det kondisjonerte medium, konsentreres med et sentrifugeringsfilter og settes på en 15 % SDS-gel. Den prosesserte gelen kan tørkes og eksponeres overfor film for et utvalgt tidsrom for å vise nærvær av det
30 ønskede protein eller antistoff. Kulturene som inneholder transfekteerte celler kan også gjennomgå ytterligere inkubering (i serumfritt medium), og mediet analyseres i utvalgte bioanalyser.

- I en alternativ teknikk kan det ønskede protein eller antistoff innføres forbigående i 293-celler ved anvendelse av dekstransulfatfremgangsmåten beskrevet av Sumparyrac *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 12:7575 (1981). 293-celler dyrkes til maksimal tetthet i en
35 spinnerflaske, og 700 µg DNA som koder for det ønskede protein eller antistoff ligert inn i pRK5, tilsettes. Cellene konsentreres først fra spinnerflasken ved sentrifugering og vaskes med PBS. DNA-dekstranutfelling inkuberes på de nedsentrifugerte cellene i 4 t. Cellene behandles med 20 % glyserol i 90 sek., vaskes med vevsdyrkningsmedium og føres tilbake

til spinnerflasken tilsatt vevsdyrkningsmedium, 5 µg/ml insulin fra storfe og 0,1 µg/ml transferin fra storfe. Etter omtrent 4 dager sentrifugeres det kondisjonerte medium og filtreres for fjerning av celler og celleresten. Prøven som inneholder det uttrykte ønskede protein eller antistoff kan så oppkonsentreres og renses ved hvilken som helst utvalgt fremgangsmåte, f.eks. dialyse og/eller kolonnekromatografi.

I en annen utførelse kan det ønskede protein eller antistoff uttrykkes i CHO-celler. DNA som koder for det ønskede protein eller antistoff ligert inn i pRK5 kan transfekteres inn i CHO-celler ved anvendelse av kjente reagenser, f.eks. CaPO₄ eller DEAE-dekstran. Som beskrevet ovenfor kan cellekulturene inkuberes og mediet erstattes med dyrkningsmedium (alene) eller medium tilsatt en radioaktivt merket forbindelse, f.eks. ³⁵S-metionin. Etter bestemmelse av nærvær av det ønskede protein eller antistoff kan dyrkningsmedium erstattes med serumfritt medium. Kulturene inkuberes fortrinnsvis i omtrent 6 dager, hvor det kondisjonerte medium høstes. Medium som inneholder det uttrykte ønskede protein eller antistoff kan så oppkonsentreres og renses ved hvilken som helst utvalgt fremgangsmåte.

Epitopmerkede varianter av det ønskede protein eller antistoff kan også uttrykkes i CHO-vertsceller. DNA som koder for det ønskede protein eller antistoff som ligeres inn i pRK5 kan subklones ut av pRK5-vektoren. Innskuddet i subklonen kan behandles ved PCR for fusjon med opprettholdt leseramme til en utvalgt epitopmerkelapp, f.eks. en poly-His-merkelapp, inn i en Baculovirus-ekspresjonsvektor. Det poly-His-merkede DNA som inneholder det ønskede protein- eller antistoffinnskudd kan så subklones i en SV40-drevet vektor som inneholder en seleksjonsmarkør, f.eks. DHFR, for seleksjon av stabile kloner. Endelig kan CHOcellene transfekteres (som beskrevet ovenfor) med den SV40-drevede vektor. Merking kan utføres som beskrevet ovenfor for å bekrefte ekspresjon. Dyrkningsmediet som inneholder det uttrykte, poly-His-merkede ønskede protein eller antistoff kan så oppkonsentreres og renses ved hvilken som helst utvalgt fremgangsmåte, f.eks. ved Ni²⁺-chelataffinitetskromatografi.

Det ønskede protein eller antistoff kan også uttrykkes i CHO- og/eller COS-celler ved en forbigående ekspresjonsfremgangsmåte eller i CHO-celler ved en annen fremgangsmåte for stabil ekspresjon.

Stabil ekspresjon i CHO-celler oppnås ved anvendelse av følgende fremgangsmåte. Proteinene uttrykkes som en IgG-konstruksjon (immunadhesin) hvor de kodende sekvensene for de løselige formene (f.eks. de ekstracellulære domener) fra de angjeldende proteiner er fusjonert til en IgG1 konstant områdesekvens inneholdende hengseldomenet, CH2-domenet og CH3-domenet, og/eller i en poly-His-merket form.

Etter PCR-amplifisering subklones de angjeldende DNA i en CHO-ekspresjonsvektor ved anvendelse av standardteknikker som er beskrevet i Ausubel *et al.*, *Current Protocols of Molecular Biology*, enhet 3.16, John Wiley and Sons (1997). CHO-ekspresjonsvektorene er konstruert slik at de har compatible restriksjons seter 5' og 3' for DNA av interesse, noe som tillater enkel utbytting av cDNA'er. Vektoren anvendes for ekspresjon i CHO-celler som

beskrevet i Lucas *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* 24:9 (1774-1779) (1996) og benytter den tidlige promotor/enhancer fra SV40 for å styre ekspresjonen av cDNA av interesse og dihydrofolatreduktase (DHFR). DHFR-ekspresjon tillater seleksjon for stabil opprettholdelse av plasmidet etter transfeksjonen.

5 12 µg av det ønskede plasmid DNA innføres i omtrent 10 millioner CHO-celler ved anvendelse av de kommersielt tilgjengelige transfeksjonsreagensene «Superfect®» (Qiagen), «Dosper®» eller «Fugene®» (Boehringer Mannheim). Cellene dyrkes som beskrevet i Lucas *et al.*, *supra*. Omtrent 3×10^7 -celler nedfrysas i en ampulle for videre dyrking og produksjon som beskrevet nedenfor.

10 Ampullene som inneholder plasmid-DNA tines ved å plasseres i et vannbad og sammenblandes ved vortex-behandling. Innholdet pipetteres over i et sentrifugerør inneholdende 10 ml medium og sentrifugeres ved 1000 rpm i 5 min. Supernatanten avsuges og cellene resuspendes i 10 ml seleksjonsmedium (0,2 µm filtrert PS20 med 5 % 0,2 µm-diafiltrert føtalt bovint serum. Cellene fordeles så over i en 100 ml spinnerflaske tilsatt 90 ml
15 seleksjonsmedium. Etter 1-2 dager overføres cellene til en 250 ml spinnerflaske fylt med 150 ml seleksjonsmedium og inkuberes ved 37 °C. Etter ytterligere 2-3 dager inokuleres 250 ml, 500 ml og 2000 ml spinnerflasker med 3×10^5 -celler/ml. Cellemediet byttes med friskt medium ved sentrifugering og resuspending i produksjonsmedium. Selv om ethvert egnet CHO-medium kan benyttes, kan et produksjonsmedium som er beskrevet i U.S. patentskrift
20 nr. 5 122 469, tildelt 16. juni 1992, anvendes. En 3L produksjonsspinnerflaske inokuleres med $1,2 \times 10^6$ -celler/ml. På dag 0 bestemmes celletallet og pH. På dag 1 analyseres spinnerkulturen, og gjennomblåsing med filtrert luft begynner. På dag 2 analyseres spinnerkulturen, temperaturen endres til 33 °C og 30 ml 500 g/l glukose og 0,6 ml 10 % antiskummiddel (f.eks. 35% polydimetylsiloksanemulsjon, Dow Corning 365 emulsjon av
25 medisinsk renhet) tilsettes. Gjennom hele produksjonen justeres pH etter behov for å holdes rundt 7,2. Etter 10 dager eller etter at cellenes levedyktighet er redusert til under 70 %, høstes cellekulturen ved sentrifugering og filtrering gjennom et 0,22 µm filter. Filtratet lagres enten ved 4 °C eller settes umiddelbart på kolonner for rensing.

For de poly-His-merkede konstruksjonene renses proteinene ved anvendelse av en
30 Ni-NTA-kolonne (Qiagen). Før rensingen tilsettes imidazol til det kondisjonerte medium til en konsentrasjon på 5 mM. Det kondisjonerte medium pumpes på en 6 ml Ni-NTA-kolonne ekvilibriert ved 4 °C i 20 mM Hepes, pH 7,4 tilsatt 0,3 M NaCl og 5 mM imidazol med en gjennomstrømningshastighet på 4-5 ml/min. Etter påsettingen vaskes kolonnen med ytterligere ekvibreringsbuffer og proteinet elueres med ekvibreringsbuffer tilsatt 0,25 M
35 imidazol. Det svært rensede protein avsaltes så over i en lagringsbuffer inneholdende 10 mM Hepes, 0,14 M NaCl og 4 % mannitol pH 6,8 ved hjelp av en 25 ml G25 Superfine (Pharmacia)-kolonne og lagres ved -80 °C.

Immunadhesin (Fc-holdige)-konstruksjoner renses fra kondisjonert medium som følger. Det kondisjonerte medium pumpes på en 5 ml Protein A-kolonne (Pharmacia),

ekvilibrert med 20 mM Na-fosfatbuffer pH 6,8. Etter påsettingen vaskes kolonnen grundig med ekvilibreringsbuffer før eluering med 100 mM sitronsyre pH 3,5. Det eluerte protein nøytraliseres umiddelbart ved oppsamling av 1 ml fraksjoner i rør tilsatt 275 µl 1 M Tris-buffer pH 9. Det svært rensede protein avsaltes så over i lagringsbuffer som beskrevet ovenfor for de poly-His-merkede proteinene. Homogeniteten bekreftes ved SDS-polyakrylamidgelelektroforese og ved N-terminal aminosyresekvensering ved Edman-degradering.

Eksempel 11

Ekspresjon av protein eller antistoff i gjær

Den påfølgende fremgangsmåten beskriver rekombinant ekspresjon av det ønskede protein eller antistoff i gjær.

Først konstrueres gjærekspresjonsvektorer for intracellulær produksjon eller sekresjon av det ønskede protein eller antistoff fra ADH2/GAPDH-promoterene. DNA som koder for det ønskede protein eller antistoff og promoterene settes inn i egnede restriksjonsenzymsteder i det valgte plasmid for styring av intracellulær ekspresjon. For sekresjon kan DNA som koder for det ønskede protein eller antistoff klones inn i det utvalgte plasmid sammen med DNA som koder for ADH2/GAPDH-promoterene, et nativt signalpeptid eller et annet signalpeptid fra et pattedyr, eller f.eks. en sekretorisk signalsekvens/-ledersekvens fra alfa-faktor eller invertase fra gjær, og linkersekvenser (om nødvendig) for ekspresjon av det ønskede protein eller antistoff.

Gjæceller, f.eks. gjærstammen AB110, kan så transformeres med ekspresjonsplasmidene som er beskrevet ovenfor og dyrkes i et utvalgt fermenteringsmedium.

Supernatanter fra de transformerte gjærcellene kan analyseres ved utfelling med 10 % triklorediksyre og separasjon ved SDS-PAGE, fulgt av farging av gelene med Coomassie Blue.

Det rekombinante protein eller antistoff kan så isoleres og renses ved å fjerne gjærcellene fra fermenteringsmediet ved sentrifugering, og så oppkonsentrere mediet ved anvendelse av utvalgte patronfiltere. Konsentratet som inneholder det rekombinante protein eller antistoff kan renses videre ved anvendelse av utvalgte kolonnekromatografiresiner.

Eksempel 12

Ekspresjon av proteinet eller antistoffet i Baculovirusinfiserte insektceller

Den påfølgende fremgangsmåten beskriver rekombinant ekspresjon av det ønskede protein eller antistoff i Baculovirusinfiserte insektceller.

Sekvensen som koder for det ønskede protein eller antistoff fusjoneres oppstrøms for en epitopmerkelapp som foreligger i en Baculovirusekspresjonsvektor. Slike epitopmerkelapper omfatter poly-his-merkelapper og immunglobulinmerkelapper (f.eks. Fc-områder fra IgG). En rekke plasmider kan benyttes, inkludert plasmider avledet fra kommersielt tilgjengelige plasmider som pVL193 (Novagen). Kort beskrevet amplifiseres sekvensen som koder for den ønskede delen av proteinet eller antistoffet, f.eks. sekvensen som koder for det ekstracellulære domenet i et transmembranprotein eller sekvensen som koder for det modne protein dersom proteinet er ekstracellulært, ved PCR med primere som er komplementære til det 5' og det 3'-merkede området. 5'-primeren kan inneholde flankerende (utvalgte) restriksjonsenzymseter. Produktet kuttes så med de valgte restriksjonsenzymene og subklones i ekspresjonsvektoren.

Rekombinant baculovirus dannes ved å kotransfekte plasmidet ovenfor og «BaculoGold»™-virus DNA (Pharmingen) i *Spodoptera frugiperda* («Sf9»)-celler (ATCC CRL 1711) ved anvendelse av lipofektin (kommersielt tilgjengelig fra GIBCO-BRL). Etter 4-5 dagers inkubering ved 28 °C høstes frigjort virus og anvendes for ytterligere amplifiseringer. Virusinfeksjon og proteinekspresjon utføres som beskrevet av O'Reilly *et al.*, *Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual*, Oxford University Press (1994).

Uttrykt poly-his-merket protein eller antistoff kan så renses, f.eks. ved Ni²⁺-chelataffinitetskromatografi som følger. Ekstrakter fremstilles fra Sf9-celler infisert med rekombinant virus som beskrevet av Rupert *et al.*, *Nature*, **362**:175-179 (1993). Kort beskrevet vaskes Sf9-cellene, resuspenderes i ultralydbehandlingsbuffer (25 ml Hepes, pH 7,9, 12,5 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 10 % glyserol, 0,1 % NP-40, 0,4 M KCl) og ultralyd-behandles 2 ganger i 20 sek. på is. De ultralydbehandlede prøvene klarnes ved sentrifugering, og supernatanten fortynnes 50 ganger med påsettingsbuffer (50 mM fosfat, 300 mM NaCl, 10 % glycerol, pH 7,8) og filtreres gjennom et 0,45 µm filter. En Ni²⁺-NTA-agarosekolonne (kommersielt tilgjengelig fra Qiagen) med et kolonnevolum på 5 ml fremstilles, vaskes med 25 ml vann og ekvilibrerer med 25 ml påsettingsbuffer. Det filtrerte celleekstrakt settes på kolonnen med 0,5 ml pr. min. Kolonnen vaskes til A₂₈₀ når basalnivået med påsettingsbuffer, hvorefter oppsamling av fraksjoner begynner. Kolonnen vaskes så med sekundær vaskebuffer (50 mM fosfat, 300 mM NaCl, 10 % glyserol pH 6,0), som eluerer uspesifikt bundet protein. Etter at A₂₈₀ igjen når basalnivået fremkalles kolonnen med en 0-500 mM imidazolgradient i sekundær vaskebuffer. Fraksjoner på 1 ml oppsamles og analyseres ved SDS-PAGE og sølvfarging eller Western-blotting med Ni²⁺-NTA konjugert til alkalisk fosfatase (Qiagen). Fraksjoner som inneholder det eluerte His₁₀-merkede protein eller antistoff slås sammen og dialyseres mot påsettingsbuffer.

Alternativt kan rensing av IgG-merket (eller Fc-merket) protein eller antistoff utføres ved anvendelse av kjente kromatografiteknikker, inkludert f.eks. protein A- eller protein G-kolonnekromatografi.

Eksempel 13

Fremstilling av antistoffer

5 Dette eksempel illustrerer fremstilling av monoklonale antistoffer som spesifikt kan bindes til proteinet av interesse eller det ønskede antigen.

Teknikker for fremstilling av monoklonale antistoffer er kjente innen faget og er beskrevet f.eks. i Goding, *supra*. Immunogener som kan benyttes omfatter rensset ønsket protein eller målantistoff, fusjonsproteiner som inneholder det ønskede protein eller målantigen og celler som uttrykker slikt rekombinant protein eller antigen på celleoverflaten.

10 Velgelsen av immunogenet kan gjøres av en erfaren fagperson uten omfattende eksperimentering.

Mus, f.eks. Balb/c-mus, immuniseres med det ønskede protein eller målantigen-immunogen emulgert i komplett Freund's adjuvans og injisert subkutant eller intraperitonealt i en mengde på 1-100 mikrogram. Alternativt emulgeres immunogenet i

15 MPL-TDM-adjuvans (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) og injiseres i fotputene på bakbeina. De immuniserte musene gis så en forsterkerinjeksjon 10-12 dager senere med ytterligere immunogen emulgert i den valgte adjuvans. Deretter kan dyrene i flere uker gis ytterligere immuniseringsinjeksjoner. Serumprøver kan regelmessig fremskaffes fra musene ved retro-orbital tapping for analyse i ELISA-analyser for påvisning av antistoffer rettet mot

20 det ønskede protein eller antigen.

Etter påvisning av et egnet antistofftiter kan dyr som er «positive» for antistoff injiseres med en endelig, intravenøs injeksjon av det ønskede protein eller målantigen. 3-4 dager senere avlives musene, og miltcellene høstes. Miltcellene fusjoneres så (ved anvendelse av 35 % polyetylglykol) til en utvalgt musemyelomcellelinje, f.eks.

25 P3X63AgU.1, tilgjengelig fra ATCC under betegnelsen CRL 1597. Fusjonene gir hybridomceller, som så kan utsås i 96-brønners vevsdyrkningsplater inneholdende HAT (hypoxantin, aminopterin og thymidin) medium for å inhibere proliferasjon av ikke-fusjonerte celler, myelomhybrider og miltcellehybrider.

Hybridomcellene vil så analyseres i en ELISA for reaktivitet mot det ønskede protein eller målantigen. Bestemmelse av «positive» hybridomceller som utskiller slike monoklonale antistoffer ligger innenfor teknikkens stand.

30

De positive hybridomcellene kan injiseres intraperitonealt i syngeneiske Balb/c-mus for fremstilling av ascites som inneholder slike monoklonale antistoffer. Alternativt kan hybridomcellene dyrkes i vevsdyrkningsflasker eller rulleflasker. Rensing av

35 de monoklonale antistoffene som dannes i ascites kan oppnås ved anvendelse av ammoniumsulfatutfelling, fulgt av geleksklusjonskromatografi. Alternativt kan affinitetskromatografi basert på binding av antistoff til protein A eller protein G benyttes.

Eksempel 14

Rensing av det ønskede protein ved anvendelse av spesifikke antistoffer

Det ønskede protein, i enten nativ eller rekombinant form, kan renses ved en rekke standardteknikker innen proteinrenningsfaget. F.eks. kan pro-polypeptidformer, modne
5 polypeptidformer eller pre-polypeptidformer av det ønskede protein renses ved immunaffinitetskromatografi og anvendelse av antistoffer som er spesifikke for det ønskede protein. Generelt fremstilles en immunaffinitetskolonne ved å binde antistoffet som spesifikt binder det ønskede protein kovalent til et aktivt kromatografiresin.

Polyklonale immunglobuliner fremstilles fra immunserum, enten ved utfelling med
10 ammoniumsulfat eller ved rensing på immobilisert protein A (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Likeså fremstilles monoklonale antistoffer fra museascitesvæske ved ammoniumsulfatutfelling eller kromatografi på immobilisert protein A. Delvis rensed immunglobulin bindes kovalent til et kromatografiresin, f.eks. CnBr-aktivert «SEPHAROSE»™ (Pharmacia LKB Biotechnology). Antistoffet kobles til resinet, resinet blokkeres og det
15 derivatiserte resin vaskes ifølge produsentens instruksjoner.

En slik immunaffinitetskolonne benyttes for rensing av det ønskede protein ved å fremstille en fraksjon fra celler som utdyrker proteinet i løselig form. Denne sammen-
setningen oppnås ved å solubilisere hele cellen eller en subcellulær fraksjon fremskaffet ved differensiell sentrifugering ved tilsetning av detergent eller ved andre fremgangsmåter som
20 er kjente innen faget. Alternativt kan løselig protein som inneholder en signalsekvens utskilles i anvendbare mengder til mediet som cellene dyrkes i.

Det solubiliserte sammensetning som inneholder det ønskede protein får passere over immunaffinitetskolonnen, og kolonnen vaskes under betingelser som tillater preferensiell absorpsjon av det ønskede protein (f.eks. buffere med høy ionestyrke i nærvær
25 av detergent). Så elueres kolonnen under betingelser som bryter bindinger mellom antistoff og protein (f. eks. en buffer med lav pH, f.eks. omtrent pH 2-3, eller høy konsentrasjon av et chaotrop middel f.eks. urea eller tiocyanation), og det ønskede protein oppsamles så.

P a t e n t k r a v

1. Stabil, flytende formulering med lav turbiditet,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter (a) et anti-IgE-antistoff i en mengde av
5 tilnærmet 150 mg/ml, hvor anti-IgE-antistoffet omfatter to identiske lette kjeder og to
identiske tunge kjeder, hver lett kjede omfatter aminosyresekvensen identifisert som E25 i
figur 10A og hver tung kjede omfatter aminosyresekvensen identifisert som E25 i figur 10B,
(b) arginin-HCl i en mengde av 200 mM, (c) histidin i en mengde av 20 mM, (d) polysorbat i
en mengde av 0,01 til 0.1 %, hvor formuleringen videre har en pH på 6,0.
10
2. Formulering ifølge krav 1, hvor polysorbatet er i en mengde på 0,02 %.
3. Fremstilt artikkel,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en beholder som inneholder formuleringen
15 ifølge et hvilket som helst av de tidligere krav.
4. Fremstilt artikkel ifølge krav 3, hvor beholderen er en sprøyte.
5. Fremstilt artikkel ifølge krav 4, hvor sprøyten videre inngår i en
20 injeksjonsinnretning.
6. Fremstilt artikkel ifølge krav 5, hvor injeksjonsinnretningen er en autoinjektor.
7. Anvendelse av en formulering ifølge et hvilket som helst av krav 1 eller 2 for
25 fremstilling av et medikament for behandling av en IgE-mediert forstyrrelse.
8. En formulering ifølge et hvilket som helst av krav 1 eller 2 for anvendelse ved
behandling av en IgE-mediert forstyrrelse.
- 30 9 Anvendelse ifølge krav 7 eller formuleringen for anvendelse ifølge krav 8, hvor den
IgE-medierte forstyrrelsen er valgt fra gruppen som består av allergisk rhinitt, astma,
allergisk astma, ikke-allergisk astma, atopisk dermatitt og gastroenteropati.
- 10 Anvendelse ifølge krav 7 eller formuleringen for anvendelse ifølge krav 8, hvor den
35 IgE-medierte forstyrrelsen er allergisk rhinitt, astma, eller atopisk dermatitt.
11. Anvendelse ifølge krav 7 eller formuleringen for anvendelse ifølge krav 8, hvor den
IgE-medierte forstyrrelsen er valgt fra gruppen som består av hypersensitivitet, allergisk
bronkopulmonar aspergillose, parasittiske sykdommer, interstitiell cystitt, hyper-IgE-

syndrom, ataksia-telangiectasia, Wiskott-Aldrich-syndromet, thymisk alymfoplasi, IgE-myelom og graft-versus-host-reaksjon.

12. Anvendelse ifølge krav 7 eller formuleringen for anvendelse ifølge krav 8, hvor den
5 IgE-medierte forstyrrelsen er hypersensitivitet.

13. Anvendelsen eller formuleringen for anvendelse ifølge krav 12, hvor
hypersensitivitetsforstyrrelsen er valgt fra gruppen som består av anafylakse, urtikaria og
matallergi.

10

14. Anvendelsen eller formuleringen for anvendelse ifølge krav 13, hvor
hypersensitivitetsforstyrrelsen er matallergi.

15

15. Anvendelsen eller formuleringen for anvendelse ifølge krav 13, hvor matallergien er
en følge av eksponering overfor en belgfrukt.

16. Anvendelsen eller formuleringen for anvendelse ifølge krav 15, hvor belgfrukten er
en peanutt.

20

17. Anvendelse ifølge krav 7 eller formuleringen for anvendelse ifølge krav 8, hvor
formuleringen er i kombinasjon med et antihistamin, en bronkodilator, et glukokortikoid eller
en NSAID.

25

18. Anvendelse ifølge krav 7 eller formuleringen for anvendelse ifølge krav 8, hvor
medikamentet eller formuleringen er for administrering i kombinasjon med administreringen
av et antihistamin, en bronkodilator, et glukokortikoid eller en NSAID.

30

19. Anvendelse ifølge krav 7 eller formuleringen for anvendelse ifølge krav 8, hvor
medikamentet eller formuleringen er for administrering i kombinasjon med administreringen
av allergendesensitivisering.

35

20. Stabil, flytende formulering med lav turbiditet,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter (a) et anti-IgE-antistoff i en mengde av
tilnærmet 150 mg/ml, (b) arginin-HCl i en mengde av 200 mM, (c) histidin i en mengde av
20 mM, (d) polysorbat i en mengde av 0,01 til 0.1 %, hvor formuleringen videre har en pH
på 6,0; hvor anti-IgE-antistoffet er produsert med en metode som omfatter (1) dyrking av
celler transformert eller transfektet med en vektor som inneholder nucleinsyre som koder
for et antistoff som omfatter en lett kjede som omfatter en aminosyresekvens identifisert

som E25 i figur 10A og en tung kjede som omfatter en aminosyresekvens identifisert som E25 i figur 10B, og (2) rensing av Anti-IgE-antistoffet produsert av cellene.

21. Formulering ifølge krav 20, hvor cellene er:

- 5 i. eukaryote celler eller prokaryote celler;
- ii. eukaryote celler som er pattedyrceller eller gjærceller; eller
- iii. eukaryote celler som er kinesisk hamster ovarie (CHO)celler.

22. Formulering ifølge ett av kravene 20 eller 21, hvor formuleringen blir fremstilt ved
10 rekonstituering av lyofilisert antistoff.

23. Fremstilt artikkel,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en beholder som inneholder formuleringen
ifølge et hvilket som helst av krav 20-22.

15

24. Fremstilt artikkel ifølge krav 23, hvor beholderen er en sprøyte, hvor
sprøyten eventuelt videre inngår i en injeksjonsinnretning, og hvor injeksjonsinnretningen
eventuelt er en autoinjektor.

20 25. Formulering ifølge et hvilket som helst av kravene 20-24 for anvendelse ved
fremstilling av et medikament for behandling av en IgE-mediert forstyrrelse.

26. Formulering ifølge et hvilket som helst av kravene 20-24 for ved behandling av en
IgE-mediert forstyrrelse, hvor behandlingen omfatter administrering til en pasient med
25 behov for dette en terapeutisk effektiv mengde av formuleringen.

27 Formulering ifølge krav 25 eller formuleringen for anvendelse ifølge krav 26, hvor
den IgE-medierte forstyrrelsen er valgt fra gruppen som består av allergisk rhinitt, astma,
allergisk astma, ikke-allergisk astma, atopisk dermatitt og gastroenteropati.

30

28. Formulering ifølge krav 25 eller formuleringen for anvendelse ifølge krav 26, hvor
den IgE-medierte forstyrrelsen er valgt fra gruppen som består av hypersensitivitet,
allergisk bronkopulmonar aspergillose, parasittiske sykdommer, interstitiell cystitt, hyper-
IgE-syndrom, ataksia-telangiectasia, Wiskott-Aldrich-syndromet, thymisk alymfoplasi, IgE-
35 myelom og graft-versus-host-reaksjon.

29. Formulering eller formuleringen for anvendelse ifølge krav 28, hvor
hypersensitivitetsforstyrrelsen er valgt fra gruppen som består av anafylakse, urtikaria og
matallergi.

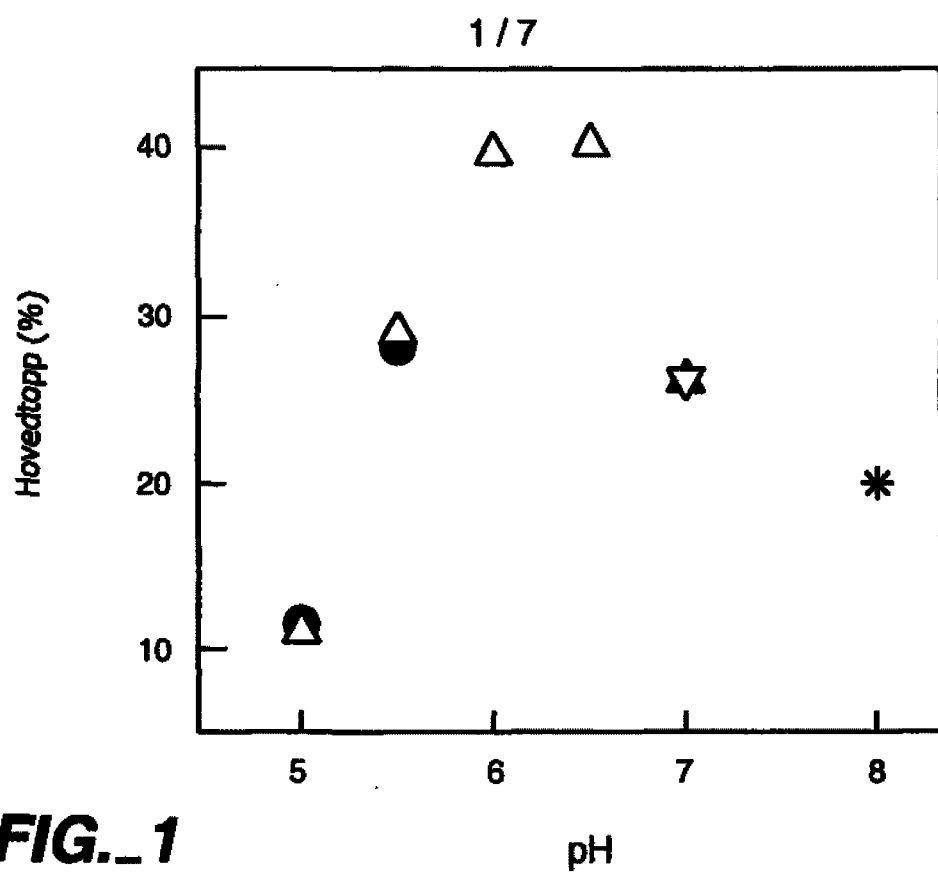
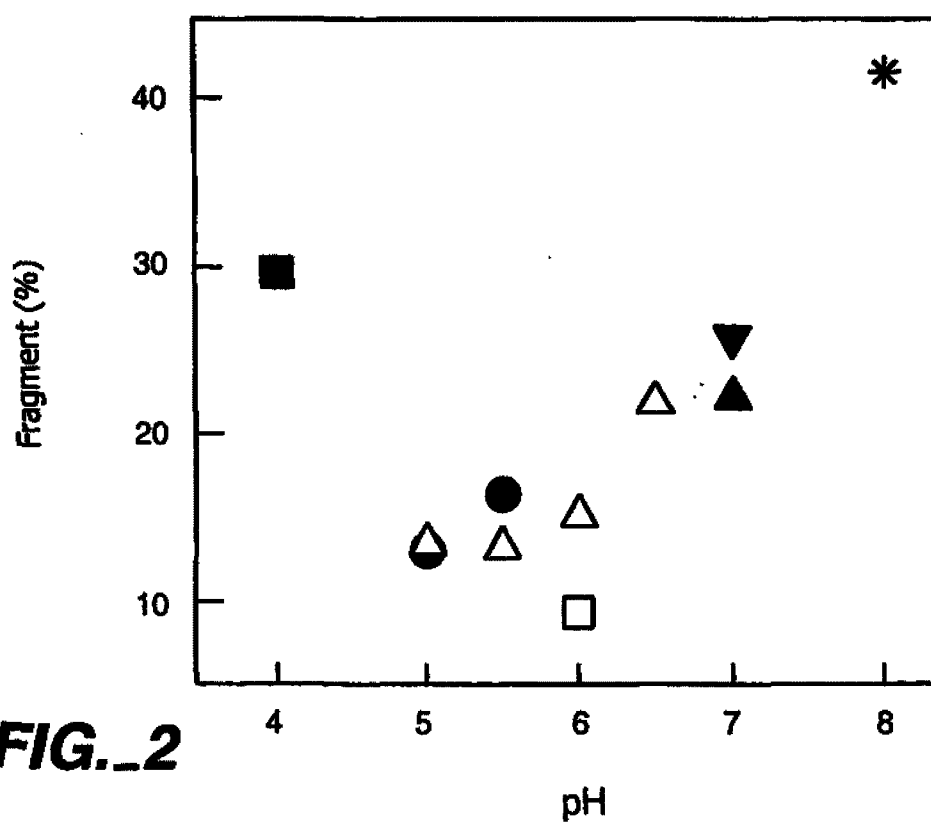
30. Formulering eller formuleringen for anvendelse ifølge krav 29, hvor matallergien er en følge av eksponering overfor en belgfrukt.

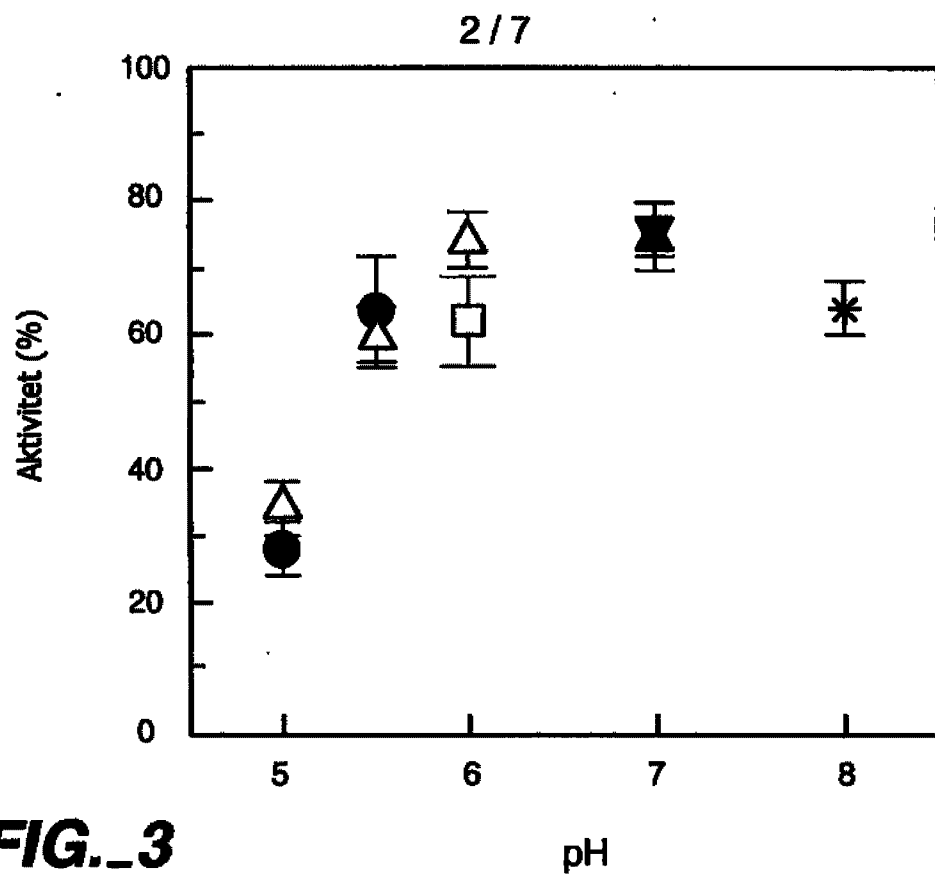
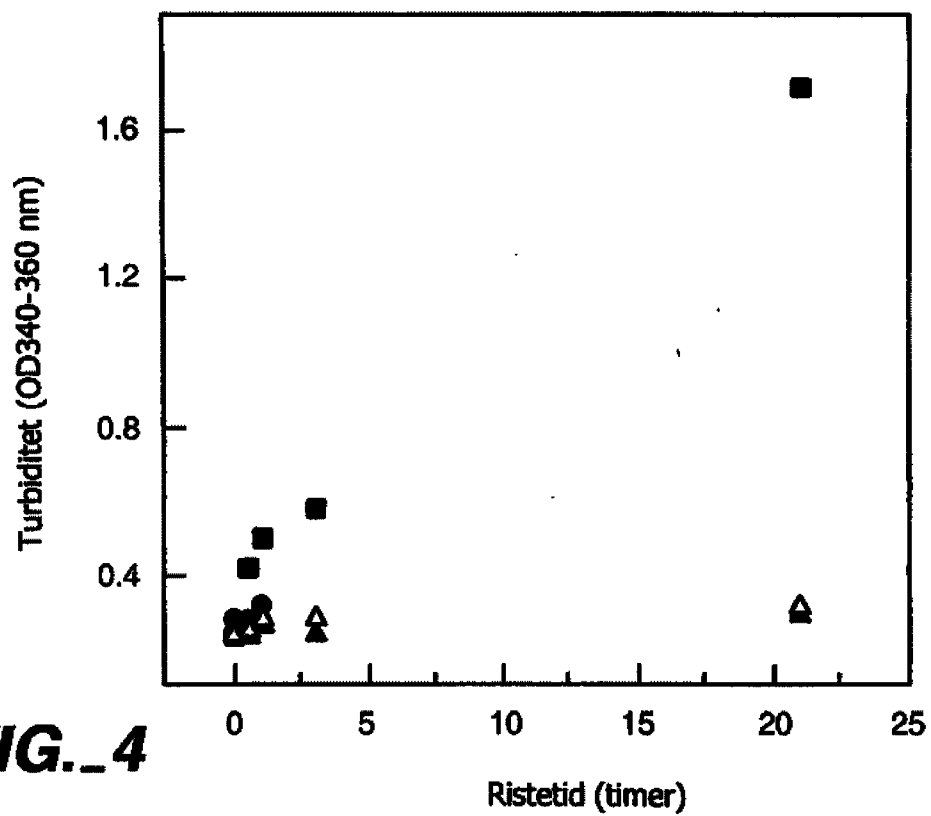
5 31. Formulering eller formuleringen for anvendelse ifølge krav 30, hvor belgfrukten er en peanutt.

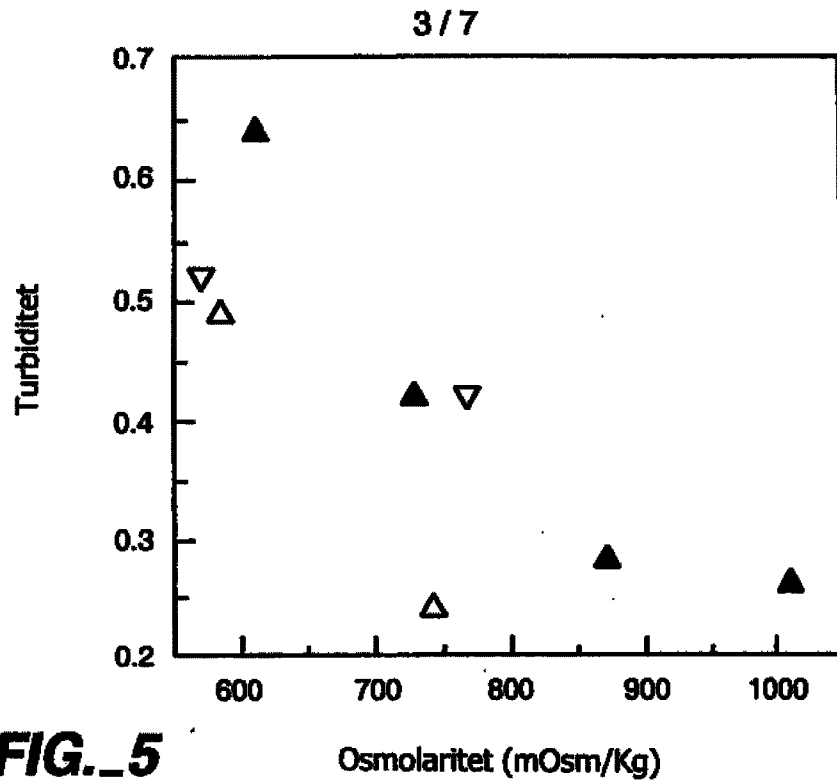
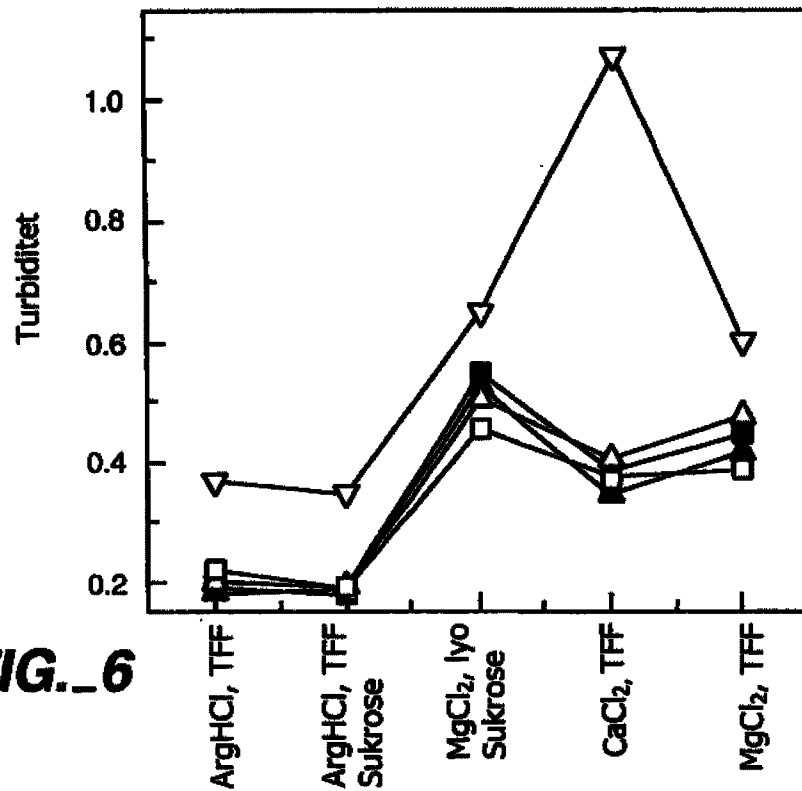
10 32. Formulering ifølge krav 25 eller formuleringen for anvendelse ifølge krav 26, hvor formuleringen er i kombinasjon med et antihistamin, en bronkodilator, et glukokortikoid eller en NSAID.

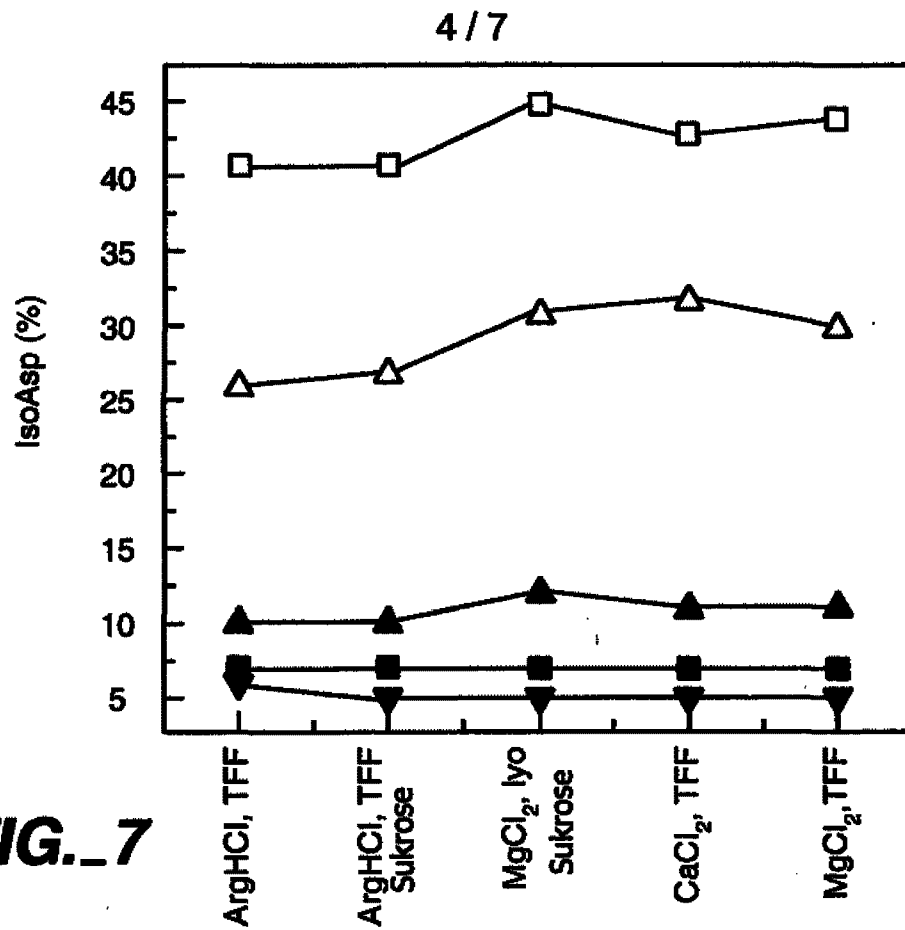
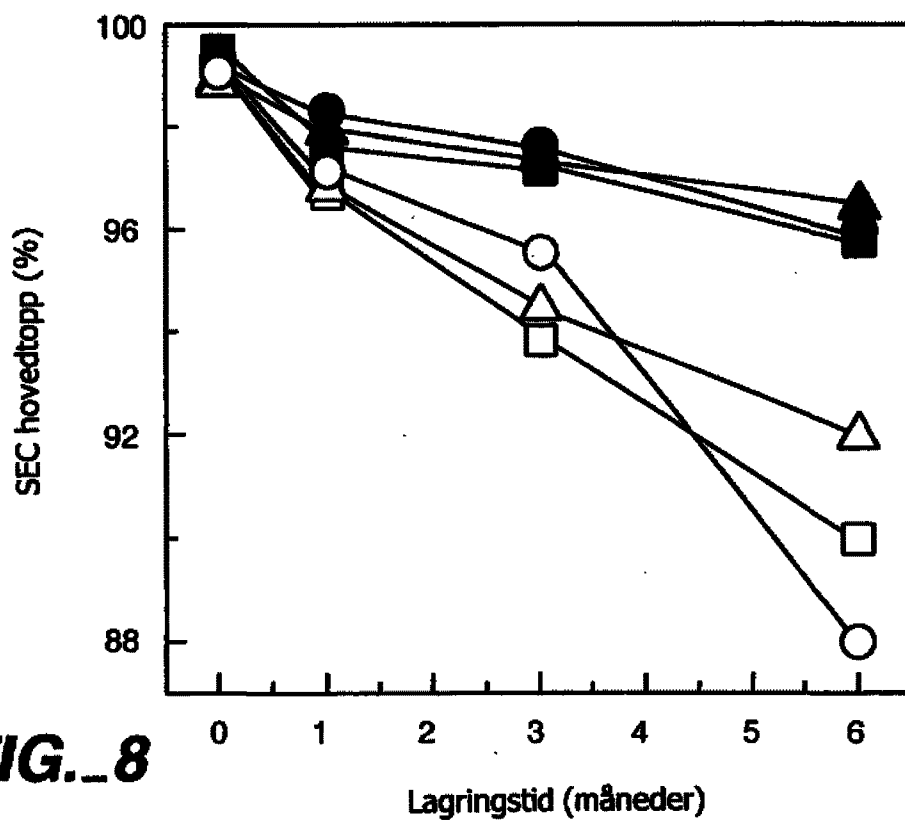
15 33. Formulering ifølge krav 25 eller formuleringen for anvendelse ifølge krav 26, hvor medikamentet eller formuleringen er for administrering i kombinasjon med administreringen av et antihistamin, en bronkodilator, et glukokortikoid eller en NSAID.

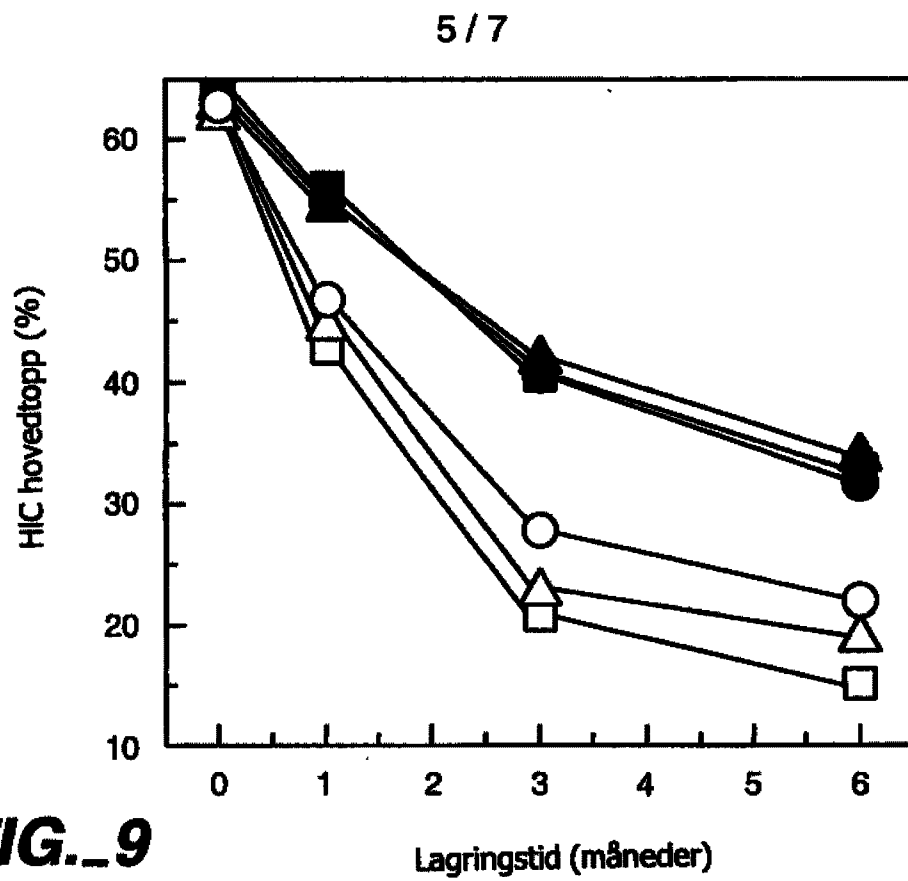
20 34. Formulering ifølge krav 25 eller formuleringen for anvendelse ifølge krav 26, hvor medikamentet eller formuleringen er for administrering i kombinasjon med administreringen av allergendesensitivisering.

**FIG._1****FIG._2**

**FIG._3****FIG._4**

**FIG._5****FIG._6**

**FIG._7****FIG._8**



Anti-IgE antistoffer: Lett kjede (V_L og C_L domener)

	10	20	30	40	50	60	70	80
E25	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITC[RASQSV	YDGSYNN]WY	QOKPGKAPKL	LIY[AASYLES]	GVPSRFSGSG	SGTDFTLTIS
E26	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITC[RASQSV	YDGSYNN]WY	QOKPGKAPKL	LIY[AASYLES]	GVPSRFSGSG	SGTDFTLTIS
Hu-901	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITC[RASQSV	YDGSYNN]WY	QOKPGKAPKL	LIY[AASYLES]	GVPSRFSGSG	SGTDFTLTIS
	90	100	110	C _L starts				
E25	SLQPEDFATY	YC[QOSHEDFY	T]FGQGTKVEI	KRT	VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD			
E26	SLQPEDFATY	YC[QOSHEDFY	T]FGQGTKVEI	KRT	VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD			
Hu-901	SLQPEDFATY	YC[QOSHEDFY	T]FGQGTKVEI	KRT	VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD			
E25	SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC							
E26	SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC							
Hu-901	SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC							

FIG.- 10A

Anti-IgE antistoffer: Tung kjede (V_H og C_H domener)

	10	20	30	40	50 a	60	70	80	90
E25	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVSGYSIT	SGISNNM	IRQ	APKGLEWVA	[SITYDGSINY NPSVKG]RITI	SRDDSKNTFY	LQMNSLRAED
E26	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVSGYSIT	SGISNNM	IRQ	APKGLEWVA	[SITYDGSINY NPSVKG]RITI	SRDDSKNTFY	LQMNSLRAED
Hu-901	QVQLVQSGAE	VKRPQASVKV	SCKASGYTF	S	MAWLEW	VRQ	APQGLEWVG	ELSPQTFITINY	NEKEDV
								RADE	TALENTVAV
									MELSLRSED
	100	110ab	120 C _H starts						
E25	TAVYYCAR	[GS EYFGHNEFAV]	WGQGTLVTVSS	ASTKGPSVFPL	APSSKSTSGGTAALGCLV	KDYFPEFVTVSWNSGALT	SGVHTFP	PAVLQSSGLYSLSS	
E26	TAVYYCAR	[GS EYFGHNEFAV]	WGQGTLVTVSS	ASTKGPSVFPL	APSSKSTSGGTAALGCLV	KDYFPEFVTVSWNSGALT	SGVHTFP	PAVLQSSGLYSLSS	
Hu-901	TAVYYCAR	[ES HESGSDYDFD]	WGQGTLVTVSS	ASTKGPSVFPL	APSSKSTSGGTAALGCLV	KDYFPEFVTVSWNSGALT	SGVHTFP	PAVLQSSGLYSLSS	
E25	VVTVPSSSLGTQ	TYICNVNHKPSNTK	VDKKVEPKSCDK	THCTCP	CPAP	PELLGGPSVFL	FPKPKDTLMI	SRTPEVTCV	VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
E26	VVTVPSSSLGTQ	TYICNVNHKPSNTK	VDKKVEPKSCDK	THCTCP	CPAP	PELLGGPSVFL	FPKPKDTLMI	SRTPEVTCV	VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
Hu-901	VVTVPSSSLGTQ	TYICNVNHKPSNTK	VDKKVEPKSCDK	THCTCP	CPAP	PELLGGPSVFL	FPKPKDTLMI	SRTPEVTCV	VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
E25	VHNAKTPREEQ	YNSTYRVVSVLT	VLHQDWLNGKEY	KCKVSNKALP	API	EKTISKAKGQPREPQ	VYTLPPSREEMTKNQ	VS	LTCLVKGFYPSDIAVEWE
E26	VHNAKTPREEQ	YNSTYRVVSVLT	VLHQDWLNGKEY	KCKVSNKALP	API	EKTISKAKGQPREPQ	VYTLPPSREEMTKNQ	VS	LTCLVKGFYPSDIAVEWE
Hu-901	VHNAKTPREEQ	YNSTYRVVSVLT	VLHQDWLNGKEY	KCKVSNKALP	API	EKTISKAKGQPREPQ	VYTLPPSREEMTKNQ	VS	LTCLVKGFYPSDIAVEWE
E25	SNQGPENNYKT	TPPVLDSDGSFFLY	SKLTVDKSRWQQGNV	SCSVMEALHNHYTQ	KSLSPGK				
E26	SNQGPENNYKT	TPPVLDSDGSFFLY	SKLTVDKSRWQQGNV	SCSVMEALHNHYTQ	KSLSPGK				
Hu-901	SNQGPENNYKT	TPPVLDSDGSFFLY	SKLTVDKSRWQQGNV	SCSVMEALHNHYTQ	KSLSPGK				

FIG.- 10B