



(12) PATENT

(19) NO

(11) 336112

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

*C07K 14/47 (2006.01)*  
*A61K 39/395 (2006.01)*  
*A61P 25/00 (2006.01)*  
*A61P 25/28 (2006.01)*  
*C12N 15/09 (2006.01)*  
*C07K 16/18 (2006.01)*  
*C07K 16/46 (2006.01)*  
*C12N 1/19 (2006.01)*  
*C12N 1/21 (2006.01)*  
*C12N 5/10 (2006.01)*  
*C12P 21/08 (2006.01)*

## Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20043891	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2003.02.20 PCT/EP2003/001759
(22)	Inng.dag	2004.09.16	(85)	Videreføringsdag	2004.09.16
(24)	Løpedag	2003.02.20	(30)	Prioritet	2002.02.20, EP, 02003844
(41)	Alm.tilgj	2004.09.16			
(45)	Meddelt	2015.05.18			
(73)	Innehaver	F Hoffmann-La Roche AG, Grenzacherstrasse 124, CH-4070 BASEL, Sveits MorphoSys AG, Lena-Christ-Strasse 48, DE-82152 MARTINSRIED, Tyskland			
(72)	Oppfinner	Manfred Brockhaus, Talweg 29, CH-4126 BETTINGEN, Sveits Corinna Löhning, Fleckhamerstrasse 12, DE-82131 STOCKDORF, Tyskland Michael Bardoff, Schietweg 2A, DE-81375 MÜNCHEN, Tyskland Bernd Bohrmann, Schlierbergstrasse 23, DE-79100 FREIBURG, Tyskland Walter Huber, Ziegelhofweg 62, CH-4303 KAISERAUGST, Sveits Titus Kretzschmar, Pemmlerstrasse 10, DE-86857 HURLACH, Tyskland Hansruedi Loetscher, Frankenstrasse 18, CH-4313 MÖHLIN, Sveits Christer Nordstedt, Forskargaten 20, SE-15185 SODERTALJE, Sverige Christine Rothe, Heinrich Nicolaus Strasse 26, DE-85221 DACHAU, Tyskland			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	<b>Anti-A<math>\beta</math>-antistoffer og fremgangsmåte for fremstilling, samt nukleinsyremolekyler som koder for slikeantistoffer, og vektorer og vertsceller omfattende nevnte nukleinsyremolekyler, i tillegg til farmasøytiske og diagnostiske preparater, så vel som spesifikke anvendelser av antistoffmolekylene, nukleinsyremolekylene, vektorene eller vertscellene</b>			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 0139796 A2 EP 0683234 A1 O'Nuallain B. et al. Conformational Abs recognizing a generic amyloid fibril epitope. PNAS. 2002, Vol.55, side 1485-1490. WO 9708320 A1 Knappik A. et al. Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) base don modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. J. Mol. Biol. 2000, Vol. 296, side 57-86.			
(57)	Sammendrag				

Det beskrives antistoffmolekyler som spesifikt er i stand til å gjenkjenne to områder av PA4-peptidet, der det første området omfatter aminosyresekvensen AEFRHDSGY som vist i SEKV. ID nr. 1 eller et fragment derav, og der det andre området omfatter aminosyresekvensen VHHQKLFFAEDVG som vist i SEKV. ID nr. 2 eller et fragment derav. Det beskrives videre nukleinsyremolekyler som koder oppfinnelsens antistoffmolekyler, og det beskrives vektorer og verter omfattende nevnte nukleinsyremolekyler som beskrevet. I tillegg beskriver foreliggende oppfinnelse preparater, fortrinnsvis farmasøytiske eller diagnostiske preparater, omfattende forbindelsene ifølge oppfinnelsen, så vel som spesifikke anvendelser for antistoffmolekylene, nukleinsyremolekylene, vektorene eller vertene.

Foreliggende oppfinnelse angår antistoffmolekyler i stand til spesifikt å gjenkjenne to områder av  $\beta$ -A4-peptidet, der det første området omfatter aminosyresekvensen AEFRHDSGY som vist i SEKV. ID nr. 1, eller et fragment derav, og der det andre området omfatter aminosyresekvensen VHHQKLVFFAEDVG som vist i SEKV. ID nr. 2, eller et fragment derav, hvori nevnte antistoff molekyl omfatter

- a) en variabel VL- region omfattende komplementære bestemmende regioner, L-CDR1, L-CDR2 og L-CDR3, hvor
  - i) L-CDR1 omfatter SEKV ID nr.143;
  - ii) L-CDR2 omfatter SEKV ID nr.144 og
  - 10 iii) L-CDR3 omfatter SEKV ID nr.95 og
- b) en variabel VH-region omfattende komplementære bestemmende regioner, H-CDR1, H-CDR2 og H-CDR3 der
  - i) H-CDR1 omfatter SEKV ID nr.146;
  - ii) H-CDR2 omfatter SEKV ID nr.192 og
  - 15 iii) H-CDR3 omfatter SEKV ID nr.93.

Videre beskrives nukleinsyremolekyler som koder oppfinnelsens antistoffmolekyler og vektorer og vertsceller omfattende nevnte nukleinsyremolekyler. I tillegg tilveiebringer oppfinnelsen preparater, fortrinnsvis farmasøytiske eller diagnostiske preparater, omfattende oppfinnelsens forbindelser, så vel som spesifikke anvendelser av antistoffmolekylene, nukleinsyremolekylene, vektorene eller vertscellene ifølge oppfinnelsen.

Flere dokumenter er angitt i beskrivelsen. Hver av disse (inkludert produsenters spesifikasjoner, instruksjoner osv.) anses som en del av beskrivelsen.

Rundt 70 % av alle tilfeller av dementia skyldes Alzheimers sykdom som assosieres med selektiv skade av hjerneområder og neurale kretser som er kritiske for kognisjon. Alzheimers sykdom karakteriseres ved neurofibrillære sammenfiltringer, og særlig i pyramidale neuroner i hippocampus og tallrike amyloide plakk inneholdende for det meste en tett kjerne av amyloide avsetninger og defuserte ringer.

De ekstracellulære neurittiske plakk inneholder store mengder av et predominant, fibrillært peptid betegnet "amyloid  $\beta$ ", "A- $\beta$ ", "A $\beta$ 4", " $\beta$ -A4" eller "A $\beta$ "; se Selkoe (1994), Ann. Rev. Cell Biol. 10, 373-403, Koo (1999), PNAS bind 96, s. 9989-9990, US 4 666 829 eller Glenner (1984), BBRC 12, 1131. Dette amyloid  $\beta$  er avledet fra "Alzheimers forløper protein/ $\beta$ -amyloid forløperprotein" (APP). APP'er er integrale

membranglykoproteiner (se Sisodia (1992), PNAS bind 89, s. 6075) og spaltes endoproteolytisk i A $\beta$ -sekvensen av en plasmamembranprotease,  $\alpha$ -sekretase (se Sisodia (1992), loc. cit). Videre fører ytterligere sekretaseaktivitet, særlig  $\beta$ -sekretase- og  $\gamma$ -sekretaseaktivitet til ekstracellulær frigivning av amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ), omfattende enten 39 aminosyrer (A $\beta$ 39), 40 aminosyrer (A $\beta$ 40), 42 aminosyrer (A $\beta$ 42) eller 43 aminosyrer (A $\beta$ 43); se Sinha (1999), PNAS 96, 11094-1053; Price (1998), Science 282, 1078 til 1083; WO 00/72880 eller Hardy (1997), TINS 20, 154. WO 0139796 A2 (CHALIFOUR R. ET AL.) beskriver fremstilling av vaksiner ved bruk av A $\beta$  peptid. EP 0683234 A1 (SUZUKI N. ET AL.) beskriver antistoffer som binder til det C-terminale området av A $\beta$  peptidet. O`Nuallain B. et al. "Conformational Abs recognizing a generic amyloid fibril epitope" PNAS 2002, Vol.55, side 1485-1490, beskriver antistoffer som spesifikt gjenkjenner en amyloid fibrillepitop. Ingen av publikasjonen beskriver antistoffmolekylene ifølge foreliggende oppfinnelse.

Det er verdt å merke seg at A $\beta$  har flere naturlig forekommende former, hvorved de humane former er referert til som de ovenfor nevnte A $\beta$ 39, A $\beta$ 40, A $\beta$ 41, A $\beta$ 42 og A $\beta$ 43. Den mest prominente form A $\beta$ 42, har aminosyresekvensen (med start fra N-terminus): DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEKV. ID nr. 27). I A $\beta$ 41, A $\beta$ 40, A $\beta$ 39 mangler de C-terminale aminosyrer A, IA og VIA. I A $\beta$ 43-form innbefattes det en ytterligere treoninrest ved C-terminus av den ovenfor angitte sekvens (SEKV. ID nr. 27).

Den tid som medgår til å nukleere A $\beta$ 40-fibriler ble påvist å være signifikant lenger enn den for å nukleere A $\beta$ 42-fibriler; se Koo, loc. cit. og Harper (1997), Ann. Rev. Biochem. 66, 385-407. Som angitt av Wagner (1999), J. Clin. Invest 104, 12391332, ble A $\beta$ 42 hyppigere funnet assosiert med neurittisk plakk og anses å være mer fibriløgent *in vitro*. Det ble også antydnet at A $\beta$ 42 tjener som "såkorn" i den nukleasjonsavhengige polymerisering av ikke-krystallinske A $\beta$ -peptider; Jarrett (1993), Cell 93, 1055-1958.

Det skal påpekes at modifisert APP-prosessering og/eller generering av ekstracellulært plakk inneholdende proteinholdige avsetninger, ikke bare er kjent fra Alzheimers patologi, men også fra individers lidelser av andre neurologiske og/eller neurodegenerative lidelser. Disse lidelser omfatter blant annet Down's syndrom, arvelig cerebral hemorragi med amyloidosis av hollandsk type, Parkinson's sykdom, ALS (amyotrofisk lateral sklerose), Creutzfeld Jacobs sykdom, HIV-relatert demens og motor neuropati.

For å forhindre, behandle og/eller lindre lidelser og/eller sykdommer relatert til den patologiske avsetning av amyloide plakk, må midler og fremgangsmåter som enten interfererer med  $\beta$ -amyloid plakkdannelse, som er i stand til å forhindre A $\beta$ -aggregering, og/eller er nyttige ved depolymerisering av allerede dannet amyloide avsetninger eller amyloide  $\beta$ -aggregater.

I henhold til, og i betraktning av de alvorlige defekter av modifiserte og/eller patologisk amyloid biologi, er midler og fremgangsmåter for behandling av amyloidrelaterte lidelser meget ønskelig. Særlig er det ønskelig med effektive medikamenter som enten interfererer med patologisk amyloid aggregering, eller som er i stand til depolymerisering av aggregert A $\beta$ . Videre er det ønskelig med diagnostiske midler for blant annet å påvise amyloide plakk.

Det tekniske problem som oppfinnelsen således tar sikte på å løse, er de behov som er beskrevet ovenfor.

I henhold til dette angår foreliggende oppfinnelse et antistoffmolekyl som spesifikt er i stand til å gjenkjenne to områder av  $\beta$ -A4/A $\beta$ 4-peptidet, der det første området omfatter aminosyresekvensen AEFRHDSGY (SEKV. ID nr. 1), eller et fragment derav, og det andre området omfatter aminosyresekvensen VHHQKLVFFAEDVG (SEKV. ID nr. 2) eller et fragment derav hvori nevnte antistoff molekyl omfatter

- a) en variabel VL- region omfattende komplementære bestemmende regioner, L-CDR1, L-CDR2 og L-CDR3, hvor
  - iv) L-CDR1 omfatter SEKV ID nr.143;
  - ii) L-CDR2 omfatter SEKV ID nr.144 og
  - iii) L-CDR3 omfatter SEKV ID nr.95 og
- b) en variabel VH-region omfattende komplementære bestemmende regioner, H-CDR1, H-CDR2 og H-CDR3 der
  - i) H-CDR1 omfatter SEKV ID nr.146;
  - ii) H-CDR2 omfatter SEKV ID nr.192 og
  - iii) H-CDR3 omfatter SEKV ID nr.93.

Innenfor oppfinnelsens kontekst relaterer uttrykket "antistoffmolekyl" til fullimmunoglobulinmolekyler, fortrinnsvis IgM'er, IgD'er, IgE'er, IgA'er eller IgG'er, mer foretrukket IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 eller IgG4 så vel som deler av slike immunglobulinmolekyler som Fab-fragmenter eller V<sub>L</sub>-, V<sub>H</sub>- eller CDR-områder. Videre angår uttrykket modifiserte og/eller endrete antistoffmolekyler som kimære og

humaniserte antistoffer. Uttrykket relaterer også til modifiserte eller endrete monoklonale eller polyklonale antistoffer så vel som rekombinant eller syntetisk genererte eller syntetiserte antistoffer. Uttrykket relaterer også til intakte antistoffer så vel som til antistoffragmenter/deler derav, som separerte lette og tunge kjeder, Fab, Fab/c, F<sub>v</sub>, Fab', F(ab')<sub>2</sub>. Uttrykket "antistoffmolekyl" omfatter også antistoffderivater, de bifunksjonelle antistoffer og antistoffkonstrukter som enkelkjede F<sub>v</sub>s (scF<sub>v</sub>), bispesifikke scF<sub>v</sub>s eller antistoffusjonsproteiner. Ytterligere detaljer når det gjelder uttrykket "antistoffmolekyl" ifølge oppfinnelsen, er gitt nedenfor.

10 Uttrykket "spesifikk gjenkjenning" betyr innenfor oppfinnelsens kontekst at antistoffmolekylet er i stand til spesifikt å interagere med og/eller binde til minst to aminosyrer i hvert av de to områder av  $\beta$ -A4 som definert her. Uttrykket relaterer til spesifisiteten hos antistoffmolekylet, dvs. til dets evne til å diskriminere mellom de spesifikke områder av  $\beta$ -A4-peptidet, som definert her, og et annet ikke-relatert område av  $\beta$ -A4-peptidet eller et annet ikke APP-relatert protein/peptid/(ikke-relatert) testpeptid. I henhold til dette kan spesifisiteten bestemmes eksperimentelt med fremgangsmåter kjent innen teknikken og fremgangsmåter som beskrevet her. Slike fremgangsmåter omfatter, men er ikke begrenset til western blot, ELISA-, RIA-, ECL-, IRMA-tester og peptidskann. Slike fremgangsmåter omfatter også bestemmelsen av  $K_D$ -verdier som blant annet illustrert i de vedlagte eksempler. Peptidskann (pepspot analyse) benyttes rutinemessig for å kartlegge lineære epitoper i et polypeptidantigen. Den primære sekvens av polypeptidet syntetiseres suksessivt på aktivert cellulose med peptider som overlapper hverandre. Gjenkjennelsen av visse peptider når det gjelder antistoffer som skal testes med henblikk på sin evne til å påvise eller gjenkjenne en spesifikk antigen/epitop, bedømmes ved rutinefargeutvikling (sekundært antistoff med pepperotperoksidase og 4-klornaftol og hydrogenperoksid) ved en kjemoluminsensreaksjon eller tilsvarende midler, som er velkjent i teknikken. Når det blant annet gjelder kjemoluminsensreaksjon, kan reaksjonen kvantiteres. Hvis antistoffet reagerer med et visst sett av overlappende peptid, kan man dedusere den minimale sekvens av aminosyrer som er nødvendige for reaksjon; se illustrerende eksempel 6 og vedlagte tabell 2.

15  
20  
25  
30

Den samme analyse kan avdekke to spredtliggende klustere av reaktive peptider som indikerer gjenkjennelsen av en diskontinuerlig, dvs. konformasjonell epitop i det antigene polypeptid (Geysen (1986), Mol. Immunol. 23, 709-715).

35

I tillegg til pepspotanalysen, kan standard ELISA-analyse gjennomføres. Som demonstrert i de vedlagte eksempler kan små heksapeptider kobles til et protein og belegges til en immunoplate og omsettes med antistoffer som skal testes. Bedømmelsen kan gjennomføres ved standard fargeutvikling (for eksempel sekundært antistoff med pepperotperoksidase og tetrametylbenzidin med hydrogenperoksid). Reaksjonen i visse brønner bedømmes ved optisk densitet, for eksempel ved 450 nm. Typisk bakgrunn (= negativ reaksjon) kan være 0,1 OD, typisk positiv reaksjon kan være 1 OD. Dette betyr at differansen (forholdet) positiv:negativ kan være mer enn faktor 10. Ytterligere detaljer er gitt i de vedlagte eksempler. I tillegg er kvantitative fremgangsmåter for bestemmelse av spesifisiteten og evnen til "spesifikk gjenkjenning" av de her definerte to områder av  $\beta$ -A4-peptidet gitt nedenfor.

Uttrykket "to områder av  $\beta$ -A4-peptidet" relaterer til to områder som definert ved deres aminosyresekvenser vist i SEKV. ID nr. 1, og 2 i forhold til de N-terminale aminosyrene 2 til 10, og til de sentrale aminosyrer 12 til 25 av  $\beta$ -A4-peptid. Uttrykket " $\beta$ -A4-peptid" innenfor oppfinnelsens kontekst angir de her ovenfor beskrevne A $\beta$ 39, A $\beta$ 41, A $\beta$ 43, fortrinnsvis A $\beta$ 40 og A $\beta$ 42. A $\beta$ 42 er også angitt i den vedlagte SEKV. ID nr. 27. Det skal bemerkes at uttrykket "to områder av  $\beta$ -A4-peptidet" også relaterer til en "epitop" og/eller en "antigen determinant" som omfatter de her definerte to områder av  $\beta$ -A4-peptid eller deler derav. I henhold oppfinnelsen er de to områder av  $\beta$ -A4-peptidet atskilt (på nivå av aminosyresekvensen) i primærstrukturen av  $\beta$ -A4-peptidet med minst én aminosyre, fortrinnsvis minst to, helst minst tre, aller helst minst fire, spesielt minst fem, helt spesielt minst seks, ganske spesielt minst ni og mest foretrukket minst tolv aminosyrer. Som vist her og som dokumentert i de vedlagte eksempler, gjelder at oppfinnelsens antistoffer/antistoffmolekyler påviser/interagerer med og/eller binder til to områder av  $\beta$ -A4-peptidet, som definert her, hvorved de to områder er atskilt (på primærstrukturnivå av aminosyresekvensen) av minst én aminosyre og der sekvensen som skiller de to områder/"epitop" kan omfatte mer enn ti aminosyrer, fortrinnsvis 14, og aller helst 15 eller 16 aminosyrer. For eksempel gjelder at MSR-3 Fab gjenkjenner/ detekterer/interagerer med to områder av  $\beta$ -A4-peptidet hvori nevnte første område omfatter aminosyrene 3 og 4 (EF) og nevnte andre område omfatter aminosyrene 18 til 23 (VFFAED). I henhold til dette kan den separerende sekvens mellom regionen/epitopene som skal påvises/gjenkjennes ha en lengde på 13 aminosyrer på primæraminosyresekvensstrukturen. Tilsvarende gjelder at MSR #3.4H7 IgG1, et optimalisert og modent antistoffmolekyl som er avledet fra MSR-3, og inneholdt i et IgG1-rammeverk, påviser/interagerer med/binder til to epitoper/områder av  $\beta$ -A4 som omfatter det første område posisjoner 1 til 4 (DAEF) og i det andre

område posisjoner 19 til 24 (FFAEDV) av  $\beta$ -A4, som definert her. I henhold til dette gjelder at MSR #3.4H7 IgG1 gjenkjenner/påviser /interagerer med/binder til to epitoper/områder som på primæraminosyresekvensnivå er atskilt av 14 aminosyrer. Som beskrevet i detalj i de vedlagte eksempler, kan affinitetsmodning og konvertering av monovalente oppfinneriske Fab-fragmenter til fullengde IgG1-antistoffer resultere i en viss utvidelse av epitopene/områdene som er påvist med pepspot, ELISA-analyser og liknende. Derfor er antistoffmolekylene ifølge oppfinnelsen i stand til samtidig, og uavhengig å gjenkjenne to områder av  $\beta$ -A4-peptidet/A $\beta$ 4 der områdene omfatter aminosyresekvensene som vist i SEKV. ID nr. 1 (eller deler derav) og aminosyresekvensen som vist i SEKV. ID nr. 2 (eller en eller flere deler derav). Pga. den potensielle utvidelse av epitopene som detaljert her, er det imidlertid også tatt sikte på at aminosyrene i tett nærhet til sekvensene av SEKV. ID nr. 1 og 2, blir påvist/gjenkjent, dvs. at ytterligere aminosyrer er del av de to områder som skal påvises/gjenkjennes. I henhold til dette er det også tatt sikte på at for eksempel den første aminosyre av A $\beta$  (1-42) som definert her, nemlig D (asparbinsyre) i del av en epitop påvises/gjenkjennes, eller at aminosyrene lokalisert etter området av A $\beta$  (1-42) som definert i SEKV. ID nr. 2, påvises/gjenkjennes. Nevnte ytterligere aminosyre kan for eksempel være aminosyren i posisjon 26 av SEKV. ID nr. 27 ( $\beta$ -A4/A $\beta$  (1-42)), nemlig S (serin).

20

Uttrykket kan også angå en konformasjonell epitop, en strukturell epitop eller en diskontinuerlig epitop, bestående av nevnte to områder eller deler derav, se også Geysen (1986), loc. cit. Innenfor oppfinnelsens kontekst er en konformasjonell epitop definert ved to eller flere diskrete aminosyresekvenser som er atskilt i den primære sekvens som kommer sammen på overflaten når polypeptidet foldes til det native protein (Sela, (1969) Science 166, 1365 og Laver, (1990) Cell 61, 553-6). Antistoffmolekylene ifølge oppfinnelsen er ment spesifikt å binde til/interagere med en eller flere konformasjonelle/strukturelle epitoper bestående av og/eller omfattende de to områder av  $\beta$ -A4 som beskrevet her, eller deler derav, som beskrevet nedenfor.

”Antistoffmolekylene” ifølge oppfinnelsen er antatt å omfatte en samtidig og uavhengig dual spesifisitet til (a) et aminosyrestrekk omfattende aminosyrene 2 til 10 (eller en eller flere deler derav) av  $\beta$ -A4 og (b) et aminosyreområde omfattende aminosyrene 12 til 25 (eller én eller flere deler derav) av  $\beta$ -A4 (SEKV. ID nr. 27). Fragmenter eller deler av disse strekk omfatter minst to, fortrinnsvis minst tre aminosyrer. Foretrukne fragmenter eller deler er i det første område/strekk av SEKV. ID nr. 27, aminosyresekvensene AEFRHD, EF, EFR, FR, EFRHDSG, EFRHD eller HDSG og i det andre området/strekk av SEKV. ID nr. 27 aminosyresekvensene HHQKL, LV, LVFFAE,

35

VFFAED, VFFA eller FFAEDV. Som nevnt ovenfor kan fragmentene også omfatte ytterligere aminosyrer eller være deler av fragmentene som definert her. Spesifikke eksempler er DAE, DAEF, FRH eller RHDSG.

5 Et antall antistoffer som spesifikt gjenkjenner A $\beta$ -peptider er beskrevet i teknikken. Disse antistoffer er hovedsakelig oppnådd ved immunisering av dyr med A $\beta$ 1-40 eller A $\beta$ 1-42 eller fragmenter derav ved bruk av standard teknologier. I henhold til publiserte data, gjenkjenner monoklonale antistoffer som ble generert ved immunisering med det komplette A $\beta$ -polypeptid (1-40 eller 1-42) eksklusivt en epitop nær N-terminusen av  
 10 A $\beta$ . Videre er eksempler antistoffene BAP-1 og BAP-2 (Brockhaus, ikke publisert) som ble generert ved immunisering av mus med A $\beta$ 1-40 og som gjenkjenner aminosyrene 4-6 innenfor konteksten av større A $\beta$ -peptider; se det vedlagte eksempel 7, tabell 2 samt eksempel 12, tabell 7. Antistoffer som gjenkjenner den midtre del av A $\beta$  stammer fra immunisering med mindre peptider. For eksempel ble antistoffet 4G8 generert ved  
 15 immunisering med A $\beta$ -peptidet 1-24 og gjenkjenner eksklusivt sekvensen 17-24 (Kim, (1988) Neuroscience Research Communication 2, 121-130). Mange andre monoklonale antistoffer er generert ved immunisering av mus med A $\beta$ -avledete fragmenter, og antistoffer som gjenkjenner den C-terminale ende av A $\beta$ 1-40 og A $\beta$ 1-42 brukes utstrakt for å atskille og kvantitere de tilsvarende A $\beta$ -peptider i biologiske fluider og vev ved  
 20 ELISA, western blot og immunohistokjemisk analyse (Ida et al., (1996) J. Biol. Chem. 271, 22908-22914; Johnson-Wood et al., (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994), 1550-1555; Suzuki et al., (1994), Science 264, 1336-1340; Brockhaus (1998), Neuro Rep. 9, 1481-1486). BAP-17 er et muse monoklonalt antistoff som genereres ved immunisering av mus med A $\beta$ -fragment 35-40. Det gjenkjenner spesifikt den C-  
 25 terminale enden av A $\beta$ 1-40 (Brockhaus (1998) Neuroreport 9, 1481-1486).

Det er antatt at immuniseringen med T-celleavhengige antigener (ofte dårlige immunogener) krever en proteolytisk spalting av antigenet til endosomer av antigenpresenterende celler. *In vivo*-seleksjonen av høyaffinitetsantistoffer etter  
 30 immunisering, drives av kontakten av hjelper-T-celler til antigenpresenterende celler. De antigenpresenterende celler presenterer kun korte peptider og ikke polypeptider med større størrelser. I henhold til dette har disse celler et komplisert (men velkjent) maskineri til endocytoseantigener, nedbryting av antigenene til endosomer, kombinerings av valgte peptider med egnede MHC klasse-II-molekyler, og å eksportere  
 35 peptid-MHC-komplekset til celleoverflaten. Dette er der den antigenspesifikke gjenkjennelsen av T-celler inntreffer, med det formål å tilveiebringe hjelp for å modne B-celler. B-cellene som mottar mest T-cellehjelp har den beste sjansen til å utvikle seg til

antistoffutskillende celler, og å proliferere. Dette viser at antigenprosessering ved proteolyse er et viktig trinn for generering av høyaffinitetsantistoffrespons *in vivo* og kan forklare dominansen av den N-terminale A $\beta$ -epitop i tidligere monoklonale og polyklonale antistoffer, oppnådd ved immunisering.

5

I motsetning til dette drives seleksjonen av antistoffer/antistoffmolekyler ifølge oppfinnelsen av den fysiske adherens av Fab-uttrykkende phager til antigenet. Det er ingen nedbryting av antigenet som er involvert i denne *in vitro*-seleksjonsprosessen. Phagene som uttrykker Fab med den høyeste affinitet mot antigenet, velges og  
 10 propageres. Et syntetisk bibliotek benyttes i de vedlagte eksempler for å velge spesifikke antistoffmolekyler ifølge oppfinnelsen, som er spesielt egnet for å unngå enhver mulighet for enkle, kontinuerlige epitoper som ofte finnes i biblioteker som stammer fra immuniserte B-celler.

15 Det skal bemerkes at den kjente teknikk ikke har beskrevet antistoffmolekyler som gjenkjenner to uavhengige områder av A $\beta$ 4 som spesifikt gjenkjenner (a) diskontinuerlige/strukturelle/konformasjonelle epitoper og/eller som er i stand til samtidig å uavhengig gjenkjenne to områder/epitoper av A $\beta$ 4.

20 Vaksinasjon av transgene mus som overuttrykker mutant, human APP<sub>V717F</sub> (PDAPP-mus) med A $\beta$ 1-42, resulterte i en så å si fullstendig prevensjon av amyloid avsetning i hjernen når behandling ble startet i unge dyr, dvs. før start av neuropatologiene, mens en reduksjon av allerede dannede plakk ble observert i eldre dyr, noe som antydte en antistoffmediert klaring av plakk (Schenk et al., (1999), Nature 400, 173-177).

25 Antistoffene som ble generert ved denne immuniseringsprosedyre var reaktive mot N-terminus av A $\beta$ 4 som dekker en epitop rundt aminosyrene 3-7 (Schenk et al., (1999), loc. cit.; WO 00/72880). Aktiv immunisering med A $\beta$ 1-42 reduserte også oppførselsforringelse og hukommelsestapet i forskjellige transgene modeller for Alzheimers sykdom (Janus et al., (2000) Nature 408, 979-982; Morgan et al., (2000)  
 30 Nature 408, 982-985). Etterfølgende studier med perifert administrerte antistoffer, dvs. passiv immunisering, har bekreftet at antistoffer kan tre inn i sentralnervesystemet, dekorere plakk og indusere klaring av pre-eksisterende amyloid plakk i APP-transgene mus (PDAPP-mus) (Bard et al., (2000) Nat. Med. 6, 916-919; WO 00/72880). I disse studier var de monoklonale antistoffer med den mest potente *in vivo*- og *ex vivo*-  
 35 effektivitet (utløsning av phagocytose i eksogene, mikrogliale celler) de som gjenkjente A $\beta$ 4 N-terminale epitoper 1-5 (mab 3D6, IgG2b) eller 3-6 (mab 10D5, IgG1). Likeledes viste polyklonale antistoffer som var isolert fra mus, kanin eller aper etter immunisering

med A $\beta$ 1-42 en tilsvarende N-terminal epitop-spesifisitet og var også effektive med henblikk på utløsning av phagocytose og *in vivo* plakk-klaring. I motsetning induserte C-terminalspesifikke antistoffer som binder til A $\beta$ 1-40 eller A $\beta$ 1-42 med høy affinitet, ikke phagocytose i *ex vivo*-analysen og var ikke effektiv *in vivo* ((WO 00/72880).

- 5 Monoklonalt antistoff m266 (WO 00/72880) ble dyrket mot A $\beta$ 13-28 (sentraldoméne av A $\beta$ ) og epitop-kartlegging bekreftet antistoffspesifisiteten til å dekke aminosyrene 16-24 i A $\beta$ -sekvensen. Dette antistoff binder ikke godt til aggregert A $\beta$  og amyloide avsetninger og reagerer kun med oppløselig (monomerisk) A $\beta$ , dvs. proteiner som er tilsvarende andre velkjente og kommersielt tilgjengelige monoklonale antistoffer (4G8;
- 10 Kim, (1988) Neuroscience Research Communications 2, 121-130; kommersielt tilgjengelig fra Signet Laboratories Inc., Dedham, MA, USA) som gjenkjenner den samme epitop.

- In vivo* ble m266-antistoffet nylig funnet markert å redusere A $\beta$ -avsetning i PDAPP-
- 15 mus etter perifer administrering (DeMattos, (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 8850-8855). Imidlertid og i motsetning til N-terminale spesifikke antistoffer, dekorerte ikke m266 amyloidplakk *in vivo*, og det ble derfor hyotesisert at hjerne A $\beta$ -byrden ble redusert ved et antistoffindusert skift i likevekten mellom CNS og plasma A $\beta$ , som resulterte i akkumulering av hjerneavledet A $\beta$  I periferien, fast kompleksert til m266
- 20 (DeMattos, (2001) loc. cit.).

- Antistoffene/antistoffmolekylene ifølge oppfinnelsen kombinerer, ved samtidig (for eksempel i en strukturell/konformasjonell epitop dannet av N-terminalen og sentralområdet av  $\beta$ A4, som beskrevet her) og uavhengig (for eksempel i pepspot-
- 25 analyser som dokumentert i den vedlagte eksperimentelle del) som binder til N-terminalen og sentralepitopene, kombinerer egenskapene for et N-terminalt spesifikt antistoff, og et sentralepitopsesifikt antistoff i et enkelt molekyl. Antistoffer med dualepitopsesifisitet som beskrevet ifølge oppfinnelsen, anses å være mer effektivt *in vivo*, særlig i medisinske og diagnostiske situasjoner, for eksempel å redusere amyloid plakkbyrde eller amyloidogenese eller for påvisning av amyloide avsetninger og plakk.
- 30 Det er velkjent at det i prosessen med A $\beta$ 4-aggregering og amyloid avsetting, inntre konformasjonelle forandringer og mens sentralepitopen lett er tilgjengelig i oppløselig i A $\beta$ 4, synes den å være gjemt og mindre reaktiv i aggregert eller fibrillært A $\beta$ 4. Det faktum at det sentrale/middel epitopsesifikke antistoff m266 er effektivt *in vivo*,
- 35 antyder at nøytralisering av oppløselig A $\beta$ 4 også kan være en kritisk parameter. Antistoffene/antistoffmolekylene ifølge oppfinnelsen kan på grunn av dualepitopsesifisiteten binde både til fibrillær og oppløselig A $\beta$ 4 med lik effektivitet,

og tillater derved interaksjon med amyloid plakk så vel som nøytralisering av A $\beta$ 4. Uttrykket ”samtidig og uavhengig binding til N-terminal- og sentral-middelepitopen av  $\beta$ -A4” som benyttet her i konteksten med oppfinnelsens antistoffmolekyler relaterer til det faktum at antistoffene/antistoffmolekylene som her beskrives, kan påvise og/eller

5 binde til begge epitoper samtidig, dvs. på samme tid (for eksempel på konformasjonelle/strukturelle epitoper dannet av N-terminalepitopen (eller en eller flere deler derav) og sentralepitopene (eller en eller flere deler derav) av  $\beta$ A4, som definert her), og at de samme antistoffmolekyler imidlertid også er i stand til å påvise/binde til hver av de definerte epitoper på en uavhengig måte som blant annet påvist ved

10 pepspotanalysen som vist i eksemplene.

Klaring av amyloid plakk *in vivo* i PDAPP-mus etter direkte applikasjon av antistoffene til hjernen, er ikke avhengig av IgG-undergruppe og kan også involvere en mekanisme som ikke er Fc-mediert, dvs. ingen involvering av aktivert mikroglial i plakk-klaringen

15 (Bacsikai, (2001), Abstract Society for Neuroscience 31. Annual Meeting, 10-15 november, 2001, San Diego). Denne observasjon står i motsetning til det som er postulert i en tidligere studie av Bard (2000), *loc. cit.*

I en annen studie ble antistoffer dyrket mot A $\beta$ 1-28- og A $\beta$ 1-16-peptider funnet å være

20 effektive ved disaggregering av A $\beta$ -fibriller *in vitro*, mens et antistoff spesifikt for A $\beta$ 13-28 var meget mindre aktivt i denne analyse (Solomon, (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 4109-4112). Prevensjon av A $\beta$ -aggregering ved et anti-A $\beta$ 1-28-antistoff (AMY-33) er også rapportert (Solomon, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 452-455). I den samme studie interfererte antistoff 6F/3D, som var dyrket mot A $\beta$ -fragment

25 8-17, noe med Zn<sup>2+</sup>-indusert A $\beta$ -aggregering, men hadde ingen virkning på selve aggregeringen som var indusert av andre aggregeringsinduserende midler.

Effektiviteten for de forskjellige antistoffer i disse *in vitro*-analyser, korrelerer med tilgjengeligheten av deres epitoper i A $\beta$ 4-aggregater. N-terminus er eksponert og N-

30 terminalspesifikke antistoffer induserer klart de-polymerisering, mens sentralområdet og C-terminus er skjult og ikke lett tilgjengelig, og således er antistoffer mot disse epitoper meget mindre effektive.

Undersøkelser med henblikk på epitoptilgjengelighet for antistoffet, har vist at i

35 aggregert A $\beta$  er den N-terminale epitop eksponert, og reagerer med BAP-1-antistoffet, mens den midtre eller sentrale epitop forblir kryptisk, dvs. at ingen binding av 4G8-

antistoffet ble observert. I monomerisk A $\beta$  er imidlertid begge epitoper åpne og gjenkjennes på samme måte av begge tidligere, kjente antistoffer.

I motsetning ble det ifølge foreliggende oppfinnelse overraskende funnet at de heri  
 5 beskrevne antistoffmolekyler gjenkjente to diskontinuerlige aminosyresekvenser, for eksempel en konformasjonell/strukturell epitop på A $\beta$ -peptidet. To ”diskontinuerlige aminosyresekvenser” betyr innen oppfinnelsens kontekst at de nevnte to aminosyresekvenser som danner N-terminal-, henholdsvis sentral/middel-epitoper, er separert på  $\beta$ -A4 i sin primærstruktur ved minst to aminosyrer som ikke er del av noen  
 10 av epitopene.

Bindingsområdet for et antistoff Fab (= paratope) opptar en molekyløverflate på rundt 30 x 30 Å i størrelse (Laver, Cell 61 (1990), 553-556). Dette er tilstrekkelig til å komme i kontakt med 15 til 22 aminosyresidier som kan være til stede på flere  
 15 overflateløkker. Den diskontinuerlige epitop som gjenkjennes av oppfinnelsens antistoffmolekyler inntar en konformasjon der N-terminal- (restene 2 til 10 eller deler derav) og middel A $\beta$ -peptidsekvensen (restene 12 til 25 eller deler derav) er i tett nærhet. Bare innen denne konformasjon oppnås det maksimale antall antigen-antistoff kontakter og den laveste frie energitilstand.

20 Basert på energetiske beregninger er det antydnet at et mindre undersett på 5-6 rester, som ikke er arrangert i noen lineær sekvens, men er spredd over epitopoveflaten, bidrar med mest av bindingsenergien, mens omgivende rester kun utgjør et komplementært mønster (Laver (1990) loc. cit.).

25 Oppfinnelsens antistoffer/antistoffmolekyler er i stand til å binde til aggregert A $\beta$  og reagerer sterkt med amyloid plakk i hjernen hos AD-pasienter (som dokumentert i de vedlagte eksempler). I tillegg er de i stand til å depolymerisere/desintegrere amyloide aggregater.

30 Uten ønske om å være bundet av noen teori, antas det at den konformasjonelle/strukturelle epitop (bestående av de to områdene av A $\beta$ 4 eller en eller flere deler av områder som beskrevet her) partielt å være eksponert i aggregert A $\beta$ . Det er imidlertid kjent at hoveddelen av middel/andre epitop/område alene ikke fritt er  
 35 tilgjengelig i disse A $\beta$ -aggregater (basert på de dårlige reaktiviteter av middelepitopspesifikke antistoffene 4G8 og m266). På den andre side og i lys av betraktningene ovenfor, er det sannsynlig at én eller flere rester av midtområdet er

komponenter av den konformasjonelle epitop, og i konjunksjon med restene fra det N-terminale område er tilgjengelig for antistoffene ifølge oppfinnelsen, og bidrar derved betydelig til bindingsenergien for antistoff-A $\beta$ 4-interaksjonen. Reaktiviteten for oppfinnelsens antistoffmolekyler med den konformasjonelle epitop i aggregert A $\beta$ , er derfor unik og klart forskjellig fra  $\alpha$ -A $\beta$ 4 -antistoffene som er beskrevet i den kjente teknikk. Likeledes, og som påpekt ovenfor, er et ytterligere unikt trekk med oppfinnelsens antistoffer/antistoffmolekyler deres evne til samtidig og uavhengig å binde til/gjenkjenne to separate epitoper på  $\beta$ -A4, som definert heri og i de vedlagte eksempler.

10

I en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen er oppfinnelsens antistoffmolekyl et antistoffmolekyl der minst to områder av  $\beta$ -A4, som spesifikt skal gjenkjennes av antistoffet, danner en konformasjonell/strukturell epitop eller en diskontinuerlig epitop; se Geysen (1986), loc. cit.; Ghoshai (2001), J. Neurochem. 77, 1372-1385; Hochleitner (2000), J. Imm. 164, 4156-4161; Laver (1990), loc. cit. Uttrykket ”diskontinuerlig epitop” betyr innen oppfinnelsens kontekst ikke-lineære epitoper som er sammensatt fra rester fra distante deler av polypeptidkjeden. Disse rester kommer sammen på overflaten når polypeptidkjeden folder seg til en tredimensjonal struktur for å danne en konformasjonell/strukturell epitop. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer foretrukne, uventete epitoper innen  $\beta$ -A4, som resulterer i den oppfinneriske generering av spesifikke antistoffmolekyler, spesifikt i stand til å interagere med disse epitoper. Disse antistoffer/antistoffmolekyler ifølge oppfinnelsen, gir en basis for øket effektivitet og et redusert potensiale for bivirkninger. Som angitt ovenfor, er oppfinnelsens antistoffer imidlertid også i stand til uavhengig å interagere med hver av de definerte to områder/epitoper av  $\beta$ -A4, for eksempel i pepspot-analyser som dokumentert i de vedlagte eksempler.

20

25

Følgelig tilveiebringer foreliggende oppfinnelse unike verktøy som kan benyttes for depolymerisering av aggregert A $\beta$ -fibriller *in vivo* og *in vitro*, og/eller som er i stand til å stabilisere og/eller nøytralisere en konformasjonell epitop av monomerisk A $\beta$ , og derved i stand til forhindre den patologiske A $\beta$ -aggregering. Det er videre tatt sikte på at oppfinnelsens antistoffer binder til A $\beta$ -avsetninger på kanten av amyloid plakk, blant annet i hjernen til en som lider av Alzheimer og effektivt oppløser de patologiske protofibriller og fibriller.

35

I en foretrukket utførelsesform gjenkjenner antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen minst to konsekutive aminosyrer i de to områder av A $\beta$ 4 som definert her, mer foretrukket

gjenkjenner nevnte antistoffmolekyl i det første området en aminosyresekvens omfattende aminosyrene: AEFRHD, EF, EFR, FR, EFRHDSG, EFRHD eller HDSG og i det andre område en aminosyresekvens omfattende aminosyrene: HHQKL, LV, LVFFAE, VFFAED, VFFA eller FFAEDV. Ytterligere fragmenter eller utvidete deler  
5 omfatter: DAE, DAEF, FRH eller RHDSG.

Foretrukne antistoffmolekyler omfatter et variabelt  $V_H$ -område som kodet av et nukleinsyremolekyl som vist i SEKV. ID nr. 3, 5 eller 7, eller et variabelt  $V_H$ -område som vist i aminosyresekvensen som angitt i SEKV. ID nr. 4, 6 eller 8. Sekvensene som  
10 vist i SEKV. ID nr. 3 og 4 angir det kodende område, henholdsvis aminosyresekvensen av  $V_H$ -området til det parentale antistoff MSR-3 (MS-Roche 3), sekvensene i SEKV. ID nr. 5 og 6 angir de kodende områder, henholdsvis aminosyresekvensene av  $V_H$ -området til det parentale antistoff MSR-7 (MS-Roche 7) og SEKV. ID nr. 7 og 8 angir det kodende område, henholdsvis aminosyresekvensen for  $V_H$ -området til det parentale  
15 antistoff MSR-8 (MS-Roche 8). Foretrukne antistoffmolekyler som omfatter et variabelt  $V_L$ -område som kodet av et nukleinsyremolekyl som vist i SEKV. ID nummer valgt fra gruppen bestående av SEKV. ID nr. 9, 11 eller 13, eller et variabelt  $V_L$ -område som vist i aminosyresekvensen angitt i SEKV. ID nr. 10, 12 eller 14. SEKV. ID nr. 9 og 10 tilsvarer  $V_L$ -området av MSR-3, SEKV. ID nr. 11 og 12 tilsvarer  $V_L$ -området av MSR-  
20 7, og SEKV. ID nr. 13 og 14 tilsvarer  $V_L$ -området av MSR-8 er tilveiebragt. Som illustrert i de vedlagte eksempler blir de parentale antistoffer MSR-3, MSR-7 og MSR-8 benyttet for ytterligere å generere optimaliserte antistoffmolekyler med enda bedre egenskaper og/eller bindingsaffiniteter. Noen av de tilsvarende og mulige strategier, er eksemplifiserte og vist i de vedlagte eksempler.

25 Optimaliseringsstrategien som er illustrert i de vedlagte eksempler fører til et antall inventive, optimaliserte antistoffer. Disse optimaliserte antistoffer deler med sine parentale antistoffer, CDR-3 doménet av  $V_H$ -området. Mens det opprinnelige rammeverkområdet (som vist i vedlagte figur 1) forblir den samme, er CDR1-, CDR2-  
30 og/eller  $V_L$ -CDR3-området forandret i de modne/optimaliserte antistoffmolekylene. Illustrerende, modifiserte sekvensdeler for optimaliserte antistoffmolekyler er vist i vedlagte tabell 1. Fortrukne antistoffer er også optimaliserte antistoffmolekyler som er avledet fra de her beskrevne MSR-3, MSR-7 og MSR-8, og som spesifikt er i stand til å reagere med/spesifikt å gjenkjenne de to områder av  $\beta$ -A4-peptidet som definert  
35 her. Særlig kan CDR-områder, fortrinnsvis CDR1-er, mer foretrukket CDR1'er og CDR2'er, og mest foretrukket CDR1'er, CDR2'er og CDR3'er som definert her, er benyttet for å generere ytterligere antistoffer/antistoffmolekyler, blant annet ved CDR-

podingsmetoder, som velkjent i teknikken, se Jones (1986), Nature 321, 522-515 eller Riechmann (1988), Nature 332, 323-327. Mest foretrukket er antistoffer/antistoffmolekyler så vel som aminosyrefragmenter eller derivater, er avledet fra de parentale antistoffer, som beskrevet her og ovenfor, deler CDR3-doménet av  $V_H$ -området med minst ett av de parentale antistoffer. Som vist nedenfor er det også tatt 5 sikte på at genererte, kryssklonete antistoffer skal anses som optimaliserte/modne antistoffer/antistoffmolekyler. I henhold til dette kan foretrukne antistoffmolekyler også omfatte eller avledes fra antistoffer/antistoffmolekyler som karakteriseres ved  $V_H$ -områder som vist i en hvilken som helst av SEKV. ID nr. 32 til 45 eller  $V_L$ -områder som vist i SEKV. ID nr. 46 til 59, eller som kan omfatte et CDR-3-område som definert 10 i en hvilken som helst av SEKV. ID nr. 60 til 87. En spesiell utførelsesform ifølge oppfinnelsen omfatter optimaliserte antistoffmolekyler omfattende et variabelt  $V_H$ -område som vist i SEKV. ID nr. 89 og et variabelt  $V_L$ -område som vist i SEKV. ID nr. 91. En annen spesiell utførelsesform ifølge oppfinnelsen omfatter optimaliserte 15 antistoffmolekyler omfattende et variabelt  $V_H$ -område som kodet av et nukleinsyremolekyl som vist i et SEKV. ID nr. 88 et variabelt  $V_L$ -område kodet for av et nukleinsyremolekyl som vist i SEKV ID nr. 90.

Bortsett derfra kan det være et eller flere CDR-områder, fortrinnsvis et eller flere 20 CDR3-områder. Et spesielt foretrukket antistoffmolekyl av den optimaliserte type, omfatter et H-CDR3 som karakterisert i SEKV. ID nr. 92 eller 93 og/eller et L-CDR3, som karakterisert i SEKV. ID nr. 94 eller 95. Det er foretrukket at antistoffene/antistoffmolekylene ifølge oppfinnelsen karakteriseres ved deres spesifikke reaktivitet ved  $\beta$ -A4 og/eller peptider avledet fra nevnte  $\beta$ -A4. For eksempel kan optiske 25 tettheter i ELISA-tester, som vist i vedlagte eksempler etableres og forholdet mellom de optiske tettheter kan benyttes for å definere den spesifikke reaktivitet for de parentale eller de optimaliserte antistoffer. I henhold til dette er et foretrukket antistoff ifølge oppfinnelsen et som reagerer i en ELISA-test med  $\beta$ -A4 for å komme frem til en optisk tetthet målt ved 450 nm, som er 10 ganger høyere enn den optiske tetthet målt uten  $\beta$ - 30 A4, dvs. med en faktor 10 over bakgrunnen. Fortrinnsvis gjennomføres målingen av den optiske tetthet noen minutter (for eksempel 1, 2, 3, 4, 5, 6 eller 7 minutter) etter start av fargeutviklingsreaksjonen for å optimalisere forholdet signal:bakgrunn.

Foretrukne antistoffmolekyl omfatter minst én CDR-3 av et  $V_L$ -område som kodet av et 35 nukleinsyremolekyl som vist i SEKV. ID nr. 15, 17 eller 19 eller minst én CDR3-aminosyresekvens av et  $V_L$ -område som vist i SEKV. ID nr. 16, 18 eller 20 og/eller nevnte antistoffmolekyl omfatter minst én CDR3 av et  $V_H$ -område som kodet av et

nukleinsyremolekyl som vist i SEKV. ID nr. 21, 23 eller 25, eller minst en CDR3-aminosyresekvens av et V<sub>H</sub>-område som vist i SEKV. ID nr. 22, 24 eller 26. Mest foretrukket er antistoffer omfattende minst én CDR3 av et V<sub>H</sub>-område som definert her. CDR3-doméne som er nevnt her angår de illustrerende parentale antistoffmolekyler

5 MSR-3, MSR-7 eller MSR-8. Som vist i de vedlagte tabeller 1, 8 eller 10, kan imidlertid modne og/eller optimaliserte antistoffmolekyler som kan oppnås ved fremgangsmåtene beskrevet i de vedlagte eksempler, omfatte modifiserte V<sub>H</sub>-, V<sub>L</sub>-, CDR1-, CDR2- og CDR3-områder. I henhold til dette er antistoffmolekylet fortrinnsvis valgt fra gruppen bestående av MSR-3, MSR-7 eller MSR-8, eller en affinitetsmaturert versjon av MSR-

10 3, MSR-7 eller MSR-8. Affinitetsmaturerte så vel som kryssklonete versjoner av MSR-3, MSR-7 og MSR-8 omfatter blant annet antistoffmolekyler omfattende CDR1-, CDR2- og/eller CDR3-områder, som vist i tabell 1 eller 8 eller karakterisert i en hvilken som helst av SEKV. ID nr. 15 til 20, 21 til 26, 60 til 74, 75 til 87, 92 og 93 eller 94 og 95, så vel som i SEKV. ID nr. 354 til 413. Mest foretrukket omfatter antistoffet minst én

15 CDR, fortrinnsvis en CDR1, mer foretrukket en CDR2, mest foretrukket en CDR3 som vist i vedlagte tabell 1 og 8, eller som dokumentert i vedlagte tabell 10.

Det skal påpekes at affinitetmodningsteknikker er velkjente og beskrevet i de vedlagte eksempler og blant annet av Knappik (2000), J. Mol. Biol. 296, 55; Krebs (2000), J.

20 Imm. Meth. 254, 67-84; WO 01/87337; WO 01/87338; US 6 300 064; EP 96 92 92 78.8 og ytterligere referanser gitt nedenfor.

I en mer foretrukket utførelsesform ifølge oppfinnelsen er antistoffmolekylet et fullstendig antistoff (Immunoglobulin, som et IgG1, et IgG2, et IgG2b, et IgG3, et

25 IgG4, et IgA, et IgM, et IgD eller et IgE), et F(ab)-, F(ab')<sub>2</sub>-fragment, et enkelkjedeantistoff, et kimært antistoff, et CDR-podet antistoff, en bivalent antistoffkonstruksjon, , et kryssklonet antistoff eller et syntetisk antistoff. Antistoffmolekylet kan også være et Fabc-, Fv-, Fab'-fragment eller et antistoffusjonsprotein. Videre er det tatt sikte på genetiske varianter av

30 immunglobulingener. Genetiske varianter av for eksempel immunglobulin tung G kjede subklasse 1 (IgG1) kan omfatte G1m(17)- eller G1m(3)-allotypisk markør i CH1-doménet, eller G1m(1)- eller G1m(non-1)-allotypiske markør i CH3-doménet. Antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen omfatter også modifiserte eller mutante antistoffer som mutant IgG med forbedret eller forringet Fc-reseptorbinding eller

35 komplementaktivering. Det er også tatt sikte på at antistoffene ifølge oppfinnelsen fremstilles på konvensjonell måte, for eksempel produksjon av spesifikke, monoklonale antistoffer generert ved immunisering av pattedyr og fortrinnsvis mus, med peptider

omfattende de to områdene av  $\beta$ A4, som definert her, for eksempel den N-terminale og sentrale område/epitop omfattende (a) aminosyrene 2 til 10 (eller en eller flere deler derav) av  $\beta$ -A4 og (b) et aminosyrestrekk omfattende aminosyrene 12 til 25 (eller én eller flere deler derav) av  $\beta$ -A4 (SEKV. ID nr. 27). I henhold til dette kan fagmannen på

5 området generere monoklonale antistoffer mot et slikt peptid og kan av søke de oppnådde antistoffer for evne til samtidig og uavhengig å binde til/reagere med det N-terminale og sentrale område/epitop av  $\beta$ -A4 som definert her. Tilsvarende av søkingsfremgangsmåter er beskrevet i de vedlagte eksempler.

10 Som illustrert i de vedlagte eksempler, kan oppfinnelsens antistoffer/ antistoffmolekyler lett og fortrinnsvis rekombinant konstrueres og uttrykkes. Fortrinnsvis omfatter antistoffmolekylet minst ett, mer foretrukket minst to, fortrinnsvis minst tre, mer foretrukket minst fire, mer foretrukket minst fem og mest foretrukket seks CDR'er av de her definerte MSR-3-, MSR-7- eller MSR-8-parentale antistoffer eller av

15 affinitetsmodning/optimaliserte antistoffer avledet fra nevnte parentale antistoffer. Det skal bemerkes at mer enn seks CDR'er kan omfattes i rekombinantproduserte antistoffer ifølge oppfinnelsen. Fagmannen på området kan lett benytte informasjonen som er gitt i de vedlagte eksempler for å dedusere tilsvarende CDR'er av de parentale så vel som de affinitetsoptimaliserte antistoffer. Eksempler på optimaliserte antistoffer som er

20 oppnådd ved modning/optimalisering av de parentale antistoffer er blant annet vist i vedlagte tabell 1.

Et modent/optimalisert antistoffmolekyl ifølge oppfinnelsen er for eksempel MSR-7.9H7, som også karakteriseres ved sekvenser som vedlagt her og som omfatter SEKV.

25 ID nr. 88 til 95 og som angir  $V_H$ -området av MSR-7.9H7 (SEKV. ID nr. 88 og 89),  $V_L$ -området av MSR-7.9H7 (SEKV. ID nr. 90 og 91), H-CDR3 av MSR-7.9H7 (SEKV. ID nr. 92 og 93) så vel som L-CDR3 av MSR-7.9H7 (SEKV. ID nr. 94 og 95). Illustrerende antistoffmolekyl 7.9H7 er avledet fra parentalt antistoff MSR7 og er et spesielt eksempel ifølge oppfinnelsen på et optimalisert/modent antistoffmolekyl ifølge

30 oppfinnelsen. Dette antistoffmolekyl kan ytterligere modifiseres i henhold til oppfinnelsen, for eksempel i form av krysskloning, se nedenfor og vedlagte eksempler.

Som dokumentert i de vedlagte eksempler omfatter antistoffet ifølge oppfinnelsen også kryssklonete antistoffer, dvs. antistoffer omfattende forskjellige antistoffområder (for

35 eksempel CDR-områder) fra ett eller flere parentale eller affinitetsoptimaliserte antistoffer, som beskrevet her. Disse kryssklonete antistoffer kan være antistoffer i flere forskjellige rammeverk, hvorved det mest foretrukne rammeverk er et IgG-rammeverk,

enda mer foretrukket et IgG1-, IgG2a- eller IgG2b-rammeverk. Det er spesielt foretrukket at antistofframmeverket er et mammalsk-, og aller helst et humant rammeverk. Doméne av de lette og tunge kjeder har den samme generelle struktur, og hvert doméne omfatter fire rammeverksområder der sekvensene er relativt konserverte, forent av tre hypervariable doméner, kjent som komplementaritetsbestemmende områder (CDR1-3).

Som benyttet her angår et "humant rammeverksområde" et rammeverksområde som i det vesentlige er identisk (omkring 85 % eller mer, vanligvis 90-95 % eller mer) med rammeverksområdet på et naturlig forekommende humant immunglobulin. Rammeverksområdet til et antistoff, dvs. de kombinerte rammeverksområder for de deltagende lette og tunge kjeder, tjener til å posisjonere og å innrette CDR'ene. CDR'ene er primært ansvarlige for binding til en epitop eller et antigen. Det er verdt å merke seg at ikke bare kryssklonete antistoffer som beskrevet her kan være til stede i et foretrukket (humant) antistofframmeverk, men også antistoffmolekyler omfattende CDR'er fra blant annet de parentale antistoffene MSR-3, -7 eller -8, som beskrevet her eller av modnede antistoffer avledet fra nevnte parentale antistoffer, kan innføres i et immunglobulinrammeverk.

Som vist i de vedlagte eksempler er det blant annet mulig ved genetisk konstruksjon, som kjent i teknikken, å overføre hele lette kjeder fra en optimalisert donorklon til en optimalisert reseptorklon. Eksempel på en optimalisert donorklon er for eksempel L-CDR1 (L1) og et eksempel på en optimalisert reseptorklon er H-CDR2 (H2). Epitopsesifisitet kan bevares ved å kombinere klonene som har de samme H-CDR-3-områder. Ytterligere detaljer er gitt i det illustrerende eksempel 13.

Foretrukne kryssklonete antistoffmolekyler er valgt fra gruppen bestående av MS-R #3.3H1x3.4L9, MS-R #3.4H1x3.4L9, MS-R #3.4H3x3.4L7, MS-R #3.4H3x3.4L9, MS-R #3.4H7x3.4L9, MS-R #3.4H7x3.4L7, MS-R #3.6H5x3.6L1, MS-R #3.6H5x3.6L2, MS-R #3.6.H8x3.6.L2, MS-R #7.2H2x7.2L1, MS-R #7.4H2x7.2L1, MS-R #7.4H2x7.12L2, MS-R #7.9H2x7.2L1(L1), MS-R #7.9H2x7.12L1, MS-R #7.9H2x7.12L2, MS-R #7.9H2x7.12L2(L1+2), MS-R #7.9H4x7.12.L2, MS-R #7.11H1x7.2L1, MS-R #7.11H1x7.11L1, MS-R #7.11 H2x7.2L1 (L1), MS-R #7.11 H2x7.9L1 (L1), MS-R #7.11 H2x7.12L1 eller MS-R #8.1H1x8.2L1.

Genereringen av kryssklonete antistoffer er også illustrert i de vedlagte eksempler. De ovenfor nevnte foretrukne, kryssklonete antistoffer/antistoffmolekyler, er optimaliserte/modne antistoffmolekyler avledet fra parentale antistoffer, som beskrevet her, særlig fra MSR-3 og MSR-7. I tillegg er ytterligere karakteriserende CDR-

5 sekvenser og V-områder av de kryssklonete antistoffmolekyler/antistoffer gitt i de vedlagte SEKV. ID nr. 32, 33, 46 og 47 (MSR 3.6H5x3.6.L2; V<sub>H</sub>-, V<sub>L</sub>-områder); 34, 35, 48 og 49 (MSR 3.6H8x3.6.L2; V<sub>H</sub>-, V<sub>L</sub>-områder); 36, 37, 50 og 51 (MSR 7.4H2x7.2.L1; V<sub>H</sub>-, V<sub>L</sub>-områder); 38, 39, 52 og 53 (MSR 7.9H2x7.12.L2; V<sub>H</sub>-, V<sub>L</sub>-områder); 40, 41, 54 og 55 (MSR # 7.9H4x7.12.L2; V<sub>H</sub>-, V<sub>L</sub>-områder); 42, 43,

10 56 og 57 (MSR #7.11 H1x7.11.L1; V<sub>H</sub>-, V<sub>L</sub>-områder); og 44, 45, 58 og 59 (MSR #7.11 Hi x7.2.L1; V<sub>H</sub>-, V<sub>L</sub>-områder). Tilsvarende CDR3-områder av disse spesielt foretrukne kryssklonete antistoffmolekyler er angitt i SEKV. ID nr. 60 til 87. For ytterligere MSR-antistoffmolekyler kan V<sub>H</sub>-, V<sub>L</sub>-, CDR-områder deduseres fra de vedlagte tabeller 8 eller 10 og fra de vedlagte sekvenslister, særlig SEKV. ID nr. 32 til

15 95 for MS-R antistoffer/antistoffmolekyler #3.6H5x3.6L2, #3.6H8x3.6L2, #7.4H2x7.2L1, #7.9H2x7.12L2, #7.9H4x7.12L2, #7.11H1x7.11L1, #7.11H1x7.2L1 og #7.9H7 eller SEKV. ID nr. 294 til 413 for MSR-R antistoffer/antistoffmolekyler MS-R #3.3H1x3.4L9, #3.4H1x3.4L9, #3.4H3x3.4L7, #3.4H3x3.4L9, #3.4H7x3.4L9, #3.4H7x3.4L7, #3.6H5x3.6L1, #7.2H2x7.2L1,

20 #7.4H2x7.12L2, #7.9H2x7.2L1, #7.9H2x7.12L1, #7.11H2x7.2L1, #7.11H2x7.9L1, #7.11H2x7.12L1 eller #8.1H1x8.2L1. I henhold til dette og ved siden av V<sub>H</sub>-området som definert ovenfor, kan foretrukne antistoffmolekyler omfatte V<sub>H</sub>-områder som definert i en hvilken som helst av SEKV. ID nr. 294 til 323. Tilsvarende angir SEKV. ID nr. 324 til 353 foretrukne V<sub>L</sub>-områder, som ved siden av V<sub>L</sub>-områder som definert

25 ovenfor, som kan være inneholdt i oppfinnelsens antistoffmolekyler. Tilsvarende CDR-3-områder er beskrevet ovenfor, så vel som i ytterligere sekvenser som vist i SEKV. ID nr. 354 til 413.

Oppfinnelsens antistoffmolekyler kan lett fremstilles i tilstrekkelige mengder, blant

30 annet ved rekombinante fremgangsmåter som er kjent innen teknikken, se for eksempel Bentley, Hybridoma 17 (1998), 559-567; Racher, Appl. Microbiol. Biotechnol. 40 (1994), 851-856; Samuelsson, Eur. J. Immunol. 26 (1996), 3029-3034.

Teoretisk er i oppløselig  $\beta$ -A4 (monomerisk/oligomerisk) både den N-terminale- og

35 midtepitopene tilgjengelige for antistoffinteraksjon og antistoffmolekyler ifølge oppfinnelsen, kan enten binde til en terminal- eller midtepitopen separat, men under disse betingelser vil maksimal affinitet ikke oppnås. Det er imidlertid mer sannsynlig at

en optimal kontakt til antistoffparatopen vil oppnås ved samtidig binding til begge epitoper, dvs. tilsvarende interaksjoner med aggregert  $\beta$ -A4. Således er antistoffer ifølge oppfinnelsen unike anti-A $\beta$ -antistoffer i det at de binder til aggregert  $\beta$ -A4 (via interaksjon med den N-terminale- og midtepitopen), og samtidig også er i stand til å stabilisere og nøytralisere den konformasjonelle epitop i oppløselig  $\beta$ -A4. Disse antistoffer er distinkte overfor den kjente teknikks antistoffer.

Mest foretrukket er antistoffmolekyler ifølge oppfinnelsen som har en affinitet til A $\beta$  eller definerte fragmenter derav med en  $K_D$ -verdi lavere enn 2000 nM, fortrinnsvis lavere enn 100 nM, mer foretrukket lavere enn 10 nM, mest foretrukket lavere enn 1 nM. Målingen av slike affiniteter kan gjennomføres ved fremgangsmåter som vist i eksemplene og som er kjent i teknikken. Slike fremgangsmåter omfatter, men er ikke begrenset til "BIAcore"-analyser ([www.biacore.com](http://www.biacore.com); Malmquist (1999), *Biochem. Soc. Trans.* 27, 335-340) og fast faseanalyser ved anvendelse av merkete antistoffer eller merket A $\beta$ .

Fortrinnsvis er antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen i stand til å dekorere/reagere med/binde til amyloid plakk i *in vitro* (post mortem) hjernesnitt fra pasienter som lider av amyloidrelaterte lidelser som Alzheimers sykdom. Likeledes er det også foretrukket at oppfinnelsens antistoff/antistoffmolekyler forhindrer A $\beta$ -aggregering *in vivo* så vel som i *in vitro*-analyser som vist i de vedlagte eksempler. Tilsvarende er antistoffmolekylene ifølge oppfinnelsen foretrukket for å depolymerisere A $\beta$ -aggregat *in vivo*- og/eller *in vitro*-analyse, som vist i eksemplene. Denne evne hos oppfinnelsens antistoffer/antistoffmolekyler er blant annet å kunne benyttes til medisinske formål, særlig i farmasøytiske sammensetninger, som beskrevet nedenfor.

Oppfinnelsen tilveiebringer også et nukleinsyremolekyl som koder et antistoffmolekyl ifølge oppfinnelsen, som definert her.

Nevnte nukleinsyremolekyl kan være et naturlig nukleinsyremolekyl og også et rekombinant nukleinsyremolekyl. Nukleinsyremolekylet ifølge oppfinnelsen kan derfor være av naturlig opprinnelse, syntetisk eller også semisyntetisk. Det kan omfatte DNA, RNA, så vel som PNA og kan være en hybrid derav.

Det er åpenbart for fagmannen at regulatoriske sekvenser kan adderes til nukleinsyremolekylet ifølge oppfinnelsen. For eksempel kan det benyttes promotere, transkripsjonelle enhancere og/eller sekvenser som tillater induert ekspresjon av

polynukleotider ifølge oppfinnelsen. Et egnet induserbart system er for eksempel tetrazyklinregulert genespresjon som beskrevet for eksempel av Gossen og Bujard (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 5547-5551) og Gossen et al. (Trends Biotech. 12 (1994), 58-62), eller et dexametasoninduserbart genespresjonssystem, som  
 5 beskrevet for eksempel av Crook (1989) EMBO J. 8, 513-519.

Videre er det tatt sikte på for ytterligere formål, at nukleinsyremolekylet for eksempel kan inneholde tioesterbindinger og/eller nukleotidanaloger. Nevnte modifikasjoner kan være nyttige for stabilisering av nukleinsyremolekylet mot endo- og/eller eksonukleaser  
 10 i cellen. Nevnte nukleinsyremolekyler kan transkriberes med en egnet vektor inneholdende kimære gener som tillater transkripsjon av nevnte nukleinsyre i cellen. I denne forbindelse skal det også være klart at polynukleotidet ifølge oppfinnelsen kan benyttes for "genmålsøkende"- eller "genterapeutiske"- tilnærminger. I en annen utførelsesform er nevnte nukleinsyremolekyler merket. Fremgangsmåter for påvisning  
 15 av nukleinsyrer er velkjent i teknikken, for eksempel Southern og Northern blotting, PCR eller primerforlengelse. Denne utførelsesform kan være nyttig i screeningsmetoder for å bekrefte vellykket innføring av oppfinnelsens nukleinsyremolekyler under genterapiaktiviteter.

20 Nukleinsyremolekylene ifølge oppfinnelsen kan være et rekombinant produsert, kimært nukleinsyremolekyl omfattende en hvilken som helst av de ovenfor nevnte nukleinsyremolekyler, enten alene eller i kombinasjon. Fortrinnsvis er nukleinsyremolekyler ifølge oppfinnelsen del av en vektor.

25 Foreliggende oppfinnelse angår derfor også en vektor, omfattende nukleinsyremolekyler ifølge oppfinnelsen.

Vektoren ifølge oppfinnelsen kan for eksempel være et plasmid, kosmid, et virus, en bakteriofag eller en annen vektor benyttet for eksempel konvensjonelt i genetisk  
 30 konstruksjon, og kan videre omfatte gener som markørgener som tillater seleksjon av vektoren i en egnet vertscelle under egnete betingelser.

Videre kan vektoren ifølge foreliggende oppfinnelse, i tillegg til nukleinsyresekvensene ifølge oppfinnelsen, omfatte ekspresjonskontrollelementer som tillater riktig ekspresjon  
 35 av de kodende områder, i egnete verter. Slike kontrollelementer er velkjente for fagmannen, og kan inkludere en promoter, en spleisekassett, translasjonsinitieringskodon, translasjon og innføringssete for innføring av et innskudd i

vektoren. Fortrinnsvis er nukleinsyremolekylet ifølge foreliggende oppfinnelse operativt forbundet til nevnte ekspresjonskontrollsekvens som tillater ekspresjon i eukaryote eller prokaryote celler.

- 5   Kontrollelementer som sikrer ekspresjon i eukaryote og prokaryote celler er velkjente for fagfolk på området. Som nevnt ovenfor omfatter det vanligvis regulatoriske sekvenser som sikrer initiering av transkripsjon og evt. poly-A-signaler som sikrer terminering av transkripsjon og stabilisering av transkripsjonen. Ytterligere regulatoriske elementer kan inkludere transkripsjonelle så vel som translasjonelle
- 10 enhancere, og/eller naturlig assosierte eller heterologe promoterområder. Mulige regulatoriske elementer som tillater ekspresjon i for eksempel pattedyrvertsceller omfatter CMV-HSV-tymidinkinasepromoterene, SV40, RSV-promoterene (Rous Sarkoma Virus), human forlengelsesfaktor 1 $\alpha$ -promoterene, den glukokortikoidinduserbare MMTV-promoterene (Moloney musetumorvirus),
- 15 metallotionein- eller tetrasyklininduserbare promotere, eller enhancere som CMV- eller SV40-enhancere. For ekspresjon i nøytrale celler er det tatt sikte på at neurofilament-, PGDF-, NSE-, PrP- eller thy-1-promotere kan anvendes. Nevnte promotere er velkjente innen teknikken, og blant annet beskrevet av Charron (1995), *J. Biol. Chem.* 270, 25739-25745. For ekspresjon i prokaryote celler er det beskrevet et stort antall
- 20 inkludert, for eksempel tac-lac-promoterene eller trp-promoterene. Ved siden av elementer som er ansvarlige for initiering av transkripsjon, kan slike regulatoriske elementer også omfatte transkripsjonstermineringssignaler som SV40 poly-A-sete eller tk-poly-A-setet, nedstrøms for polynukleotidet. I denne kontekst er det kjent egnete ekspresjonsvektorer som Okayama-Berg cDNA-ekspresjonsvektor pcDV1 (Pharmacia), pRc/CMV,
- 25 pcDNA1, pcDNA3 (In-vitro gene), pSPORT1 (GIBCO BRL), pX (Pagano (1992) *Science* 255, 1144-1147), gjær to-hybrid vektorer som pEG202 og dpJG4-5 (Gyuris (1995) *Cell* 75, 791-803), eller prokaryote ekspresjonsvektorer som  $\lambda$ gt11 eller pGEX (Amersham-Pharmacia). Ved siden av nukleinsyremolekylene ifølge oppfinnelsen kan vektoren videre omfatte nukleinsyresekvenser som koder sekresjonssignaler. Slike
- 30 sekvenser er velkjente for fagmannen. Videre, avhengig av ekspresjonssystemet anvendt, kan ledersekvenser som er i stand til å styre polypeptidene ifølge oppfinnelsen til et cellulært rom, tilsettes kodingssekvensene av nukleinsyremolekylene ifølge oppfinnelsen, og dette er velkjent i teknikken. Ledersekvensen(e) sammensettes i egnete faser med translasjons-, initierings- og termineringssekvenser, og fortrinnsvis en
- 35 ledersekvens som er i stand til å styre sekresjonen av translatert protein, eller et protein derav, inn i det periplasmiske rom eller ekstracellulære medium. Evt. kan den heterologe sekvens kode et fusjonsprotein inkludert et C- eller N-terminalt

identifiseringspeptid som gir ønskete karakteristika, for eksempel stabilisering eller forenklet rensing av uttrykte, rekombinante produkter. Når først vektoren er innarbeidet i den egnete vert, blir verten holdt under betingelser som er egnet for høynivåekspresjon av nukleotidsekvensen, og etter ønske kan oppsamling og rensing av  
 5 antistoffmolekylene eller fragmentene derav ifølge oppfinnelsen, følge etter dette.

Oppfinnelsen angår i henhold til dette også verter/vertsceller omfattende en vektor som definert her. Slike verter kan være nyttige for prosessering for oppnåelse av antistoffer/antistoffmolekyler ifølge oppfinnelsen, så vel som i  
 10 medisinske/farmasøytiske oppsett. Nevnte vertsceller kan også omfatte transduerte eller transfekterte neuronalceller som neuronale stamceller, fortrinnsvis adultneuronale stamceller. Slike vertsceller kan være nyttige ved transplantasjonsterapier.

Videre kan vektoren ifølge foreliggende oppfinnelse også være en ekspresjons-, en  
 15 genoverførings- eller geninnsiktingsvektor. Genterapi basert på innføring av terapeutiske gener i celler ved *ex-vivo* eller *in vivo* teknikker, er en av de viktigste anvendelser ved genoverføring. Transgene mus som uttrykker et nøytraliserende antistoff rettet mot nervevekstfaktor, er generert ved anvendelse av "neuroantistoff"-teknikken: Capsoni, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000), 68266831 og Biocca, Embo  
 20 J. 9 (1990), 101-108. Egnete vektorer, fremgangsmåter eller genavleveringssystemer for *in vitro*- eller *in vivo*-genterapi, er beskrevet i litteraturen og er velkjent for fagmannen, se for eksempel Giordano, Nature Medicine 2 (1996), 534-539; Schaper, Circ. Res. 79 (1996), 911-919; Anderson, Science 256 (1992), 808-813, Isner, Lancet 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, Circ. Res. 77 (1995), 1077-1086; Onodua, Blood 91 (1998),  
 25 30-36; Verzeletti, Hum. Gene Ther. 9 (1998), 2243-2251; Verma, Nature 389 (1997), 239-242; Anderson, Nature 392 (Supp. 1998), 25-30; Wang, Gene Therapy 4 (1997), 393-400; Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714-716; WO 94/29469; WO 97/00957; US 5 580 859; US 5 589 466; US 4 394 448 eller Schaper, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635-640, og i deri angitte referanser. Særlig er nevnte vektorer  
 30 og deres genavleveringssystemer også beskrevet ved genterapitilnæringer i neurologisk vev/celler (se blant annet Blömer, J. Virology 71 (1997), 6641-6649) eller i hypotalamus (se blant annet Geddes, Front Neuroendocrinol. 20 (1999), 296-316, eller Geddes, Nat. Med. 3 (1997), 1402-1404). Ytterligere egnete genterapikonstrukturer for anvendelse i neurologiske celler/vev, er kjent i teknikken, for eksempel hos Meier  
 35 (1999), J. Neuropathol. Exp. Neurol. 58, 1099-1110. Nukleinsyremolekylene og vektorene ifølge oppfinnelsen kan være konstruert for direkte innføring inn i cellen, eller for innføring inn i cellen via liposomer, virale vektorer (for eksempel adenovirale

eller retrovirale), elektroporering, ballistisk (for eksempel genpistol) eller via andre avleveringssystemer. I tillegg kan et baculoviralt system anvendes som eukaryot ekspresjonssystem for nukleinsyremolekylene ifølge oppfinnelsen. Innføringen og den genterapeutiske tilnærming, bør fortrinnsvis føre til ekspresjon av et funksjonelt antistoffmolekyl ifølge oppfinnelsen, hvorved nevnte uttrykte antistoffmolekyl er spesielt nyttig i behandling, lindring og/eller prevensjon av neurologiske lidelser relatert til anormale amyloid syntese, sammensetning og/eller aggregering, som for eksempel Alzheimers sykdom og liknende.

10 I henhold til dette kan nukleinsyremolekylet ifølge foreliggende oppfinnelse og/eller de ovenfor beskrevne vektorer/verter ifølge oppfinnelsen, være spesielt nyttige som farmasøytiske preparater. Nevnte farmasøytiske preparater kan anvendes i genterapitilnærminger. I denne kontekst er det tatt sikte på at nukleinsyremolekylene og/eller vektorene ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes for å modulere, endre  
15 og/eller modifisere den (cellulære) ekspresjon og/eller konsentrasjon av antistoffmolekylene ifølge oppfinnelsen eller et eller flere fragmenter derav.

For genterapianvendelser kan nukleinsyrer som koder peptider ifølge oppfinnelsen eller fragmenter derav, klones inn i et genavleveringssystem, for eksempel et virus, som  
20 benyttes for infeksjon og for å gi sykdomsforbedrende eller -helbredende effekter i den infiserte celle eller organisme.

Foreliggende oppfinnelse angår også en vertscelle som er transfektert eller transformert med vektoren ifølge oppfinnelsen, eller en ikke-human vert som bærer vektoren ifølge oppfinnelsen, dvs. til en vertscelle eller en vert som er genetisk modifisert med et  
25 nukleinsyremolekyl ifølge oppfinnelsen eller med en vektor omfattende et slikt nukleinsyremolekyl. Uttrykket "genetisk modifisert" betyr at vertscellen eller verten i tillegg til sitt naturlige genom, omfatter et nukleinsyremolekyl eller en vektor ifølge oppfinnelsen, som ble innført i cellen eller verten eller i en av forgjengerne/foreldrene.  
30 Nukleinsyremolekylet eller vektoren kan være til stede i den genetisk modifiserte vert eller vertscelle, enten som et uavhengig molekyl utenfor genomet, spesielt som et molekyl som er i stand til replikering, eller kan være stabilt integrert i vertscellen eller vertens genom.

35 Vertscellen ifølge oppfinnelsen kan være en hvilken som helst prokaryot eller eukaryot celle. Egnete prokaryote celler er de som generelt benyttes for kloning som *E. coli* eller *Bacillus subtilis*. Videre omfatter eukaryote celler for eksempel fungale eller animalske

celler. Eksempler på egnete fungale celler er gjærceller, fortrinnsvis de av genuset *Saccharomyces* og spesielt de av spesies *Saccharomyces cerevisiae*. Egnete animalceller er for eksempel insektsceller, vertebratceller, fortrinnsvis pattedyrceller, som for eksempel HEK293, NSO, CHO, MDCK, U2-OSHela, NIH3T3, MOLT-4, Jurkat, PC-12, PC-3, IMR, NT2N, Sk-n-sh, CaSki, C33A. Disse vertsceller, for eksempel CHO-celler, kan tilveiebringe post-translasjonelle modifikasjoner til antistoffmolekylene ifølge oppfinnelsen, inkludert lederpeptidfjerning, folding og sammensetting av H- (tung) og L- (lett) kjeder, glykosylering av molekylet på korrekte sider, og sekresjon av det funksjonelle molekyl. Ytterligere egnete cellelinjer som er kjent i teknikken, kan oppnås fra cellelinjedepoter som "the American Type Culture Collection" (ATCC). I henhold til oppfinnelsen er det videre tatt sikte på at primærceller/cellekulturer kan funksjonere som vertsceller. Nevnte celler ble spesielt avledet fra insekter (som insekter av spesiene *Drosophila* eller *Blatta*) eller pattedyr (som menneske, svin, mus eller rotte). Disse vertsceller kan også omfatte celler fra og/eller avledet fra cellelinjer som neuroblastomcellelinjer. De ovenfor nevnte primærceller er velkjent i teknikken og omfatter blant annet primær astrocytter, (blandete) spinalkulturer eller hippocampalkulturer.

I en mer foretrukket utførelsesform er vertscellen som er transformert med vektoren ifølge oppfinnelsen, en neuronal celle, en neuronal stamcelle (for eksempel en adult neuronal stamcelle), en hjernecelle eller en celle (linje) avledet derfra. Imidlertid kan også en CHO-celle omfattende nukleinsyremolekylt ifølge oppfinnelsen være spesielt nyttig som vert. Slike celler kan gi de korrekte sekundærmodifikasjoner på de uttrykte molekyler, dvs. antistoffmolekylene ifølge oppfinnelsen. Disse modifikasjonene omfatter blant annet glykosyleringer og fosforyleringer.

Verter kan være ikke-humane pattedyr, fortrinnsvis mus, rotte, sau, kalv, hund eller aper av forskjellige typer. Nevnte pattedyr kan være uunnværlige for utvikling av en helbredelse, særlig en for neurologiske og/eller neurodegenerative lidelser som nevnt ovenfor. Videre kan vertene ifølge oppfinnelsen være spesielt nyttige ved fremstilling av antistoffmolekyler (eller fragmenter derav) ifølge oppfinnelsen. Det er tatt sikte på at antistoffmolekylene (eller fragmentene derav) isoleres fra verten. Dvs. at det blant annet er tatt sikte på at nukleinsyremolekylene og/eller vektorene som er beskrevet her, er innarbeidet i sekvenser for transgen ekspresjon. Innføringen av oppfinnelsens nukleinsyremolekyler som transgener i ikke-humane verter, og deres etterfølgende ekspresjon kan benyttes for fremstilling av oppfinnelsens antistoffer. For eksempel kan ekspresjonen av ett eller flere slike transgener i melken til det transgene dyr, gi en

mulighet for å oppnå oppfinnelsens antistoffmolekyler i kvantitative mengder, se blant annet US 5 741 957; US 5 304 489 eller US 5 849 992. Nyttige transgener i dette henseende omfatter nukleinsyremolekylene ifølge oppfinnelsen, for eksempel kodende sekvenser for de lette og tunge kjeder av antistoffmolekylene som beskrevet her,

5 operativt forbundet til promoter- og/eller enhancerstrukturer fra et brystkjertelsesifikt gen som kasein eller  $\beta$ -lactoglobulin.

Oppfinnelsen tilveiebringer også en fremgangsmåte for fremstilling av et antistoffmolekyl ifølge oppfinnelsen, omfattende dyrking av vertscellen, som beskrevet

10 her under betingelser som tillater syntese av antistoffmolekylet og gjenvinning av antistoffmolekylet fra kulturen.

Oppfinnelsen angår også et preparat omfattende et antistoffmolekyl ifølge oppfinnelsen eller et antistoffmolekyl fremstilt ved den fremgangsmåte som er beskrevet ovenfor, og

15 evt. ytterligere molekyler, enten alene eller i kombinasjon, og for eksempel molekyler som er i stand til å interferere med dannelse av amyloid plakk, eller som er i stand til depolymerisering av allerede dannet amyloid plakk. Uttrykket ”preparat” som benyttet her, omfatter minst én forbindelse ifølge oppfinnelsen. Fortrinnsvis er et slikt preparat et farmasøytisk eller et diagnostisk preparat.

20

Preparatet kan foreligge i fast eller flytende form, og kan blant annet foreligge i form av ett eller flere pulvere, tabletter, oppløsninger eller aerosoler. Preparatet kan omfatte ett eller flere antistoffer/antistoffmolekyler ifølge oppfinnelsen eller nukleinsyremolekyler, vektorer eller verter ifølge oppfinnelsen. Det er også tatt sikte på at preparatet omfatter

25 minst to, og fortrinnsvis tre, helst fire og aller helst fem antistoffmolekyler ifølge oppfinnelsen eller nukleinsyremolekyler som koder nevnte antistoffmolekyler. Preparatet kan også omfatte optimaliserte antistoffer/antistoffmolekyler ifølge oppfinnelsen, oppnåelige ved de fremgangsmåter som er beskrevet her, og i de vedlagte eksempler.

30

Det er foretrukket at det farmasøytiske preparat evt. omfatter en farmasøytisk akseptabel bærer og/eller et fortynningsmiddel. Det her beskrevne farmasøytiske preparat kan være spesielt nyttig for behandling av neurologiske og/eller neurodegenerative lidelser. Disse lidelser omfatter, men er ikke begrenset til Alzheimers sykdom, amyotrofisk lateral

35 sklerose (ALS), arvelig cerebral hemorragi med amyloidose av hollandsk type, Down's syndrom, HIV-demens, Parkinson's sykdom og aldersrelaterte neuronale lidelser. Det farmasøytiske preparatet ifølge oppfinnelsen er blant annet tenkt som potent inhibitor av

amyloid plakkdannelse eller som en potent stimulator for depolymerisering av amyloid plakk. Oppfinnelsen tilveiebringer derfor farmasøytiske preparater omfattende forbindelser ifølge oppfinnelsen for anvendelse ved behandling av sykdommer/lidelser assosiert med patologisk APP-proteolyse og/eller amyloid plakkdannelse.

5

Eksempler på farmasøytisk egnete bærere, eksipienser eller fortynningsmidler er velkjent i fagfeltet og inkluderer fosfatbufrete saltoppløsninger, vann, emulsjoner, for eksempel olje/vann-emulsjoner, forskjellige typer fuktemidler, sterile oppløsninger osv. Preparater omfattende slike bærere, kan formuleres i henhold til velkjente, konvensjonelle fremgangsmåter. Disse farmasøytiske preparater kan administreres til 10 individer i egnete doser. Administrering av de egnete preparater kan gjennomføres på forskjellige måter, for eksempel ved intravenøs, intraperitoneal, subkutan, intramuskulær, topisk, intradermal, intranasal eller intrabronkial administrering. Det er spesielt foretrukket at administreringen gjennomføres ved injeksjon og/eller avlevering, for eksempel til et sete i en hjernearterie eller direkte inn i hjernevevet. Preparatene 15 ifølge oppfinnelsen kan også administreres direkte til det målsøkte setet, for eksempel ved biolistisk avlevering til et eksternt eller internt målsete, som hjernen. Doseregimet vil bestemmes av legen og forskjellige kliniske faktorer. Som velkjent i den medisinske teknikk, avhenger dosene for en hvilken som helst pasient av mange faktorer, inkludert 20 pasientens størrelse, kroppens overflateareal, alder og den spesielle forbindelse som skal administreres, kjønn, tid og administreringsrute, generell helse og andre medikamenter som administreres samtidig. Proteinholdige farmasøytiske aktive stoffer kan være til stede i mengder mellom 1 ng og 10 mg/kg kroppsvekt/dose; imidlertid kan doser under eller over dette eksempelområdet benyttes, særlig tatt i betraktning de ovenfor nevnte 25 faktorer. Hvis regimet er en kontinuerlig infusjon, bør den også ligge i området fra 1 µg til 10 mg enheter/kg kroppsvekt/minutt.

Forløpet kan overvåkes ved periodisk bedømmelse. Preparatene ifølge oppfinnelsen kan administreres lokalt eller systemisk. Det er verdt å merke seg at perifert administrerte 30 antistoffer, kan trenge inn i sentralnervesystemet, se blant annet Bard (2000), Nature Med. 6, 916-919. Preparater for parenteral administrering inkluderer sterile, vandige eller ikke-vandige oppløsninger, suspensjoner og emulsjoner. Eksempler på ikke-vandige oppløsningsmidler er propylenglykol, polyetylenglykol, vegetabiliske oljer som olivenolje og injiserbare, organiske estere som etyloleat. Vandige bærere inkluderer 35 vann, alkoholiske/vandige oppløsninger, emulsjoner eller suspensjoner, inkludert salt- og bufrete media. Parenterale bærere inkluderer natriumkloridoppløsninger, Ringers dextrose, dextrose og natriumklorid, Ringers laktat, eller ikke-flyktige oljer. Intravenøse

vehikler inkluderer fluide og næringsanrikere, elektrolyttanrikere (som de basert på Ringers dextrose) og liknende. Konserveringsmidler og andre tilsetninger kan også være til stede, for eksempel antimikrobielle midler, antioksidanter, chelateringsmidler og inerte gasser og liknende. Videre kan det farmasøytiske preparat ifølge oppfinnelsen omfatte ytterligere midler avhengige av den tilsiktete anvendelse av det farmasøytiske preparat. Slike midler kan være medikamenter som virker på sentralnervesystemet, for eksempel neurobeskyttende faktorer, kolinesteraseinhibitorer, agonister av M1-muskariniske reseptor, hormoner, antioksidanter, inflammasjonsinhibitorer osv. Det er spesielt foretrukket at det farmasøytiske preparat omfatter ytterligere midler som for eksempel neurotransmittere og/eller substitusjonsmolekyler for neurotransmittere, vitamin E eller  $\alpha$ -liponsyre.

De farmasøytiske preparater, , eller anvendelsen av oppfinnelsen, som beskrevet ovenfor, kan benyttes for behandling av alle typer sykdommer som hittil ikke er kjente, eller er relatert til eller avhengig av patologisk APP-aggregering eller patologisk APP-prosessering. De kan være spesielt nyttige for behandling av Alzheimers sykdom og andre sykdommer der ekstracellulære avsetninger av amyloid- $\beta$  synes å spille en rolle. De kan hensiktsmessig anvendes i mennesker, selv om behandling av dyr også ligger innenfor fremgangsmåtene, anvendelsene og preparatene beskrevet heri.

I en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen, er preparatet ifølge oppfinnelsen som er beskrevet et diagnostisk preparat som videre evt. omfatter egnede midler for påvisning. Det diagnostiske preparat omfatter minst én av de ovenfor nevnte forbindelser ifølge oppfinnelsen.

Nevnte diagnostiske preparat kan omfatte forbindelsene ifølge oppfinnelsen, og særlig og fortrinnsvis antistoffmolekylene ifølge oppfinnelsen, i oppløselig form/væskefase, men det er også tatt sikte på at preparatene er bundet til/festet til og/eller forbundet med en fast bærer.

Faste bærere kan benyttes i kombinasjon med det diagnostiske preparat, som definert her, eller forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan være direkte bundet til nevnte faste bærere. Slike bærere er velkjente i teknikken og omfatter blant annet kommersielt tilgjengelige kolonnematerialer, polystyrenkuler, latekskuler, magnetiske kuler, kolloide metallpartikler, glass- og/eller silisiumbrikker og overflater, nitrocellulosestrimler, membraner, ark, duracytter, brønner og vegger i reaksjonsbeholdere, plastrør osv. Forbindelsene ifølge oppfinnelsen, og særlig antistoffene ifølge oppfinnelsen, kan

- bindes til mange forskjellige bærere. Eksempler på velkjente bærere er glass, polystyren, polyvinylklorid, polypropylen, polyetylen, polykarbonat, dekstran, nylon, amyloser, naturlig og modifiserte celluloser, polyakrylamider, agaroser og magnetitt. Bæreren kan være enten oppløselig eller uoppløselig for oppfinnelsens formål. Egnete markører og fremgangsmåter for merking er identifisert ovenfor, og er i tillegg nevnt nedenfor. Egnete fremgangsmåter for fiksering/immobilisering av oppfinnelsens forbindelser er velkjent i fagfeltet og inkluderer, men er ikke begrenset til ioniske, hydrofobe, kovalente interaksjoner og liknende.
- 10 Det er spesielt foretrukket at det diagnostiske preparat ifølge oppfinnelsen benyttes for påvisning og/eller kvantitering av APP- og/eller APP-prosesserende produkter, som amyloid- $\beta$  eller for påvisning og/eller kvantitering av patologiske og/eller (genetisk) modifiserte APP-spaltings seter.
- 15 Som illustrert i de vedlagte eksemplene, er forbindelsene ifølge oppfinnelsen, og særlig oppfinnelsens antistoffmolekyler, spesielt nyttige som diagnostiske midler ved påvisning av genuint, humant amyloid plakk i hjernedeler hos Alzheimers pasienter ved indirekte immunfluoresens.
- 20 Det er foretrukket at forbindelsene ifølge oppfinnelsen anvendes i et diagnostisk preparat i påvisbar, merket tilstand. Et antall teknikker er tilgjengelige for merking av biomolekyler, og er velkjente for fagmannen på området, og anses å ligge innenfor rammen av oppfinnelsen. Slike teknikker er for eksempel beskrevet av Tijssen, "Practice and theory of enzyme immuno assays", Burden, RH og von Knippenburg (red.), bind 15 (1985), "Basic methods in molecular biology"; Davis LG, Dibmer MD; 25 Battey Elsevier (1990), Mayer et al., (red.) "Immunochemical methods in cell and molecular biology" Academic Press, London (1987), eller i serien "Methods in Enzymology", Academic Press, Inc.
- 30 Det er mange forskjellige markører og fremgangsmåter for merking som er velkjente for fagmannen. Eksempler på typene markører som kan anvendes ifølge oppfinnelsen, er enzymer, radioisotoper, kolloide metaller, fluorescente forbindelser, kjemiluminescente forbindelser og bioluminescente forbindelser.
- 35 Vanlig anvendte markører omfatter blant annet fluorokromer (som fluorescein, rodamin, Texasrødt etc.), enzymer (som pepperotperoksidase,  $\beta$ -galaktosidase, alkalisk fosfatase), radioaktive isotoper (som  $^{32}\text{P}$  eller  $^{125}\text{I}$ ), biotin, digoksygenin, kolloide metaller, kjemi-

eller bioluminesente forbindelser (som dioksetaner, luminol eller akridiner).  
Merkingsprosedyrer er på samme måte som kovalent kobling av enzymer eller biotinylgrupper, ioderinger, fosforyleringer, biotinyleringer osv., velkjente i teknikken.

- 5 Påvisningsfremgangsmåter omfatter, men er ikke begrenset til autoradiografi, fluorescens mikroskopi, direkte og indirekte enzymatiske reaksjoner osv. Vanlig anvendte påvisningsanalyser omfatter radioisotopiske eller ikke-radioisotopiske fremgangsmåter. Disse omfatter blant annet Western blotting, overlappanalyse, RIA (radioimmunoanalyse) og IRMA (immun radioimmunometrisk analyse), EIA (enzymimmunoanalyse), ELISA (enzymkoblet immunosorbentanalyse), FIA (fluorescent immunoanalyse), og CLIA (kjemoluminescent immunoanalyse).

Videre tilveiebringer foreliggende oppfinnelse anvendelse av et antistoffmolekyl ifølge oppfinnelsen, eller et antistoffmolekyl fremstilt ved oppfinnelsens fremgangsmåte av et nukleinsyremolekyl, en vektor eller en vert ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et farmasøytisk eller et diagnostisk preparat for forebygging, behandling og/eller diagnose av en sykdom assosiert med amyloid genese og/eller amyloid plakkdannelse.  
Det er videre foretrukket forbindelsene, som beskrevet her, særlig antistoffmolekylene ifølge oppfinnelsen, anvendes for fremstilling av farmasøytiske preparater for forebygging og/eller behandling av neuropatologier assosiert med modifisert eller anormal APP-prosessering og/eller amyloidogenese.

Oppfinnelsen angår også anvendelse av et antistoffmolekyl ifølge oppfinnelsen, eller et antistoffmolekyl fremstilt ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et farmasøytisk preparat for disintegrasjon av  $\beta$ - amyloide plakk og et farmasøytisk preparat omfattende et antistoffmolekyl ifølge oppfinnelsen, eller et antistoffmolekyl fremstilt ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen for anvendelse i disintegrasjonen av  $\beta$ - amyloide plakk.

Oppfinnelsen angår også anvendelse av et antistoffmolekyl ifølge oppfinnelsen, eller et antistoffmolekyl fremstilt ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et farmasøytisk preparat for passiv immunisering mot  $\beta$ -amyloide plakk dannelse, og et farmasøytisk preparat omfattende et antistoffmolekyl ifølge oppfinnelsen, eller et antistoffmolekyl fremstilt ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen for anvendelse i passiv immunisering mot  $\beta$ -amyloide plakk dannelse.

Antistoffmolekylene, for eksempel i form av (konstruerte) immunglobuliner som antistoffer i et IgG-rammeverk, særlig et IgG1-rammeverk eller i format av kimære antistoffer, bispesifikke antistoffer, enkeltkjede Fv'er (scFV'er) eller bispesifikke scFv'er og liknende, anvendes ved fremstilling av de her beskrevne farmasøytiske preparatene. Videre er antistoffmolekylene også nyttige ved diagnostiske prosedyrer, som dokumentert i de vedlagte eksempler, fordi antistoffmolekylene ifølge oppfinnelsen spesifikt interagerer med/påviser A $\beta$ 4 og/eller amyloide avsetninger/plakk. Derfor er en oppfinnisk anvendelse av forbindelsene ifølge oppfinnelsen, anvendelsen for fremstilling av et farmasøytisk preparat mot en neurologisk lidelse som krever lindring, for eksempel ved desintegrering av  $\beta$ -amyloid plakk, ved amyloid (plakk) klaring eller ved passiv immunisering mot  $\beta$ -amyloid plakkdannelse. Som illustrert i de vedlagte eksempler er oppfinnelsens antistoffmolekyler spesielt nyttige ved prevensjon av A $\beta$ -aggregering og ved depolymerisering av allerede dannede amyloidaggregater. I henhold til dette er oppfinnelsens antistoffer for anvendelse ved reduksjon av patologisk amyloidavsetninger/plakk, ved klaring av amyloid plakk/plakk forløpere, så vel som i neuronal beskyttelse. Det er spesielt tatt sikte på antistoffmolekylene ifølge oppfinnelsen benyttes ved *in vivo* prevensjon av amyloid plakk, så vel som ved *in vivo* klaring av preeksisterende amyloidplakk/avsetninger. Videre kan antistoffmolekylene ifølge oppfinnelsen benyttes i passive immuniseringshandlinger mot A $\beta$ 4. Klaring av A $\beta$ 4/A $\beta$ 4-avsetninger kan blant annet oppnås ved den medisinske anvendelse av antistoffer ifølge oppfinnelsen som omfatter en Fc-del. Nevnte Fc-del av et antistoff kan være spesielt nyttig ved Fc-reseptormedierte immunresponer, for eksempel tiltrekning av makrofager (fagocytiske celler og/eller mikroglia) og/eller hjelperceller. For mediering av Fc-del-relaterte immunresponer er antistoffmolekylet ifølge oppfinnelsen fortrinnsvis i et (humant) IgG1-rammeverk. Som diskutert her er de foretrukne individer for behandling med oppfinnelsens antistoffmolekyler, nukleinsyremolekylene som koder de samme eller deler derav, vektorene ifølge oppfinnelsen eller vertscellene ifølge oppfinnelsen, et humant individ. Andre rammeverk, som IgG2a- eller IgG2b-rammeverk for oppfinnelsens antistoffmolekyler, er det også tatt sikte på. Immunglobulinrammeverk i IgG2a- og IgG2b-formatet er spesielt tatt sikte i museoppsett, for eksempel ved vitenskapelige anvendelser av oppfinnelsens antistoffmolekyler, for eksempel i tester på transgene mus som uttrykker (humant) villtype- eller muterte APP, APP-fragmenter og/eller A $\beta$ 4.

De ovenfor angitte sykdommer assosiert med amyloidogenese og/eller amyloid plakkdannelse omfatter, men er ikke begrenset til demens, Alzheimers sykdom, motor neuropati, Parkinson's sykdom, ALS (amyotrofisk lateral sklerose), scrapie, HIV-

relatert demens så vel som Creutzfeldt Jacobs sykdom, arvelig cerebral hemorragi med amyloidosis av hollandsk type, Down's syndrom og aldersrelaterte neuronale lidelser. Antistoffmolekylene ifølge oppfinnelsen og preparatene som tilveiebringes her, kan også være nyttige ved lindring eller prevensjon av inflammatoriske prosesser i forbindelse med amyloidogenese og/eller amyloid plakkdannelse.

Videre kan det frembringes et sett omfattende minst ett antistoffmolekyl, minst ett nukleinsyremolekyl, minst én vektor eller minst én vertscelle ifølge oppfinnelsen. Fortrinnsvis kan settet videre omfatte evt. en eller flere buffere, lagringsoppløsninger og/eller ytterligere reagenser eller materialer som kreves for gjennomføring av medisinske, vitenskapelige eller diagnostiske analyser og formål. Videre kan deler av settet være pakket individuelt i ampuller eller flasker eller i kombinasjoner i beholdere eller multibeholderenheter.

Settet kan fordelaktig blant annet benyttes ved ulike anvendelser, som nevnt her, for eksempel som diagnostiske sett, som forskningsverktøy eller medisinske verktøy. I tillegg kan settet ifølge oppfinnelsen inneholde midler for påvisning egnet for vitenskapelige, medisinske og diagnostiske formål. Fremstillingen av settene følger fortrinnsvis standard prosedyrer som er velkjent i fagfeltet.

20

Optimalisering av et antistoffmolekyl, som definert kan omfatte trinnene

- (a) å konstruere et bibliotek av diversifiserte Fab-aminosyrefragmenter avledet fra et antistoff omfattende minst én CDR3 av et  $V_H$ -område som kodes av et nukleinsyremolekyl som vist i SEKV. ID nr. 21, 23 eller 25, eller minst én CDR3-aminosyresekvens av et  $V_H$ -område som vist i SEKV. ID nr. 22, 24 eller 26;
- (b) å teste de resulterende Fab-optimaliseringsbibliotek ved panning mot  $A\beta/A\beta_4$ ;
- (c) å identifisere optimaliserte kloner; og
- (d) å uttrykke valgte optimaliserte kloner.

30

Optimalisering av antistoffene/antistoffmolekylene ifølge oppfinnelsen er også dokumentert i de vedlagte eksempler, og kan omfatte valg for eksempel for høyere affinitet for én eller begge områder/epitoper av  $\beta$ -A4, som definert her, eller valg for forbedret ekspresjon og liknende. I en utførelsesform omfatter valget for høyere affinitet for én eller begge områder/epitoper av  $\beta$ A4 valg for høyere affinitet til (a) et aminosyrestrekk omfattende aminosyrer 2 til 10 (eller en eller flere deler derav) av  $\beta$ -A4

35

og/eller (b) et aminosyrestrekk omfattende aminosyrer 12 til 25 (eller en eller flere deler derav) av  $\beta$ -A4 (SEKV. ID nr. 27).

Fagmannen på området kan lett utøve oppfinnelsen ved å anvende oppfinnelsens lære.  
 5 Optimaliseringsprotokoller for antistoffer er velkjent i fagfeltet. Disse optimaliseringsprotokoller omfatter blant annet CDR walking mutagenese som beskrevet og illustrert her, og beskrevet hos Yang (1995), J. Mol. Biol. 25, 392-403; Schier (1996), J. Mol. Biol. 263, 551-567; Barbas (1996), Trends. Biotech 14, 230-34 eller Wu (1998), PNAS 95, 6037-6042; Schier (1996), Human Antibodies Hybridomas  
 10 7, 97; Moore (1997), J. Mol. Biol. 272, 336.

”Panning”-teknikker er også kjent, se for eksempel Kay (1993), Gene 128, 59-65. Videre gir publikasjoner som Borrebaeck (1995), ”Antibody Engineering”, Oxford University, 229-266; McCafferty (1996), ”Antibody Engineering”, Oxford  
 15 University Press; Kay (1996), A Laboratory Manual, Academic Press optimaliseringsprotokoller som kan modifiseres i henhold til oppfinnelsen.

Optimaliseringsfremgangsmåten kan videre omfatte et trinn (ca) der de optimaliserte kloner optimaliseres ytterligere ved kassettmutagenese, som vist i de vedlagte eksempler.  
 20

Fremgangsmåten for optimalisering av et antistoffmolekyl som beskrevet her er videre illustrert i de vedlagte eksempler som affinitetsmodning av parentale antistoffer/antistoffmolekyler i stand til spesifikt å gjenkjenne to områder av  $\beta$ -A4 peptidet/A $\beta$ 4/A $\beta$ /A $\beta$ 4/ $\beta$ A4.  
 25

Fortrinnsvis er nevnte A $\beta$ /A $\beta$ 4 (også betegnet som  $\beta$ A4 i oppfinnelsens kontekst) i trinn (b) i fremgangsmåten, som beskrevet ovenfor, aggregert A $\beta$ /A $\beta$ 4. Nevnte panning kan gjennomføres (som beskrevet i de vedlagte eksempler) med øket stringens for binding. Stringensen kan økes blant annet ved å redusere A $\beta$ /A $\beta$ 4-konsentrasjonen eller ved å  
 30 forhøye (analyse) temperaturen. Testing av det optimaliserte bibliotek ved panning er velkjent for fagmannen og beskrevet av Kay (1993), loc. cit. Fortrinnsvis gjennomføres identifiseringen i trinn (c) ved rangering i henhold til de laveste  $K_D$ -verdiene.

Mest foretrukket blir identifiseringen i trinn (c) gjennomført ved «koff-rangering».  
 35 «Koff-rangering» er kjent for fagmannen og beskrevet av Schier (1996), loc. cit.; Schier (1996), J. Mol. Biol. 255, 28-43 eller Duenas (1996), Mol. Immunol. 33, 279-286.

Videre er «koff-rangering» illustrert i de vedlagte eksempler. Off-hastighetskonstanten kan måles som beskrevet i de vedlagte eksempler.

Som nevnt ovenfor kan de identifiserte kloner uttrykkes for ytterligere evaluering.

5 Ekspresjonen kan gjennomføres på en i og for seg kjent måte, blant annet som vist i de vedlagte eksempler. Ekspresjonen kan blant annet føre til uttrykte Fab-fragmenter, scFv'er, bispesifikke immunglobuliner, bispesifikke antistoffmolekyler, Fab- og/eller Fv-fusjonsproteiner, eller fulle antistoffer, som IgG'er, særlig IgG1.

10 Optimaliserte antistoffer og særlig optimaliserte Fab'er eller optimaliserte IgG'er, fortrinnsvis IgG1'er, kan testes ved fremgangsmåter som vist i de vedlagte eksempler. Slike fremgangsmåter omfatter, men er ikke begrenset til testing av bindingsaffiniteter, bestemmelsen av  $K_D$ -verdier, pepspotanalyser, ELISA-analyser, RIA-analyser, CLIA-analyser, (immuno-) histologiske studier (for eksempel farging av amyloide plakk),  
 15 depolymeriseringsanalyser eller antistoffavhengige  $\beta$ -A4 fagocytoser.

Optimaliserte antistoffer kan fremstilles ved krysskloning. Denne fremgangsmåte er også illustrert i de vedlagte eksempler og omfatter kombinerende av uavhengig optimaliserte CDR-områder, for eksempel ved å kombinere uavhengig optimaliserte H-  
 20 CDR2 og L-CDR2 fra modne kloner med H-CDR3, fortrinnsvis den samme H-CDR3.

Et farmasøytisk preparat kan fremstilles ved en fremgangsmåte omfattende trinnene

- (a) å optimalisere et antistoff i henhold til fremgangsmåten beskrevet her og illustrert i de vedlagte eksempler; og
- 25 (b) å formulere det optimaliserte antistoff/antistoffmolekyl med en fysiologisk akseptabel bærer, som beskrevet ovenfor.

Således tilveiebringes et farmasøytisk preparat fremstilt ved ovennevnte fremgangsmåte, og omfatter ytterligere optimaliserte antistoffmolekyler som spesifikt er i stand til å gjenkjenne to områder av  $\beta$ -A4 peptidet/Abeta4/A $\beta$ /A4 $\beta$ / $\beta$ A4, som  
 30 beskrevet ovenfor.

#### **Eksemplifiserte sekvenser som angitt her:**

SEKV. ID nr. 1

35 AEFRHDSGY

Første område av  $\beta$ -A4 peptid, "N-terminal-område/epitop"

SEKV. ID nr. 2

VHHQKLVFFAEDVG

Andre område av  $\beta$ -A4 peptid, ”Sentral/midtområde/epitop”

5 SEKV. ID nr. 3

V<sub>H</sub>-område av MS-Roche#3 (nukleinsyresekvens)

CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAG  
 CCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCGATG  
 AGCTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGCGATT  
 10 AGCGGTAGCGGCGGCAGCACCTATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTT  
 ACCATTTACGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGC  
 CTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTCTTACTCATTATG  
 CTCGTTATTATCGTTATTTTGTGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGT  
 TAGCTCAGC (SEKV. ID nr. 3)

15

SEKV. ID nr. 4

V<sub>H</sub>-område av MS-Roche#3 (aminosyresekvens)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISG  
 SGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTHYARY  
 20 YRYFDVWGQGLVTVSS (SEKV. ID nr. 4)

SEKV. ID nr. 5

V<sub>H</sub>-område av MS-Roche#7 (nukleinsyresekvens)

CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAG  
 25 CCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCGATG  
 AGCTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGCGATT  
 AGCGGTAGCGGCGGCAGCACCTATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTA  
 CCATTTACGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCT  
 GCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTAAGGGTAATAC  
 30 TCATAAGCCTTATGGTTATGTTTCGTTATTTTGTGTTTGGGGCCAAGGCACC  
 CTGGTGACGGTTAGCTCAGC (SEKV. ID nr. 5)

SEKV. ID nr. 6

V<sub>L</sub>-område av MS-Roche#7 (aminosyresekvens)

35 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISG  
 SGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKGNTHK  
 PYGYVRYFDVWGQGLVTVSS (SEKV. ID nr. 6)

## SEKV. ID nr. 7

V<sub>H</sub>-område av MS-Roche#8 (nukleinsyresekvens)

CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAG  
 CCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCGATG  
 5 AGCTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGCGATT  
 AGCGGTAGCGGCGGCAGCACCTATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTT  
 ACCATTTACGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGC  
 CTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTCTTCTTTCTCGTG  
 GTTATAATGGTTATTATCATAAGTTTGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGT  
 10 GACGGTTAGCTCAGC (SEKV. ID nr. 7)

## SEKV. ID nr. 8

V<sub>H</sub>-område av MS-Roche#8 (aminosyresekvens)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISG  
 15 SGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLLSRGYNG  
 YYHKFDVWGQGLVTVSS (SEKV. ID nr. 8)

## SEKV. ID nr. 9

V<sub>L</sub>-område av MS-Roche#3 (nukleinsyresekvens)

20 GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCCGGGCGAA  
 CGTGCGACCCTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGAGCGTGAGCAGCAGCTATCTG  
 GCGTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAAGCACCGCGTCTATTAATTTATGGC  
 GCGAGCAGCCGTGCAACTGGGGTCCCGGCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCC  
 GGCACGGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTGCG  
 25 GTTTATTATTGCCAGCAGGTTTATAATCCTCCTGTTACCTTTGGCCAGGGTAC  
 GAAAGTTGAAATTAACGTACG (SEKV. ID nr. 9)

## SEKV. ID nr. 10

V<sub>L</sub>-område av MS-Roche #3 (aminosyresekvens)

30 DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR  
 ATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQVYNPPVTFGQGTKVEIKRT  
 (SEKV. ID nr. 10)

## SEKV. ID nr. 11

35 V<sub>L</sub>-område av MS-Roche#7 (nukleinsyresekvens)

GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCCGGGCGAA  
 CGTGCGACCCTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGAGCGTGAGCAGCAGCTATCTG

GCGTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAAGCACCGCGTCTATTAATTTATGGC  
 GCGAGCAGCCGTGCAACTGGGGTCCCGGCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCC  
 GGCACGGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTGCG  
 ACTTATTATTGCTTTCAGCTTTATTCTGATCCTTTTACCTTTGGCCAGGGTAC  
 5 GAAAGTTGAAATTAACGTACG (SEKV. ID nr. 11)

SEKV. ID nr. 12

V<sub>L</sub>-område av MS-Roche#7 (aminosyresekvens)

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR  
 10 ATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYCFQLYSDPFTFGQGTKVEIKRT  
 (SEKV. ID nr. 12)

SEKV. ID nr. 13

V<sub>L</sub>-område av MS-Roche#8 (nukleinsyresekvens)

15 GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCCGGGCGAA  
 CGTGCGACCCTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGAGCGTGAGCAGCAGCTATCTG  
 GCGTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAAGCACCGCGTCTATTAATTTATGGC  
 GCGAGCAGCCGTGCAACTGGGGTCCCGGCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCC  
 GGCACGGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTGCG  
 20 ACTTATTATTGCCAGCAGCTTTCTTCTTTTCCTCCTACCTTTGGCCAGGGTAC  
 GAAAGTTGAAATTAACGTACG (SEKV. ID nr. 13)

SEKV. ID nr. 14

V<sub>L</sub>-område av MS-Roche#8 (aminosyresekvens)

25 DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR  
 ATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYCQQLSSFPPTFGQGTKVEIKRT  
 (SEKV. ID nr. 14)

SEKV. ID nr. 15

30 CDR3 av V<sub>L</sub>-område av MSR-3 (nukleinsyresekvens)

CAGCAGGTTTATAATCCTCCTGTT

(SEKV. ID nr. 15)

SEKV. ID nr. 16

35 CDR3 av V<sub>L</sub>-område av MSR-3 (aminosyresekvens)

QQVYNPPV (SEKV. ID nr. 16)

SEKV. ID nr. 17

CDR3 av V<sub>L</sub>-område av MSR-7 (nukleinsyresekvens)

TTTCAGCTTTATTCTGATCCTTTT

(SEKV. ID nr. 17)

5

SEKV. ID nr. 18

CDR3 av V<sub>L</sub>-område av MSR-7 (aminosyresekvens)

FQLYSDPF (SEKV. ID nr. 18)

10 SEKV. ID nr. 19

CDR3 av V<sub>L</sub>-område av MSR-8 (nukleinsyresekvens)

CAGCAGCTTTCTTCTTTTCCTCCT

(SEKV. ID nr. 19)

15 SEKV. ID nr. 20

CDR3 av V<sub>L</sub>-område av MSR-8 (aminosyresekvens)

QQLSSFPP (SEKV. ID nr. 20)

SEKV. ID nr. 21

20 CDR av V<sub>H</sub>-område av MSR-3 (nukleinsyresekvens)

CTTACTCATTATGCTCGTTATTATCGTTATTTTGATGTT

(SEKV. ID nr. 21)

SEKV. ID nr. 22

25 CDR av V<sub>H</sub>-område av MSR-3 (aminosyresekvens)

LTHYARYYRYFDV (SEKV. ID nr. 22)

SEKV. ID nr. 23

CDR av V<sub>H</sub>-område av MSR-7 (nukleinsyresekvens)

30 GGTAAGGGTAATACTCATAAGCCTTATGGTTATGTTTCGTTATTTTGATGTT

(SEKV. ID nr. 23)

SEKV. ID nr. 24

CDR av V<sub>H</sub>-område av MSR-7 (aminosyresekvens)

35 GKGNTHKPYGYVRYFDV (SEKV. ID nr. 24)

SEKV. ID nr. 25

CDR av V<sub>H</sub>-område av MSR-8 (nukleinsyresekvens)

CTTCTTTCTCGTGGTTATAATGGTTATTATCATAAGTTTGATGTT

(SEKV. ID nr. 25)

5

SEKV. ID nr. 26

CDR av V<sub>H</sub>-område av MSR-8 (aminosyresekvens)

LLSRGYNGYYHKFDV (SEKV. ID nr. 26)

10 SEKV. ID nr. 27 A $\beta$ 4 (aminosyrer 1 til 42)

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

(SEKV. ID nr. 27)

SEKV. ID nr. 28 primer

15 5'-GTGGTGGTTCCGATATC-3' (SEKV. ID nr. 28)

SEKV. ID nr. 29 primer

5'-AGCGTCACACTCGGTGCGGCTTTCGGCTGGCCAAGAACGGTTA-3'

(SEKV. ID nr. 29)

20

SEKV. ID nr. 30 primer

5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' (SEKV. ID nr. 30)

SEKV. ID nr. 31 primer

25 5'-TACCGTTGCTCTTCACCCC-3' (SEKV. ID nr. 31)

SEKV. ID nr. 32 V<sub>H</sub> av MS-Roche#3.6H5 x 3.6L2; DNA; kunstig sekvens

CAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGT

CGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCGATGAGCTGGGT

30 GCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGCTATTTCTGAGTC

TGGTAAGACTAAGTATTATGCTGATTCTGTAAAGGGTCGTTTTACCATTTC

CGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCG

GAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTCTTACTCATTATGCTCGTTATT

ATCGTTATTTT GATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA

35 (SEKV. ID nr. 32)

SEKV. ID nr. 33: prot V<sub>H</sub>-område av MS-Roche#3.6H5 x 3.6L2; protein/1; kunstig  
sekvens

QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISESG  
KTKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTHYARYYR  
5 YFDVWGQGTLLVTVSS (SEKV. ID nr. 33)

SEKV. ID nr. 34 V<sub>H</sub>-område av MS-Roche#3.6H8 x 3.6L2; DNA; kunstig sekvens

CAATTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGT  
CTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCGATGAGCTGGG  
10 TGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGCTATTTCTGAGT  
ATTCTAAGTTTAAGTATTATGCTGATTCTGTAAAGGGTCGTTTTACCATTTCA  
CGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCG  
GAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTCTTACTCATTATGCTCGTTATT  
ATCGTTATTTGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTCA  
15 (SEKV. ID nr. 34)

SEKV. ID nr. 35 prot V<sub>H</sub>-område av MS-Roche#3.6H8 x 3.6L2; protein/1; kunstig  
sekvens

QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISEYS  
20 KFKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTHYARYYR  
YFDVWGQGTLLVTVSS (SEKV. ID nr. 35)

SEKV. ID nr. 36 V<sub>H</sub>-område av MS-Roche#7.4H2 x 7.2L1; DNA; kunstig sekvens

CAATTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGT  
25 CTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCGATGAGCTGGG  
TGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGCTATTAATTATA  
ATGGTGCTCGTATTTATTATGCTGATTCTGTAAAGGGTCGTTTTACCATTTCA  
CGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCG  
GAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTAAGGGTAATACTCATAAG  
30 CCTTATGGTTATGTTTCGTTATTTTATGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGA  
CGGTTAGCTCA  
(SEKV. ID nr. 36)

SEKV. ID nr. 37 prot V<sub>H</sub>-område av MS-Roche#7.4H2x 7.2L1; protein/1; kunstig

35 sekvens

QLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINYN  
 GARIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKGNTHKP  
 YGYVRYFDVWGQGLVTVSS (SEKV. ID nr. 37)

5 SEKV. ID nr. 38 V<sub>H</sub>-område av MS-Roche#7.9H2 x 7.12 L2; DNA; kunstig sekvens  
 CAATTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGT  
 CTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCGATGAGCTGGG  
 TGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGCTATTAATGCTG  
 ATGGTAATCGTAAGTATTATGCTGATTCTGTAAAGGGTCGTTTTACCATTTC  
 10 ACGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGC  
 GGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTAAGGGTAATACTCATAA  
 GCCTTATGGTTATGTTTCGTTATTTTGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTG  
 ACGGTTAGCTCA (SEKV. ID nr. 38)

15 SEKV. ID nr. 39 prot V<sub>H</sub>-område av MS-Roche#7.9H2 x 7.12L2; protein/1; kunstig  
 sekvens  
 QLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINAD  
 GNRKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKGNTHKP  
 YGYVRYFDVWGQGLVTVSS (SEKV. ID nr. 39)

20 SEKV. ID nr. 40 V<sub>H</sub>-område av MS-Roche#7.9H4 x 7.12L2; DNA; kunstig sekvens  
 CAATTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGT  
 CTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCGATGAGCTGGG  
 TGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGCTATTAATGCTG  
 25 TTGGTATGAAGAAGTTTTATGCTGATTCTGTAAAGGGTCGTTTTACCATTTC  
 CGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGC  
 GAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTAAGGGTAATACTCATAAG  
 CCTTATGGTTATGTTTCGTTATTTTGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGA  
 CGGTTAGCTCA (SEKV. ID nr. 40)

30 SEKV. ID nr. 41 prot V<sub>H</sub>-område av MS-Roche#7.9H4 x 7.12L2; protein/1; kunstig  
 sekvens  
 QLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINA  
 VGMKKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKGNTHK  
 35 PYGYVRYFDVWGQGLVTVSS (SEKV. ID nr. 41)

SEKV. ID nr. 42 V<sub>H</sub>-område av MS-Roche#7.11H1 x 7.11L1; DNA; kunstig sekvens  
 CAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGT  
 CTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCGATGAGCTGGG  
 TGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATTAATGCTG  
 5 CTGGTTTTTCGTA CTTATTATGCTGATTCTGTTAAGGGTCGTTTTACCATTTC  
 CGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCG  
 GAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTAAGGGTAATACTCATAAG  
 CCTTATGGTTATGTTTCGTTATTTTGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGA  
 CGGTTAGCTCA (SEKV. ID nr. 42)

10

SEKV. ID nr. 43 prot V<sub>H</sub>-område av MS-Roche#7.11H1 x 7.11L1; protein/1; kunstig  
 sekvens

QLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGINAA  
 GFRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKGNTHKP  
 15 YGYVRYFDVWGQGLVTVSS (SEKV. ID nr. 43)

SEKV. ID nr. 44 V<sub>H</sub>-område av MS-Roche#7.11H1 x 7.2L1; DNA; kunstig sekvens  
 CAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGT  
 CTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCGATGAGCTGGG  
 20 TGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATTAATGCTG  
 CTGGTTTTTCGTA CTTATTATGCTGATTCTGTTAAGGGTCGTTTTACCATTTC  
 CGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCG  
 GAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTAAGGGTAATACTCATAAG  
 CCTTATGGTTATGTTTCGTTATTTTGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGA  
 25 CGGTTAGCTCA (SEKV. ID nr. 44)

SEKV. ID nr. 45 prot V<sub>H</sub>-område av MS-Roche#7.11H1 x 7.2L1; protein/1; kunstig  
 sekvens

QLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGINAA  
 30 GFRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKGNTHKP  
 YGYVRYFDVWGQGLVTVSS (SEKV. ID nr. 45)

SEKV. ID nr. 46 V<sub>L</sub>-område av MS-Roche#3.6H5 x 3.6L2; DNA; kunstig sekvens  
 GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCCGGGCGAA  
 35 CGTGCGACCCTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGTTTCTTTCTCGTTATTATCTGG  
 CGTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAAGCACCGCGTCTATTAATTTATGGCG  
 CGAGCAGCCGTGCAACTGGGGTCCCGGCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCG

GCACGGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTGCGGT  
 TTATTATTGCCAGCAGACTTATAATTATCCTCCTACCTTTGGCCAGGGTACG  
 AAAGTTGAAATTAACGTACG (SEKV. ID nr. 46)

- 5 SEKV. ID nr. 47 prot V<sub>L</sub>-område av MS-Roche#3.6H5 x 3.6L2; protein/1; kunstig  
 sekvens

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFLSRYYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR  
 ATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQTYNYPPTFGQGTKVEIKRT  
 (SEKV. ID nr. 47)

10

- SEKV. ID nr. 48 V<sub>L</sub>-område av MS-Roche#3.6H8 x 3.6L2; DNA; kunstig sekvens

GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCCGGGCGAA  
 CGTGCGACCCTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGTTTCTTTCTCGTTATTATCTGG  
 CGTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAAGCACCGCGTCTATTAATTTATGGCG  
 15 CGAGCAGCCGTGCAACTGGGGTCCCGGCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCG  
 GCACGGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTGCGGT  
 TTATTATTGCCAGCAGACTTATAATTATCCTCCTACCTTTGGCCAGGGTACG  
 AAAGTTGAAATTAACGTACG (SEKV. ID nr. 48)

- 20 SEKV. ID nr. 49 prot V<sub>L</sub>-område av MS-Roche#3.6H8 x 3.6L2; protein/1; kunstig  
 sekvens

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFLSRYYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASS  
 RATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQTYNYPPTFGQGTKVEIKR  
 T (SEKV. ID nr. 49)

25

- SEKV. ID nr. 50 V<sub>L</sub>-område av MS-Roche#7.4H2 x 7.2L1; DNA; kunstig sekvens

GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCCGGGCGAA  
 CGTGCGACCCTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGTATGTTGATCGTACTTATCTGG  
 CGTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAAGCACCGCGTCTATTAATTTATGGCG  
 30 CGAGCAGCCGTGCAACTGGGGTCCCGGCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCG  
 GCACGGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTGCGAC  
 TTATTATTGCCAGCAGATTTATTCTTTTCCTCATACTTTGGCCAGGGTACGA  
 AAGTTGAAATTAACGTACG (SEKV. ID nr. 50)

- 35 SEKV. ID nr. 51 prot V<sub>L</sub>-område av MS-Roche#7.4H2 x 7.2L1; protein/1; kunstig  
 sekvens

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQYVDRTYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASS  
 RATGVPARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFATYYCQQIYSPHTFGQGTKVEIKRT  
 (SEKV. ID nr. 51)

5 SEKV. ID nr. 52 V<sub>L</sub>-område av MS-Roche#7.9H2 x 7.12L2; DNA; kunstig sekvens  
 GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCCGGGCGAA  
 CGTGCGACCCTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGCGTTTTTTTTATAAGTATCTGG  
 CGTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAAGCACCGCGTCTATTAATTTCTGGTTC  
 TTCTAACCGTGCAACTGGGGTCCCGGCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGC  
 10 ACGGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTGCGGTTT  
 ATTATTGCCTTCAGCTTTATAATATTCCTAATACCTTTGGCCAGGGTACGAA  
 AGTTGAAATTAACGTACG (SEKV. ID nr. 52)

SEKV. ID nr. 53 prot V<sub>L</sub>-område av MS-Roche#7.9H2 x 7.12L2; protein/1; kunstig  
 15 sekvens  
 DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQRFFYKYLAWYQQKPGQAPRLISGSSNR  
 ATGVPARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFAVYYCLQLYNIPNTFGQGTKVEIKRT  
 (SEKV. ID nr. 53)

20 SEKV. ID nr. 54 V<sub>L</sub>-område av MS-Roche#7.9H4 x 7.12L2; DNA; kunstig sekvens  
 GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCCGGGCGAA  
 CGTGCGACCCTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGCGTTTTTTTTATAAGTATCTGG  
 CGTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAAGCACCGCGTCTATTAATTTCTGGTTC  
 TTCTAACCGTGCAACTGGGGTCCCGGCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGC  
 25 ACGGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTGCGGTTT  
 ATTATTGCCTTCAGCTTTATAATATTCCTAATACCTTTGGCCAGGGTACGAA  
 AGTTGAAATTAACGTACG (SEKV. ID nr. 54)

SEKV. ID nr. 55 prot V<sub>L</sub>-område av MS-Roche#7.9H4 x 7.12L2; protein/1; kunstig  
 30 sekvens  
 DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQRFFYKYLAWYQQKPGQAPRLISGSSNR  
 ATGVPARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFAVYYCLQLYNIPNTFGQGTKVEIKRT  
 (SEKV. ID nr. 55)

- SEKV. ID nr. 56 V<sub>L</sub>-område av MS-Roche#7.11H1 x 7.11L1; DNA; kunstig sekvens  
 GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCCGGGCGAA  
 CGTGCGACCCTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGCGTATTCTTCGTATTTATCTGG  
 CGTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAAGCACCGCGTCTATTAATTTATGGCG  
 5 CGAGCAGCCGTGCAACTGGGGTCCCGGCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCG  
 GCACGGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTGCGAC  
 TTATTATTGCCAGCAGGTTTATTCTCCTCCTCATACTTTGGCCAGGGTACGA  
 AAGTTGAAATTAACGTACG (SEKV. ID nr. 56)
- 10 SEKV. ID nr. 57 prot V<sub>L</sub>-område av MS-Roche#7.11H1 x 7.11L1; protein/1; kunstig  
 sekvens  
 DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQRILRIYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR  
 ATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYCQQVYSPHFTFGQGTKVEIKRT  
 (SEKV. ID nr. 57)
- 15 SEKV. ID nr. 58 V<sub>L</sub>-område av MS-Roche#7.11H1 x 7.2L1; DNA; kunstig sekvens  
 GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCCGGGCGAA  
 CGTGCGACCCTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGTATGTTGATCGTACTTATCTGG  
 CGTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAAGCACCGCGTCTATTAATTTATGGCG  
 20 CGAGCAGCCGTGCAACTGGGGTCCCGGCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCG  
 GCACGGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTGCGAC  
 TTATTATTGCCAGCAGATTTATTCTTTTCCTCATACTTTGGCCAGGGTACGA  
 AAGTTGAAATTAACGTACG (SEKV. ID nr. 58)
- 25 SEKV. ID nr. 59 prot V<sub>L</sub>-område av MS-Roche#7.11H1 x 7.2L1; protein/1; kunstig  
 sekvens  
 DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQYVDRTYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASS  
 RATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYCQQIYSPHFTFGQGTKVEIKRT  
 (SEKV. ID nr. )
- 30 SEKV. ID nr. 60 HCDR3-område av MS-Roche#3.6H5 x 3.6L2; DNA; kunstig sekvens  
 CTTACTCATTATGCTCGTTATTATCGTTATTTTGTATGTT (SEKV. ID nr. 60)
- SEKV. ID nr. 61 prot HCDR3-område av MS-Roche#3.6H5 x 3.6L2; protein/1; kunstig  
 35 sekvens  
 LTHYARYYRYFDV (SEKV. ID nr. 61)

SEKV. ID nr. 62 HCDR3-område av MS-Roche#3.6H8 x 3.6L2; DNA; kunstig sekvens  
CTTACTCATTATGCTCGTTATTATCGTTATTTTGATGTT (SEKV. ID nr. 62)

SEKV. ID nr. 63 prot HCDR3-område av MS-Roche#3.6H8 x 3.6L2; protein/1; kunstig  
5 sekvens  
LTHYARYRYFDV (SEKV. ID nr. 63)

SEKV. ID nr. 64 HCDR3-område av MS-Roche#7.4H2 x 7.2L1; DNA; kunstig sekvens  
GGTAAGGGTAATACTCATAAGCCTTATGGTTATGTTCGTTATTTTGATGTT  
10 (SEKV. ID nr. 64)

SEKV. ID nr. 65 prot HCDR3-område av MS-Roche#7.4H2 x 7.2L1; protein/1; kunstig  
sekvens  
GKGNTHKPYGYVRYFDV (SEKV. ID nr. 65)

15 SEKV. ID nr. 66 HCDR3-område av MS-Roche#7.9H2 x 7.12L2; DNA; kunstig  
sekvens  
GGTAAGGGTAATACTCATAAGCCTTATGGTTATGTTCGTTATTTTGATGTT  
(SEKV. ID nr. 66)

20 SEKV. ID nr. 67 prot HCDR3-område av MS-Roche#7.9H2 x 7.12L2; protein/1;  
kunstig sekvens  
GKGNTHKPYGYVRYFDV (SEKV. ID nr. 67)

25 SEKV. ID nr. 68 HCDR3-område av MS-Roche#7.9H4 x 7.12L2; DNA; kunstig  
sekvens  
GGTAAGGGTAATACTCATAAGCCTTATGGTTATGTTCGTTATTTTGATGTT  
(SEKV. ID nr. 68)

30 SEKV. ID nr. 69 prot HCDR3-område av MS-Roche#7.9H4 x 7.12L2; protein/1;  
kunstig sekvens  
GKGNTHKPYGYVRYFDV (SEKV. ID nr. 69)

SEKV. ID nr. 70 HCDR3-område av MS-Roche#7.11H1 x 7.11L1; DNA; kunstig  
35 sekvens  
GGTAAGGGTAATACTCATAAGCCTTATGGTTATGTTCGTTATTTTGATGTT  
(SEKV. ID nr. 70)

- SEKV. ID nr. 71 prot HCDR3-område av MS-Roche#7.11H1 x 7.11L1; protein/1;  
kunstig sekvens  
GKGNTHKPYGYVRYFDV (SEKV. ID nr. 71)
- 5 SEKV. ID nr. 72 HCDR3-område av MS-Roche#7.11H1 x 7.2L1; DNA; kunstig  
sekvens  
GGTAAGGGTAATACTCATAAGCCTTATGGTTATGTTCGTTATTTTGATGTT  
(SEKV. ID nr. 72)
- 10 SEKV. ID nr. 73 prot HCDR3-område av MS-Roche#7.11H1 x 7.2L1; protein/1;  
kunstig sekvens  
GKGNTHKPYGYVRYFDV (SEKV. ID nr. 73)
- SEKV. ID nr. 74 LCDR3-område av MS-Roche#3.6H5 x 3.6L2; DNA; kunstig sekvens  
15 CAGCAGACTTATAATTATCCTCCT (SEKV. ID nr. 74)
- SEKV. ID nr. 75 prot LCDR3-område av MS-Roche#3.6H5 x 3.6L2; protein/1; kunstig  
sekvens  
QQTYNYP (SEKV. ID nr. 75)
- 20 SEKV. ID nr. 76 LCDR3-område av MS-Roche#3.6H8 x 3.6L2; DNA; kunstig sekvens  
CAGCAGACTTATAATTATCCTCCT (SEKV. ID nr. 76)
- SEKV. ID nr. 77 prot LCDR3-område av MS-Roche#3.6H8 x 3.6L2; protein/1; kunstig  
25 sekvens  
QQTYNYP (SEKV. ID nr. 77)
- SEKV. ID nr. 78 LCDR3-område av MS-Roche#7.4H2 x 7.2L1; DNA; kunstig sekvens  
CAGCAGATTTATTCTTTTCCTCAT (SEKV. ID nr. 78)
- 30 SEKV. ID nr. 79 prot LCDR3-område av MS-Roche#7.4H2 x 7.2L1; protein/1; kunstig  
sekvens  
QQIYSFPH (SEKV. ID nr. 79)
- 35 SEKV. ID nr. 80 LCDR3-område av MS-Roche#7.9H2 x 7.12L2; DNA; kunstig  
sekvens  
CTTCAGCTTTATAATATTCCTAAT (SEQ ID NO: 80)

SEKV. ID nr. 81 prot LCDR3-område av MS-Roche#7.9H2 x 7.12L2; protein/1;  
kunstig sekvens

LQLYNIPN (SEKV. ID nr. 81)

5 SEKV. ID nr. 82 LCDR3-område av MS-Roche#7.9H4 x 7.12L2; DNA; kunstig  
sekvens

CTTCAGCTTTATAATATTCCTAAT (SEKV. ID nr. 82)

SEKV. ID nr. 83 prot LCDR3-område av MS-Roche#7.9H4 x 7.12L2; protein/1;  
10 kunstig sekvens

LQLYNIPN (SEKV. ID nr. 83)

SEKV. ID nr. 84 LCDR3-område av MS-Roche#7.11H1 x 7.11L1; DNA; kunstig  
sekvens

15 CAGCAGGTTTATTCTCCTCCTCAT (SEKV. ID nr. 84)

SEKV. ID nr. 85 prot LCDR3-område av MS-Roche#7.11H1 x 7.11L1; protein/1;  
kunstig sekvens

QQVYSPPH (SEKV. ID nr. 85)

20

SEKV. ID nr. 86 LCDR3-område av MS-Roche#7.11H1 x 7.2L1; DNA; kunstig  
sekvens

CAGCAGATTTATTCTTTTCCTCAT (SEKV. ID nr. 86)

25 SEKV. ID nr. 87 prot LCDR3-område av MS-Roche#7.11H1 x 7.2L1; protein/1;  
kunstig sekvens

QQIYSFPH (SEKV. ID nr. 87)

SEKV. ID nr. 88 V<sub>H</sub>-område av MS-Roche#7.9H7; DNA; kunstig sekvens

30 CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCCGGTGGTGGCAACCGGGCGGCAGC  
CTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCGATG  
AGCTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGCTAT  
TAATGCTTCTGGTACTCGTACTTATTATGCTGATTCTGTAAAGGGTCGTTTTA  
CCATTTACGTGATAATTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCT  
35 GCGTGCGGAAGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTAAGGGTAATAC  
TCATAAGCCTTATGGTTATGTTTCGTTATTTTGATGTTTGGGGCCAAGGCACC  
CTGGTGACGGTTAGCTCA (SEKV. ID nr. 88)

SEKV. ID nr. 89 prot V<sub>H</sub>-område av MS-Roche#7.9H7; protein/1; kunstig sekvens  
 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI  
 NASGTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKGN  
 HKPYGYVRYFDVWGQGLVTVSS (SEKV. ID nr. 89)

5

SEKV. ID nr. 90 V<sub>L</sub>-område av MS-Roche#7.9H7; DNA; kunstig sekvens  
 GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCCGGGCGAA  
 CGTGCGACCCTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGAGCGTGAGCAGCAGCTATCTG  
 GCGTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAAGCACCGCGTCTATTAATTTATGGC  
 10 GCGAGCAGCCGTGCAACTGGGGTCCCGGCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCC  
 GGCACGGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTGCG  
 ACTTATTATTGCCTTCAGATTTATAATATGCCTATTACCTTTGGCCAGGGTAC  
 GAAAGTTGAAATTAACGTACG (SEKV. ID nr. 90)

15 SEKV. ID nr. 91 prot V<sub>L</sub>-område av MS-Roche#7.9H7; protein/1; kunstig sekvens  
 DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR  
 ATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFATYYCLQIYNMPITFGQGTKVEIKRT  
 (SEKV. ID nr. 91)

20 SEKV. ID nr. 92 HCDR3-område av MS-Roche#7.9H7; DNA; kunstig sekvens  
 GGTAAGGGTAATACTCATAAGCCTTATGGTTATGTTCGTTATTTTGATGTT  
 (SEKV. ID nr. 92)

SEKV. ID nr. 93 prot HCDR3-område av MS-Roche#7.9H7; protein/1; kunstig sekvens  
 25 GKGNTHKPYGYVRYFDV (SEKV. ID nr. 93)

SEKV. ID nr. 94 LCDR3-område av MS-Roche#7.9H7; DNA; kunstig sekvens  
 CTCAGATTTATAATATGCCTATT (SEKV. ID nr. 94)

30 SEKV. ID nr. 95 prot LCDR3-område av MS-Roche#7.9H7; protein/1; kunstig sekvens  
 LQIYNMPI (SEKV. ID nr. 95)

Ytterligere illustrerende sekvenser er vist i de vedlagte sekvenslister, og er også vist i  
 vedlagte tabeller, særlig tabellene 1, 8 og 10.

35

Figurene viser:

- Figur 1 **Sekvensoppsummering av "HuCAL"-Fab1-bibliotek**  
 Nummereringen er i henhold til VBASE bortsett fra gapet i VL $\lambda$  posisjon 9.  
 I VBASE er gapet satt til posisjon 10 (*Chothia et al., 1992*). I  
 5 sekvensoppsummeringen er alle CDR3-rester som ble holdt konstante  
 indikerte. Tilsvarende sekvenser som ble benyttet for HuCAL-Fab1-  
 biblioteket, kan finnes i de vedlagte sekvenslister.  
 A: aminosyresekvens  
 10 B: DNA-sekvens
- Figur 2 **Fab displayvektor "pMORPH" 18\_Fab**  
 Vektorkart og DNA-sekvens inkludert restriksjonssteder
- 15 Figur 3 **Fab ekspresjonsvektor "pMORPH" x 9\_Fab**  
 Vektorkart og DNA-sekvens inkludert restriksjonssteder
- Figur 4 **Sekvenser av de parentale Fab-fragmenter MS-Roche-3, MS-Roche-7  
 og MS-Roche 8**  
 20 A: aminosyresekvens  
 B: DNA-sekvens
- Figur 5 Indirekte immunfluoresens av amyloid plakk fra et kryostatsnitt av human  
 temporal cortex. Plakkene ble merket MS-R #3.2 Fab (øvre plater) og MS-R  
 25 #7.4 Fab (nedre plater) ved 20  $\mu\text{g/ml}$  (venstre plater) og 5  $\mu\text{g/ml}$  (høyre  
 plater) under stringente blokkeringsbetingelser. Bundet MS-R Fab ble påvist  
 ved geite-antihumant-Cy3.
- Figur 6 Indirekte immunfluoresens av amyloide plakk fra et kryostatsnitt av human  
 30 temporal cortex. Disse plakk ble merket med MS-R #3.3 IgG1 (øvre plater)  
 og MS-R #7.12 IgG1 (nedre plater) ved 0,05  $\mu\text{g/ml}$  (venstre plater) og 0,01  
 $\mu\text{g/ml}$  (høyre plater) under stringente blokkeringsbetingelser. Bundet MS-R  
 IgG1-antistoff ble påvist ved geite-antihumant (H+L)-Cy3.
- 35 Figur 7 Indirekte immunfluoresens av amyloide plakk fra et kryostatsnitt av human  
 temporal cortex ved anvendelse av antistoffer etter sluttaffinitetsmodning.  
 Disse plakk ble merket med MS-R #7.9.H7 IgG1 (MAB 31, topp plate),

MS-R #7.11.H1 x 7.2.L1 IgG1 (MAB 11, middel plate) og MS-R #3.4.H7, (bunn plate). Antistoffene ble anvendt ved 0,05 µg/ml (venstre plater) og 0,01 µg/ml (høyre plater) under stringente blokkeringsbetingelser. Bundet MS-R IgG1-antistoff ble påvist ved geite-antihumant (H+L)-Cy3.

5 Skala: 8,5 mm = 150 µm.

Figur 8 Polymeriseringsanalyse. Anti-Aβ-antistoffer forhindrer innarbeiding av biotinyleret Aβ i på forhånd dannede Aβ-aggregater.

10 Figur 9 De-polymeriseringsanalyse. Anti-Aβ-antistoffer induserer frigivning av biotinyleret Aβ fra aggregert Aβ.

Figur 10 *In vivo* dekorering av amyloide plakk i en APP/PS2-dobbeltransgen mus etter intravenøs injeksjon av 1 mg MS-Roche IgG #7.9.H2 x 7.12.L2. Etter tre dager ble musen perfusert med fosfatbufret saltoppløsning og avlivet. Nærværet av humant IgG bundet til amyloide plakk, ble påvist ved konfokal mikroskopi etter merking av kryostatsnitt fra frontal cortex med et geite-antihumant IgG-Cy3-konjugat (plate B). Det samme snitt ble motfarget med et anti-Aβ-musemonoklonalt antistoff (BAP-2-Alexa488-konjugat, plate A) for å visualisere amyloidplakkposisjonen. Individuelle røde (plate B) og grønne (plate A) kanaler, sammensmeltet bilde (plate D) og ko-lokaliserte (plate C) signaler er vist.

15 Skala: 1 cm = 50 µm.

25 Figur 11 *In vivo* dekorering av amyloidplakk i en APP/PS2-dobbeltransgen mus etter intravenøs injeksjon av 1 mg MS-Roche IgG #7.9.H4 x 7.12.L2.

Forsøksbetingelser og fargingsprosedyren var identisk med det beskrevet i forklaringen til figur 10.

Skala: 1,6 cm = 50 µm.

30

Figur 12 *In vivo* dekorering av amyloidplakk i en APP/PS2-dobbeltransgen mus etter intravenøs injeksjon av 1 mg MS-Roche IgG #7.11.H1 x 7.2.L1 (MAB 11). Forsøksbetingelser og fargingsprosedyren var identisk med det beskrevet i forklaringen til figur 10.

35 Skala: 1,4 cm = 70 µm.

Figur 13 *In vivo* dekorering av amyloidplakk i en APP/PS2-dobbeltransgen mus etter intravenøs injeksjon av 2 mg MS-Roche IgG #7.9.H7 (MAB 31) på dag 0, 3 og 6. Etter 9 dager ble musen perfusert med fosfatbufret saltoppløsning og avlivet. Nærværet av humant IgG bundet til amyloide plakk, ble påvist ved konfokal mikroskopi etter merking av kryostatsnitt fra frontal cortex med et geite-antihumant IgG-Cy3-konjugat (plate B). Det samme snitt ble motfarget med et anti-A $\beta$ -musemonoklonalt antistoff (BAP-2-Alexa488-konjugat, plate A) for å visualisere amyloidplakkposisjonen. Individuelle røde (plate B) og grønne (plate A) kanaler, sammensmeltet bilde (plate D) og ko-lokaliserte (plate C) signaler er vist.

Skala: 1,6 cm = 80  $\mu$ m (platene A, B, C); 1,0 cm = 50  $\mu$ m (panel D)

Figur 14 *In vivo* dekorering av amyloidplakk i en APP/PS2-dobbeltransgen mus etter intravenøs injeksjon av 2 mg MS-Roche IgG #7.11.H1 x 7.2.L1 (MAB 11) på dag 0, 3 og 6. Forsøksbetingelser og fargingsprosedyren var identisk med det beskrevet i forklaringen til figur 13.

Skala: 1,6 cm = 80  $\mu$ m.

Figur 15 Bindingsanalyse av anti-A $\beta$ -antistoffer på celleoverflate APP. Antistoffbinding til humant APP-transfektete HEK293-celler og ikke-transfektete kontrollceller ble analysert ved strømningscytometri.

De følgende eksempler skal illustrere oppfinnelsen.

### Eksempel 1: Konstruksjon og screening av et humant kombinatorisk antistoffbibliotek ("HuCAL"-Fab 1)

#### *Kloning av "HuCAL"-Fab 1*

"HuCAL"-Fab 1 er et fullsyntetisk, modulært humanantistoff bibliotek i Fab antistoff-fragmentformat. "HuCAL"-Fab 1 ble sammensatt ved å starte med et antistoffbibliotek i enkeltkjedeformat ("HuCAL"-scFv; *Knappikk, (2000), J. Mol. Biol. 296, 57-86*).

*V $\lambda$ -posisjoner 1 og 2.* De opprinnelige "HuCAL"-mastergener ble konstruert med sine autentiske N-termini: VL $\lambda$ 1: QS (CAGAGC), VL $\lambda$ 2: QS (CAGAGC), og VL $\lambda$ 3: SY (AGCTAT). Sekvenser inneholdende disse aminosyrer er vist i WO 97/08320. Under "HuCAL"-bibliotekkonstruksjonen, ble de første to aminosyrer forandret til DI for å lette bibliotekkloning (*EcoRI*-sete). Alle "HuCAL"-bibliotekene inneholder VL $\lambda$ -gener med *EcoRV*-sete GATACT (DI) ved den 5' ende. Alle

”HuCAL”- $\kappa$ -gener (mastergener og alle gener i biblioteket) inneholder DI ved den 5’ ende (figur 1A og B).

*VH-posisjon 1.* De opprinnelige ”HuCAL”-mastergener ble konstruert med sine autentiske N-termini: VH1A, VH1B, VH2, VH4 og VH6 med Q (=CAG) som den første aminosyre og VH3 og VH5 med E (= GAA) som den første aminosyre. Sekvenser inneholdende disse aminosyrer er vist i WO 97/08320. Under kloningen av ”HuCAL”-Fab 1-biblioteket ble aminosyren i posisjon 1 av VH forandret til Q (CAG) i alle VH-gener (figur 1A og B).

#### 10 *Design av CDR-bibliotekene*

*V $\kappa$ 1/V $\kappa$ 3 posisjon 85.* Fordi kassetmutageneseprosedyren som ble benyttet for å innføre CDR3-biblioteket (*Knappik, (2000, loc. cit.)*), kan posisjon 85 i V $\kappa$ 1 og V $\kappa$ 3 enten være T eller V. Under ”HuCAL”-scFv1-bibliotekkonstruksjonen ble således posisjon 85 av V $\kappa$ 1 og V $\kappa$ 3 variert som følger: V $\kappa$ 1 original, 85T (kodon ACC); V $\kappa$ 1 bibliotek, 85T eller 85V (TRIM-kodoner ACT eller GTT); V $\kappa$ 3 original, 85V (kodon GTG); V $\kappa$ 3 bibliotek, 85T eller 85V (TRIM-kodoner ACT eller GTT); det samme gjelder for ”HuCAL”-Fab 1.

*CDR3-design.* Alle CDR3-rester som ble holdt konstant, er indikert i figur 1A og B. *CDR3 lengde.* Den designerte CDR3 lengdefordeling er som følger: Rester som ble variert er vist i parenteser (x) i figur 1. V $\kappa$  CDR3, 8 aminosyreresidier (posisjon 89 til 96) (leilighetsvis 7-10 rester) med Q89, S90 og D92 fikserte; og VH CDR3, 5 til 28 aminosyreresidier (posisjon 95 til 102) (leilighetsvis 4-28), med D101 fiksert.

”HuCAL”-Fab 1 ble klonet inn i en phagmid ekspresjonsvektor ”pMORPH”18\_Fab1 (figur 2). Denne vektor omfatter Fd-fragmentet med en phoA-signalsekvens fusert ved C-terminusenden til et avkortet gen-III-protein av filamentøs phag, og videre omfatter den lette kjedeVL-CL med en ompA-signalsekvens. Begge kjeder er under kontroll av lac-operonet. De konstante doméner C $\lambda$ , C $\kappa$  og CH1 er syntetiske gener som er fullt kompatible med det modulære system til ”HuCAL” (*Knappikk, (2000), loc. cit.*).

30 Hele VH-kjeden (*MunI/StyI*-fragment) ble erstattet med et 1205 bp dummy-fragment inneholdende  $\beta$ -laktamase transkripsjonsenheten (bla) for derved å lette etterfølgende trinn for vektorfragmentfremstilling og for å tillate seleksjon av komplett VH-fjerning.

35 Etter VH-erstatning ble VL $\lambda$  fjernet med *EcoRI/DraIII* og VL $\kappa$  med *EcoRI/BsIWI* og erstattet med bakteriell alkalisk fosfatase (genfragment (1420 bp).

Da variabiliteten for de lettere kjeder er lavere enn den til de tyngre kjeder, ble kloningen startet med lettkjedebiblioteker. VL<sub>λ</sub>- og VL<sub>κ</sub>-lettkjedebibliotekene diversifiserte i L-CDR3, som ble generert for "HuCAL"-scFv-biblioteket (Knappikk, (2000), loc. cit.), ble også benyttet for kloning av "HuCAL"-Fab 1. Når det gjelder λ

5 besto de av λ1-, λ2- og λ3-"HuCAL"-rammeverket, og hadde en total variabilitet på  $5,7 \times 10^6$ . VL<sub>λ</sub>-fragmentene ble forsterket ved 15 PCR-sykler (Pwo-polymerase) med primerne 5'-GTGGTGGTTCCGATATC-3' (SEKV. ID nr. 28) og 5'-AGCGTCACACTCGGTGCGGCTTTCGGCTGGCCAAGAACGGTTA-3' (SEKV. ID nr. 29). PCR-produkter ble digestert med *EcoRV/DraIII* og gelrenset. Når

10 det gjelder VL<sub>λ</sub>-biblioteket ble bap-dummyen fjernet med *EcoRV/DraIII* fra bibliotekvektoren. 2 µg gelrenset vektor ble ligert med et 3-gangers molart overskudd av VL<sub>λ</sub>-kjeder i 16 timer ved 16 °C og ligeringsblandingen ble elektroporert i 800 µl *E. coli* TOP10F-celler (Invitrogen), som til sammen ga  $4,1 \times 10^8$  uavhengige kolonier. Transformantene ble forsterket rundt 2000 ganger i 2 x YT/1 % glukose/34 µg/ml

15 kloramfenikol/100 µg/ml ampicillin, høstet og lagret i 20 % (vekt/volum) glyserol ved -80 °C.

κ-bibliotekene omfatter κ1, κ2, κ3 og κ4-"HuCAL"-mastergenene med en total variabilitet på  $5,7 \times 10^6$ . VL<sub>κ</sub>-kjedene ble oppnådd ved restriksjonsdigestering med

20 *EcoRV/Bs/IWI* og gelrenset. Når det gjelder VL<sub>κ</sub>-biblioteket ble bap-dummyen fjernet med *EcoRV/Bs/IWI* fra bibliotekvektoren. 2 µg gelrenset vektor ble blandet med et 5-gangers molart overskudd av VL<sub>κ</sub>-kjeder. Ligerings- og transformasjon inn i *E. coli* TOP10F-celler (Invitrogen), ble gjennomført som beskrevet for VL<sub>λ</sub>-kjeder, og ga til sammen  $1,6 \times 10^8$  uavhengige kolonier.

25 DNA for de to lettkjedebibliotekene ble preparert og bla-dummyen ble fjernet ved *MunI/StyI*, for derved å generere de to vektorer for innskyting av VH-sub-bibliotekene. VH-bibliotekene av "HuCAL"-scFv ble benyttet for generering av "HuCAL"-Fab 1. VH-bibliotekene av "HuCAL"-scFv består av mastergenene VH1A/B-6, diversifisert

30 med to VH-CDR3 trinukleotidbibliotekassetter som skiller seg i CDR3-Ingdene separat, og hvert VH-bibliotek ble kombinert med VL<sub>κ</sub>- og med VL<sub>λ</sub>-biblioteket. For genereringen av "HuCAL"-Fab 1 DNA fra disse, ble det fremstilt VH-biblioteker som bevarer den opprinnelige variabilitet. DNA ble digestert med *MunI/StyI* og gelrenset. Et 5-gangers molart overskudd av VH-kjedene ble ligert med 3 µg VL<sub>λ</sub>-bibliotekvektoren,

35 og med 3 µg VL<sub>κ</sub>-bibliotekvektoren i 4 timer ved 22 °C. Ligeringsblandinger ble elektroporert for hver vektor i 1200 µl *E. coli* TOP10F-celler (Invitrogen), som ga til sammen  $2,1 \times 10^{10}$  uavhengige kolonier. Transformantene ble forsterket rundt 4000

ganger i 2 x YT/1 % glukose/34 µg/ml kloramfenikol/10 µg/ml tetrasyklin, høstet og lagret i 20 % (vekt/volum) glyserol ved -80 °C.

Som kvalitetskontroll ble de lette og tunge kjeder av enkeltkloner sekvensert med 5'-  
 5 CAGGAAACAGCTATGAC-3' (SEKV. ID nr. 30) henholdsvis  
 5'-TACCGTTGCTCTTCACCCC-3' (SEKV. ID nr. 31).

#### *Fagmid gjenvinning, fagforsterkning og rensing*

"HuCAL"-Fab 1 ble forsterket i 2 x TY medium inneholdende 34 µg/ml kloramfenikol,  
 10 10 µg/ml tetrasyklin og 1 % glukose (2 x TY-CG). Etter hjelperfaginfeksjon (VCSM13)  
 ved 37 °C ved en OD<sub>600</sub> på rundt 0,5, sentrifugering og resuspensjon i 2 x TY/34 µg/ml  
 kloramfenikol/50 µg/ml kanamycinceller ble dyrket over natten ved 30 °C. Fag ble  
 PEG-presipitert fra supernatanten (Ausubel, (1998), Current protocols in molecular  
 biology. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA), resuspendert i PBS/20 % glyserol  
 15 og lagret ved -80 °C. Fagforsterkning mellom to panningrunder ble gjennomført som  
 følger: mid-log fase TG1-celler ble infiserte med fortennet fag og brakt på plate på LB-  
 agar supplert med 1 % glukose og 34 µg/ml kloramfenikol. Etter inkubering over natten  
 ved 30 °C ble kolonier skrapet av, justert til en OD<sub>600</sub> på 0,5 og hjelperfag ble tilsatt som  
 beskrevet ovenfor.

20

#### **Eksempel 2: Fastfase panning**

Brønner av "MaxiSorp" mikrotiterplater F96 (Nunc) ble belagt med 100 µl 2,5 µM  
 humant Aβ (1-40) peptid (Bachem) oppløst i TBS inneholdende 0,05 % volumprosent  
 NaN<sub>3</sub>, og den forseglete plate ble inkubert i tre dager ved 37 °C der peptidet er  
 25 tilbøyelig til å aggregere på platen. Etter blokkering med 5 % ikke-fet tørrmelk i TBS, ble  
 1-5 x 10<sup>12</sup> "HuCAL"-Fab fag rensert som ovenfor, tilsatt i en time ved 20 °C. Etter flere  
 vasketrinn ble bundne fager eluert ved pH-eluering med 500 mM NaCl, 100 mM glysin  
 pH 2,2 og deretter nøytralisering med 1M Tris-Cl pH 7. Tre runder panning ble utført  
 med fagforsterkning mellom hver runde som beskrevet ovenfor, og vaskestringensen ble  
 30 øket fra runde til runde.

#### **Eksempel 3: Subkloning av selektert Fab-fragmenter for ekspresjon**

De Fab-kodende innskudd av de valgte "HuCAL"-Fab-fragmenter ble subklonet inn i  
 ekspresjonsvektoren "pMORPH"x7\_FS for å lette hurtig ekspresjon av oppløselig Fab.  
 35 DNA-fremstillingen av de valgte "HuCAL"-Fab-kloner ble digestert med *XbaI/EcoRI*,  
 for således å kutte ut Fab-kodende innskudd (ompA-VL og phoA-Fd). Subkloning av de  
 rensede innskudd inn i *XbaI/EcoRI* kutter vektor "pMORPH"x7, som tidligere bar et

scFv-innskudd, førte til en Fab-ekspressjonsvektor som ble betegnet "pMORPH"x9\_Fab1 (figur 3). Fab'er uttrykt i denne vektor bærer to C-terminale markører (FLAG og Strep) for påvisning og rensing.

#### Eksempel 4: Identifisering av A $\beta$ -bindings-Fab-fragmenter med ELISA

Brønner av "MaxiSorp" mikrotiterplater F384 (Nunc) ble belagt med 20  $\mu$ l 2,5  $\mu$ M humant A $\beta$  (1-40) peptid (Bachem) oppløst i TBS inneholdende 0,05 % volumprosent NaN<sub>3</sub>, og den forseglete plate ble inkubert i tre dager ved 37 °C der peptidet er

5 tilbøyelig til å aggregere på platen. Ekspresjon av individuelle Fab ble induert med 1 mM IPTG i 16 timer ved 22 °C. Oppløselig Fab ble ekstrahert fra *E. coli* ved BEL-lysering (borsyre, NaCl, EDTA og lysozym inneholdende buffer pH 8) og benyttet i en ELISA. Fab-fragmentet ble påvist med et alkalisk fosfatasekonjugert geite-anti-Fab-antistoff (Dianova/Jackson Immuno Research). Etter eksitering ved 340 nm ble

10 emisjonen ved 535 nm lest ut etter tilsetning av AttoPhos-fluorescens-substrat (Roche Diagnostics).

#### Eksempel 5: Optimalisering av antistoff-fragmenter

For å optimalisere bindingsaffiniteten av de selekterte A $\beta$ -bindingsantistofffragmenter, ble noen av Fab-fragmentene, MS-Roche-3 (MSR-3), MS-Roche-7 (MSR-7) og MS-Roche-8 (MSR-8) (figur 4), benyttet for å konstruere et bibliotek av Fab-antistoff-fragmenter ved å erstatte den parentale VL  $\kappa$ 3-kjede med en samling av alle kappa-kjeder  $\kappa$ 1-3, diversifisert i CDR3 fra "HuCAL"-biblioteket (*Knappik et al., 2000*).

20 Fab-fragmentene MS-Roche-3, -7 og -8 ble klonet via *XbaI/EcoRI* fra "pMORPH"x9\_FS inn i "pMORPH"18, en fagbasert vektor for fagdisplay av Fab-fragmenter, for å generere "pMORPH"18\_Fab1 (figur 2). En  $\kappa$ -kjedesamling ble klonet inn i "pMORPH"18\_Fab1 via *XbaI/SphI*-restriksjonsseter.

25 Det resulterende Fab-optimaliseringsbibliotek ble screenet ved panning mot aggregert humant A $\beta$  (1-40) peptid belagt på en fast bærer som beskrevet i eksempel 2. Optimaliserte kloner ble identifisert ved «Koff-rangering» i en Biacore-analyse som beskrevet i eksempel 8. De optimaliserte kloner MS-Roche-3.2, 3.3, 3.4, 3.6, 7.2, 7.3, 7.4, 7.9, 7.11, 7.12, 8.1, 8.2, ble karakterisert videre og viste forbedret affinitet og

30 biologisk aktivitet sammenliknet med utgangsfragmentene MS-Roche-3, MS-Roche-7 og MS-Roche-8 (figur 4). De oppsummerte CDR'er henviser til det "HuCAL"-konsensusbaserte antistoffgenet VH3 $\kappa$ 3. Fab-fragmentet MS-Roche-7.12 ble oppnådd ved kloning av HCDR3 av parentalklon MS-R 7 inn i et "HuCAL"-Fab-bibliotek som bærer diversitet i alle seks CDR-områder ved bruk av en designprosedyre identisk med

35 den for CDR3-kassetter, beskrevet av *Knappik et al., 2000*. Bibliotekkassetten ble konstruert sterkt fokusert på den kjente naturlige fordeling av aminosyrer og etter konseptet med kanonisk CDR-konformasjoner etablert av Allazikani (Allazikani et al.,

1997). I motsetning til "HuCAL"-mastergenene inneholder imidlertid klonen MS-Roche 7.12 aminosyre S i posisjon 49 av VL-kjeden (se vedlagte tabell 1).

De optimaliserte Fab'er viste etter den første affinitetsmodning forbedret karakteristika i forhold til MS-Roche-3-, MS-Roche-7- og MS-Roche-8-utgangsklonene (figur 4). Bindingsaffinitetene for modne Fab'er til A $\beta$ 1-40 og A $\beta$ 1-42 var betydelig øket, og ga K<sub>D</sub>-verdier i området 22-240 nM, sammenliknet med 850-1714 nM for parentalklonene (tabell 3). Immunohistokjemianalyse av amyloid plakk i humant AD-hjernesnitt, viste også betydelig øket fargingsprofil av de modnede kloner, dvs. at det ble oppnådd bedre forhold signal:bakgrunn, og positiv plakkfarging ble påvist ved relativt lave konsentrasjoner av de modnede Fab'er (figur 5).

For videre optimalisering ble VH CDR2-områdene og VL CDR1-områdene av et sett av aminosyrefragmenter avledet fra L-CDR3 optimalisert MS-Roche-3, -7 og -8 (tabell 1; figur 4), optimalisert ved kassetmutagenese ved anvendelse av trinukleotiddirigert mutagenese (Virnekäs *et al.*, 1994). Derfor ble en trinukleotidbasert HCDR2-kassett og en trinukleotidbasert LCDR1-kassett konstruert ved anvendelse av en konstruksjonsprosedyre identisk med den til CDR3-kassetene beskrevet av Knappik *et al.*, 2000. Bibliotekskassetene ble konstruert med sterk fokus på den kjente, naturlige fordeling av aminosyrer og ved å følge konseptet med kanonisk CDR-konformasjoner etablert av Allazikani (Allazikani *et al.*, 1997). Protokollen som ble benyttet for optimalisering av de i utgangspunktet valgte aminosyrefragmenter, vil etterlikne prosessen med affinitetsmodning ved somatisk hypermutasjon som observeres under den naturlige immunrespons.

De resulterende biblioteker ble avsøkt separat som beskrevet ovenfor og førte til optimaliserte kloner enten i H-CDR2- eller i L-CDR1-området. Alle kloner ble identifisert som ovenfor ved en forbedret «Koff» mot A $\beta$ 1-40-fiber etter en «Koff-rangering» i Biacore, og viste forbedret affinitet enten til A $\beta$ 1-40 eller A $\beta$ 1-42 eller begge, ved sammenlikning med den tilsvarende opphavsklon (tabell 3). Tabell 1 inneholder sekvenskarakteristika for de parentale, så vel som for sekvensene av de optimaliserte kloner. CDR'ene som er opplistet refererer til det "HuCAL"-konsensusbaserte antistoffgen VH3 $\kappa$ 3.

For eksempel ble affiniteten for MS-Roche-7 parental-Fab mot A $\beta$ 1-40 forbedret med en faktor på over 35 fra 1100 nM til 31 nM etter L-CDR3-optimalisering (MS-Roche-

7.9) og videre forbedret til 5 nM etter H-CDR2-optimalisering (MS-Roche-7.9H2), som vist i tabell 3.

H-CDR2- og L-CDR1-optimaliseringsprosedyre ikke bare økte affiniteten, men  
5 resulterte også for noen av klonene i en betydelig forbedret farging av amyloid plakk i  
AD-hjernesnitt, særlig observert med MS-Roche 7.9H2 og 7.9H3.

**Tabell 1**

Binder name	L-CDR1	pos.49	L-CDR2	pos. 85	L-CDR3	H-CDR1	pos.47	H-CDR2	H-CDR3
MS-Roche #3	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQVYNPPV	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.1	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSVPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.2	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQIYSYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.3	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	HQMSSYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.4	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.5	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.6	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQIYNYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.2.H1	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQIYSYPP	GFTFSSYAMS	W	AISEHGLNIYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.2.H2	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQIYSYPP	GFTFSSYAMS	W	AISQRGQFTYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.3.H1	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	HQMSSYPP	GFTFSSYAMS	W	VISEKSRFIYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.3.H2	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	HQMSSYPP	GFTFSSYAMS	W	VISQESQYKYYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.3.H3	<b>RASQVSSSYLA</b>	Y	GASSRAT	V	HQMSSYPP	GFTFSSYAMS	W	AISQNGFHIYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.4.H1	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISETSIRKYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.4.H2	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYDYPP	GFTFSSYAMS	W	VIDMVGHTYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.4.H3	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYDYPP	GFTFSSYAMS	W	VISQIGRKYIYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.4.H4	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISETGMHIYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.4.H5	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYDYPP	GFTFSSYAMS	W	VISQVGAHIYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.4.H6	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISESGWSTYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.4.H7	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYDYPP	GFTFSSYAMS	W	VISETGKNIYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV

60

MS-Roche #3.4.H8	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISEHGRFKYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.4.H9	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISESSKNKYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.4.H10	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISESGRGGKYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.4.H11	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISEFGKNIYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.4.H12	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	VISQTGQNIYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.4.H13	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISEQGRNIYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.4.H14	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISESGQKYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.4.H16	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISESGVNIYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.4.H17	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISEFGQFIYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.4.H18	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISQSNFIYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.4.L7	RASQRLGRLYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGTYYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.4.L8	RASQWITKSYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGTYYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.4.L9	RASRRIHVYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGTYYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.4.L11	RASQLVGRAYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGTYYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.6.H1	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYPP	GFTFSSYAMS	W	VISESQKYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.6.H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYPP	GFTFSSYAMS	W	VISERGINYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.6.H3	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYPP	GFTFSSYAMS	W	VISETGKFIYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.6.H4	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYPP	GFTFSSYAMS	W	AISEGRHIYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.6.H5	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYPP	GFTFSSYAMS	W	AISESGTKYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.6.H6	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYPP	GFTFSSYAMS	W	AISEHGTNIYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.6.H8	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYPP	GFTFSSYAMS	W	AISEYSKFKYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.6.L1	RASQFIQRFYLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGTYYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV

61

MS-Roche #3.6.L2	RASQFLSRYYLA	Y	GASSRAT	V	QQYNYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	LTHYARYYFDV
MS-Roche #7	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	FQLYSDPF	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.1	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	HQLYSSPY	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.2	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.3	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	HQVYSHPF	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.4	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQIYNFPH	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.5	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	HQVYSSPF	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.6	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	HQLYSPPY	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.7	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	HQVYSAPF	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.8	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	HQVYSFPI	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.9	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	LQIYNMPI	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.10	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYNPPH	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV

62

MS-Roche #7.11	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPPH	GFTFSSYAMS	W	AISGSGSTYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.12	RASQYVSSPYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYGMS	W	NISGGSSTYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.13	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	HQVYSPPF	GFTFSSYAMS	W	AISGSGSTYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.2.H1	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AINANGLKYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.2.H2	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AINGTGMKYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.2.H3	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AINANGYKYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.2.H4	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AINSKGSRIYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.2.H5	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AINATGRSKYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.2.H6	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AINARGNRTYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.2.H7	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AINSRGSDTHYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.2.H8	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AINASGHKYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.2.L1	RASQYVDRTYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AISGSGSTYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYF DV





65

MS-Roche #7.11.H5	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPPH	GFTFSSYAMS	W	AIAHAGQRTYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche # 7.11.L1	RASQRLRIYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPPH	GFTFSSYAMS	W	AISGGSTYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.12.H1	RASQYVFRYYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYGMS	W	NINGNGNRKYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.12.L1	RASQYVFRYYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYGMS	W	NISGGSSTYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.12.L2	RASQRFYKYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYGMS	W	NISGGSSTYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.12.L3	RASQVRRGFLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYGMS	W	NISGGSSTYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.12.L4	RASQRLKRSYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYGMS	W	NISGGSSTYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.12.L5	RASQRLKRSYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYGMS	W	NISGGSSTYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.12.L6	RASQYLWRYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYGMS	W	NISGGSSTYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #7.12.L7	RASQWIRKTYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYGMS	W	NISGGSSTYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche #8	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQLSSFPF	GFTFSSYAMS	W	AISGGSTYYADSVKGG	LLSRGYNGYYHKFDV
MS-Roche #8.1	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQLSNYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGGSTYYADSVKGG	LLSRGYNGYYHKFDV
MS-Roche #8.2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQLSSYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGGSTYYADSVKGG	LLSRGYNGYYHKFDV

66

MS-Roche #8.1.H1	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQLSNYPP	GFTFSSYAMS	W	AISRSGSNIYYADSVKG	LLSRGYNGYYHKFDV
MS-Roche #8.2.H1	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQLSSYPP	GFTFSSYAMS	W	AISITGRRKYYADSVKG	LLSRGYNGYYHKFDV
MS-Roche #8.2.H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQLSSYPP	GFTFSSYAMS	W	AISRTGSKTYADSVKG	LLSRGYNGYYHKFDV
<b>MS-Roche #8.2.H4</b>	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQLSSYPP	GFTFSSYAMS	W	ATSVK GKTYADSVKG	LLSRGYNGYYHKFDV
MS-Roche #8.2.L1	RASQSVGRYLA	Y	GASSRAT	T	QQLSSYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	LLSRGYNGYYHKFDV

Når det gjelder sekvenser tilhørende V<sub>H3</sub>- og V<sub>K3</sub>-HuCAL-konsensussekvenser, henvises det til figur 1 A

## Eksempel 6

### *Konstruksjon av "HuCAL" immunoglobulinekspresjonsvektorer*

#### 5 *Tungkjedekloning.*

Det multiple kloningssettet av pcDNA3.1+ (Invitrogen) ble fjernet (*NheI/ApaI*), og en stuffer som var kompatibel med restriksjonssettene som ble benyttet for "HuCAL"-designen, ble innskutt for ligering av ledersekvensene (*NheI/EcoRI*), VH-doméner (*MunI*), og immunoglobulinkonstante områder (*BlpI/ApaI*). Ledersekvensen (EMBL 83133) ble utstyrt med en Kozak-sekvens (Kozak, 1987). Konstante områder av humant IgG4 (EMBL K01316), og serum IgA1 (EMBL J00220), ble skåret inn i overlappende oligonukleotider med lengder på rundt 70 baser. Tause mutasjoner ble innført for å fjerne restriksjonssteder som ikke varpatible med "HuCAL"-designen.

Oligonukleotidene ble spleiset ved overlappforlengelses-PCR.

15 Under subkloning fra Fab inn i IgG, ble VH-DNA-sekvenser av Fab skåret ut via *MfeI/BlpI* og ligert inn i IgG-vektoren som ble åpnet via *EcoRI/BlpI*. *EcoRI* (*g/aattc*) og *MfeI* (*c/aattg*) delerpatible, kohesive ender (*aatt*) og DNA-sekvensen av det opprinnelige *MfeI*-settet i Fab forandres fra: *c/aattg* til: *g/aattg* etter ligering inn i IgG-ekspressjonsvektoren, og ødelegger derved både *MfeI*- og *EcoRI*-settet, og således fører  
20 til en aminosyreforandring fra Q (kodon: *caa*) til E (kodon: *gaa*).

#### *Lettkjedekloning.*

Det multiple kloningssettet av pcDNA3.1/Zeo+ (Invitrogen) ble erstattet med to forskjellige stuffer.  $\kappa$ -stufferen ga restriksjonssteder for innføring av en  $\kappa$ -leder (25 *NheI/EcoRV*), "HuCAL"scFv V $\kappa$ -doméner (*EcoRV/Bs/IWI*), og det  $\kappa$ -kjedekonstante området (*Bs/IWI/ApaI*). De tilsvarende restriksjonssteder i  $\lambda$ -stufferen var *NheI/EcoRV* ( $\lambda$ -leder), *EcoRV/HpaI* (V $\lambda$ -doméner), og *HpaI/ApaI* ( $\lambda$ -kjedekonstant område).  $\kappa$ -lederen (EMBL Z00022) så vel som  $\lambda$ -lederen (EMBL J00241), var begge utstyrt med Kozak-sekvenser. De konstante områder av humant  $\kappa$ - (EMBL L00241) og  $\lambda$ -kjede  
30 (EMBL M18645) ble sammensatt ved overlappforlengelses-PCR, som beskrevet ovenfor.

#### *Generering av IgG-uttrykkende CHO-celler.*

CHO-K1-celler ble kotransfektet med en ekvimolar blanding av IgG- tung- og lett-  
35 kjedeekspressjonsvektorer. Dobbelresistente transfektanter ble valgt med 600  $\mu\text{g/ml}$  G418 og 300  $\mu\text{g/ml}$  Zeocin (Invitrogen), fulgt av begrenset fortykning. Supernatanten av enkeltkloner ble bedømt på IgG-ekspressjon ved fangings-ELISA. Positive kloner ble

utvidet i RPMI-1640 medium supplert med 10 % ultralav IgG-FCS (Life Technologies). Etter justering av pH-verdien i supernatanten til 8.0 og steril filtrering, ble oppløsningen underkastet standard protein-A-kolonnekromatografi (Poros 20 A, PE Biosystems).

#### 5 **Eksempel 7: Pepsotanalyse med dekaeptider**

Den følgende aminosyresekvens omfattende A $\beta$  (1-42) ble delt i 43 overlappende dekaeptider med et rammeskift på 1 aminosyre.

ISEVKM<sup>1</sup>DAEF RHDSGYEVHH QKLVFFAEDV GSNKGAIIGL MVGGVVI<sup>42</sup>ATV  
 IV (SEKV. ID nr. 414). I henhold til dette representerer DAEF RHDSGYEVHH  
 10 QKLVFFAEDV GSNKGAIIGL MVGGVIA (SEKV. ID nr. 27), som vedlagt  
 aminosyrene 1 til 42 av A $\beta$ 4/ $\beta$ -A4-peptid.

De 43 dekaeptidene ble syntetisert med N-terminal acetylering og C-terminal kovalent binding til et celluloseark ("pepsot") fra en kommersiell leverandør (Jerini BioTools, Berlin). Cellulosearket ble inkubert i 2 timer på en vuggeplattform med monoklonalt  
 15 antistoff (2  $\mu$ g/ml) i blokkeringsbuffer (50 mM Tris HCl, 140 mM NaCl, 5 mM  
 NaEDTA, 0,05 % NP40 (Fluka), 0,25 % gelatin (Sigma), 1 % bovint  
 serumalbuminfraksjon V (Sigma), pH 7,4). Arket ble vasket tre ganger tre minutter på  
 en vuggeplattform med TBS (10 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5). Det ble deretter  
 fuktet med katodebuffer (25 mM Tris base, 40 mM 6-aminoheksansyre, 0,01 % SDS, 20  
 20 % metanol) og overført til en halvtørr blottingsstabel med peptidsiden mot en PVDF-  
 membran (Bio-Rad) av samme størrelse.

Den halvtørre blottingsstabelen består av nyfuktete filterpapir (Whatman nr. 3), som er noe større enn peptidarket:

25 3 papirer fuktet med katodebuffer  
 peptidarket

et ark av PVDF-membran fuktet med metanol

3 papirer fuktet med anodebuffer 1 (30 mM Tris base, 20 % metanol)

3 papirer fuktet med anodebuffer 2 (0,3 mM Tris base, 20 % metanol).

30

Overføringen gjennomføres ved en strømtetthet mellom katode og anode på 0,8  
 mA/cm<sup>2</sup> i 40 minutter, som er tilstrekkelig til å eluere mesteparten av antistoffet fra  
 cellulosearket, og avsette dette på PVDF-membranen. PVDF-membranen utbyttes så  
 mot en andre PVDF-membran og overføres i ytterligere 40 minutter for å sikre  
 35 fullstendig eluering fra cellulosearket.

PVDF-membranen nedsenkes i blokkeringsbuffer i 10 minutter. Deretter tilsettes HRP-merket antihumant Ig H+L (Pierce) i 1:1000 fortytning og membranen inkuberes på en vuggeplattform i en time. Den ble vasket 3 x 10 minutter med TBST (TBS med 0,005 % Tween20). Fargen fremkalles ved nedsenking av membranen i en oppløsning laget av 3 mg 4-klornaftol oppløst i 9 ml metanol med 41 ml PBS (20 mM Na-fosfat, 150 mM NaCl, pH 7,2) en 10 µl 30 % hydrogenperoksid (Merck). Etter fremkallingen av blåsorte flekker, ble membranen vasket grundig med vann og tørket.

Fastslåelsen av antistoffreaktive pepspots foretas ved visuell inspeksjon gjennom en transparent spot-matrise. Epitopene av antistoffet defineres som den minimale aminosyresekvens i reaktive peptider. For sammenlikning analyseres musemonoklonale antistoffer (BAP-2, BAP-1, BAP-17, BAP-21, BAP-24 og 4G8) på samme måte, bortsett fra ved bruk av HRP-merket antimuse-Ig i stedet for antihumant Ig.

Det skal påpekes at affinitetsmodning og konvertering av de monovalente Fab-fragmenter til fullengde-IgG1-antistoffer vanligvis resulterer i en viss utvidelse av epitopgjenkjennelsesekvensen som antydnet ved pepspot- og ELISA-analyser. Dette kan relateres til rekruttering av flere kontaktpunkter i antistoff-antigen interaksjonsarealet som en konsekvens av affinitetsmodning eller en sterkere binding til den minimale epitop, slik at også svake interaksjoner med naboaminosyrer kan påvises. Det sistnevnte kan være tilfelle når A $\beta$ -avledete peptider probes med fullengde-IgG-antistoffer. Som vist i tabell 2 for pepspotanalyse, blir gjenkjennelsesekvenser av de N-terminal epitopene og midtepitopene forlenget med opptil 3 aminosyrer når opphavs-Faber og tilsvarende fullt modnede IgG-antistoffer sammenliknes. Imidlertid må man huske på at dekaeptidene modifiseres for kovalent festing ved den C-terminale aminosyre, og denne aminosyren behøver derfor ikke være lett tilgjengelig for fullengdeantistoffet pga. sterisk hindring. Dersom dette er tilfelle, vil den siste C-terminale aminosyre ikke bidra betydelig til epitopgjenkjennelsesekvensen og en potensiell reduksjon av den minimale gjenkjennelsesekvens med kun en aminosyre i C-terminalenden må tas med i betraktning i pepspotanalysen som benyttes ifølge foreliggende oppfinnelse.

**Tabell 2.** Pepsptanalyse av bindings-Fab'er og fullengde IgG-antistoffer til dekaeptider på et celluloseark.

Antistoff	Posisjon	Posisjon
MSR-3 Fab	3-4	18-23
MSR-7 Fab	3-5	19-24
MSR-8 Fab	4-5	18-21
MSR-9 F ab	(1) 3-9	18-24
MSR-10 Fab	(4-10)	19-20
MSR-11 Fab	3-7	(18-20)
MSR-26 Fab	3-5	(16)-19-23
MSR-27 Fab	(3) 6-9	13-18 (20)
MSR-29 Fab		14-16 (20)
MSR-37 Fab	(4-6)	(19-24)
MSR-41 Fab	3-7	(17-21)
MSR-42 Fab	(4-9)	(18-24)
MSR 3.4.H7 IgG1	1-3	19-26
MSR 7.9.H2 IgG1	1-4	19-24
MSR 7.9.H7 IgG1	4-6	19-26
MSR 7.2.H2 x 7.2.L1 IgG1	(1-4) 5-9	18-26
MSR 7.11.H1 x 7.2.L1 IgG1	4-6	19-26
BAP-2	4-6	
4G8		19-20 (23)
BAP-21		32-34
BAP-24		38-40
BAP-1	4-6	
BAP-17		38-40

Tallene refererer til de essensielle aminosyrer fra A $\beta$ 1-40-sekvensen som må være til stede i dekaeptidet for optimal binding av antistoffet. En svak peptidreaktivitet, og således et svakt bidrag til epitopen, er antydnet i parenteser.

**Eksempel 8. Bestemmelse av  $K_D$ -verdier for MS-R Fab- og MS-R IgG1-antistoffbinding til A $\beta$ 1-40- og A $\beta$ 1-42 fibre *in vitro* ved overflateplasmonresonans (SPR)**

5 Binding av anti-A $\beta$ -antistoffer (Fab'er og IgG1) til fibrillær A $\beta$ , ble målt online ved overflateplasmonresonans (SPR) og affinitetene for de molekylære interaksjoner ble bestemt, som beskrevet av Johnson, *Anal. Biochem.* 1997, 249, 165-173. Biacore2000- og Biacore3000-instrumenter ble benyttet for disse målinger. A $\beta$ 1-40- og A $\beta$ 1-42-fibre ble generert *in vitro* ved inkubering av syntetiske peptider ved en konsentrasjon på

10 200  $\mu$ g/ml i 10 mM Na-acetatbuffer (pH 4,0) i 3 dager ved 37 °C. Elektronmikroskopisk analyse bekreftet en fibrillær struktur for begge peptider, A $\beta$ 1-40 viste predominant kortere (<1 mikron) og A $\beta$ 1-42 predominant lengre (>1 mikron) fibre. Disse fibre antas å representere aggregerte A $\beta$ -peptider i humant AD-hjerne nærmere enn ikke godt definerte blandinger av amorfe aggregater og ikke-strukturerte presipitater. Fibrene ble

15 fortynnet 1:10 og koblet direkte til en "Pioneer Sensor Chip F1" som beskrevet i produsentens instruksjonsbok (BIAapplication Handbook, versjon A $\beta$ , Biacore A $\beta$ , Uppsala, 1998). I de første forsøk ble det funnet at valgte MS-Roche-Fab'er skilte seg vesentlig i sin reaksjonskinetikk og derfor måtte dataanalysemodus forandres tilsvarende. For bindere med lav kinetisk  $K_D$ , ble verdiene beregnet ved kurvetilpasning

20 av de tidsavhengige sensorresponser, dvs. fra forholdet  $k_{off}/k_{on}$ . Bindere med hurtig kinetikk ble analysert ved tilpasning av de konsentrasjonsavhengige sensorresponser ved likevekt (adsorpsjonsisotermer).  $K_D$ -verdier ble beregnet fra Biacore sensogrammer basert på den totale Fab-konsentrasjon, som bestemt ved en proteianalyse. For kloner avledet fra den første og andre affinitetsmodningssyklus, ble innholdet av aktivt Fab i

25 hvert preparat bestemt ved Biacore i henhold til en fremgangsmåte, som bestemt av Christensen, *Analytical Biochemistry* (1997) 249, 153-164. Kort sagt ble tidsavhengig proteinbinding til A $\beta$ 1-40 fibre som var immobilisert på en Biacore chip, målt under assosiasjonsfasen under massebegrensede betingelser ved forskjellige

30 strømningshastigheter for analyttoppløsningen. Betingelsene for massebegrensning ble realisert ved immobilisering av høye mengder A $\beta$ -fibre (2300 responsheter) på brikkeoverflaten for en målekanal og ved å arbeide ved relativt lave analyttkonsentrasjoner, dvs. 160 nM (basert på den totale Fab-proteinkonsentrasjon).

En oppsummering av  $K_D$ -verdiene for valgte MS-Roche-kloner som er identifiserte i

35 primærsøk av HuCAL-biblioteket og deres tilsvarende modne derivater etter første og andre affinitetsmodningssyklus, er vist i tabell 3. I den første affinitetsmodningssyklus ble tungkjede CDR3 (VH-CDR3) holdt konstant og optimalisering ble fokusert på

diversifisering av lettkjede-CDR3 (VL-CDR3). I den andre affinitetscyklus ble det gjennomført diversifisering av VL-CDR1 og VH-CDR2. Noen av binderne fra den første modningssyklus ble konvertert til fullengde-IgG1-antistoffer i henhold til den teknologi som er beskrevet av MorphoSys, som beskrevet i eksempel 6, og  $K_D$ -verdier som bestemt ved Biacore, som beskrevet ovenfor.  $K_D$ -verdiene for fullengde-IgG-binding til A $\beta$ 1-40- og A $\beta$ 1-42-fibere er vist i tabell 4.

Modne derivater fra både L-CDR1- og H-CDR2-bibliotek ble etter andre modningssyklus identifisert og tillatt kombinerings av lette og tunge kjeder. Krysskloningsstrategien er beskrevet i eksempel 13. Enten ble hele lette kjeder, LCDR1 eller LCDR1+2 byttet ut.  $K_D$ -verdier for valgte kryssklonete Fab'er er vist i tabell 8.

Noen av Fab'ene fra den første og andre modningssyklus og fra de kryssklonete bindere, ble konvertert til fullengde humant IgG1-antistoffer, i henhold til den teknologi som er beskrevet av MorphoSys, som beskrevet i eksempel 6.  $K_D$ -verdiene for IgG-binding til A $\beta$ 1-40- og A $\beta$ 1-42-fibere ble bestemt ved Biacore. Kort sagt ble en kinetisk modell for den trinnvise dannelse av et bivalent kompleks benyttet, og  $K_D$ -verdiene ble beregnet ved en analyse av Scatchard-typen for likevektsbinding. Pga. den meget langsomme assosiasjonsprosess ved lav antistoffkonsentrasjon (flere timer for å nå likevekt), ble likevektsbindingsdata oppnådd ved ekstrapolering av assosiasjonskurvene til lange tidsintervaller. På- og av-hastighetene for dannelse av monovalent og bivalent kompleks ble bestemt via kurvetilpasningsprosedyren, og benyttet for ekstrapolering. Basert på disse  $R_{eq}$ -verdier ble en Scatchard-analyse gjennomført og  $K_D$ -verdier for dannelsen av det monovalente og bivalente kompleks ble bestemt. Data er oppsummert i tabell 5. Fra det rettkurve Scatchard-plot ble en høyere (bivalent) og lavere (monovalent) affinitetsinteraksjon avledet for MS-R IgG'er avledet fra den andre affinitetsmodningssyklus og krysskloner. Disse to affiniteter representerer de nedre og øvre  $K_D$ -verdier for området, som indikert i tabell 5.

**Tabell 3**

<i>Utskilte kloner fra</i>	<i>MS-R#</i>	<i>K<sub>D</sub>Aβ<sub>1-40</sub></i> <i>nM</i>	<i>K<sub>D</sub>Aβ<sub>1-42</sub></i> <i>nM</i>	<i>MS-R#</i>	<i>K<sub>D</sub>Aβ<sub>1-40</sub></i> <i>nM</i>	<i>K<sub>D</sub>Aβ<sub>1-42</sub></i> <i>nM</i>	<i>MS-R#</i>	<i>K<sub>D</sub>Aβ<sub>1-40</sub></i> <i>nM</i>	<i>K<sub>D</sub>Aβ<sub>1-42</sub></i> <i>nM</i>
Primærsøk	3	930	1300	7	1100	1714	8	850	1000
Første affinitets- modning	3,2	52	240	7,2	22	58	8,1	24	42
	3,3	38	104	7,3	23	88	8,2	24	64
	3,4	32	103	7,4	28	103			
	3,6	40	68	7,9	31	93			
				7,11	22	74			
			7,12	28	60				
Andre affinitets- modning	3.2H1	4,4	3,3	7.2H1	9,3	10,2	8.1H1	13,6	9,2
	3.2H2	5,2	1,1	7.2H2	8,2	8,2	8.2H1	1,6 <sup>a</sup>	2,1 <sup>a</sup>
	3.3H1	17,1	19,4	7.2H3	45,4	5,3	8.2H3	n.d.	3,1
	3.3H2	10,6	22,8	7.2H4	5,9	5,0	8.2H4	12,1	11,9
	3.3H3	1,4	3,3	7.2H5	8,0	10,1	8.2L1	4,8	3,7
	3.4H1	13,5	14,0	7.2H6	1,0	n.d.			
	3.4H3	6,7	8,4	7.2H7	15,5	8,1			
	3.4H4	33,0	43,0	7.2H8	1,5	2,1			
	3.4H5	26,5	36,0	7.2L1	13,3	12,7			
	3.4H6	49,0	60,0	7.2L2	5,6	4,0			
	3.4H7	19,2	31,7	7.2L4	1,1	1,1			
	3.4H8	10,7	26,5	7.3H1	8,0	11,2			
	3.4H9	21,7	18,6	7.3L1	4,5	6,0			
	3.4H10	8,1	10,1	7.4H1	8,0	6,6			
	3.4H11	19,5	8,3	7.4H2	9,9	6,2			
	3.4H12	25,5	27,0	7.9H1	4,9	5,4			
	3.4H13	32,3	18,8	7.9H2	5,0	5,7			
	3.4H14	13,3	16,8	7.9H3	4,2	2,8			
	3.4H16	25,5	15,6	7.9H4	4,8	4,2			
	3.4H17	2,0	4,3	7.9H5	1,7	1,8			
3.4H18	17,1	10,0	7.9H6	1,2	1,2				
3.4L7	9,3	9,3	7.9H7	1,0	0,9				
3.4L8	6,2	13,0	7.9H8	0,8	0,7				
3.4L9	16,3	9,1	7.9H9	0,9	0,9				
3.4L11	5,3	2,6	7.9L1	1,0	1,1				

**Tabell 3 fortsetter ...**

Utskilte kloner fra	<i>MS-R#</i>	$K_D A\beta_{1-40}$	$K_D A\beta_{1-42}$	<i>MS-R#</i>	$K_D A\beta_{1-40}$	$K_D A\beta_{1-42}$	<i>MS-R#</i>	$K_D A\beta_{1-40}$	$K_D A\beta_{1-42}$
		<i>nM</i>	<i>nM</i>		<i>nM</i>	<i>nM</i>		<i>nM</i>	<i>nM</i>
Andre affinitetsmodning	3.6H1	18,9	23,1	7.9L2	1,0	0,5			
	3.6H2	19,8	54,0	7.11H1	12,7	6,7			
	3.6H3	5,4	7,5	7.11H2	0,3	0,3			
	3.6H4	13,0	7,8	7.11H3	6,6	4,4			
	3.6H5	8,2	6,0	7.11 H4	1,0	1,7			
	3.6H6	36,0	11,8	7.11H5	3,4	1,7			
	3.6H8	2,5	2,5	7.11L1	1,1	1,2			
	3.6L1	15,6	11,1	7.12H1	0,6	0,8			
	3.6L2	13,7	13,1	7.12L1	n.d.	3,8			
				7.12L2	4,0	5,4			
				7.12L3	0,8	0,9			
				7.12L4	2,0	0,6			
				7.12L5	0,8	0,6			
				7.12L6	n.d.	n.d.			
			7.12L7	n.d.	n.d.				

$K_D$ -verdier for MS-R Fab-binding til A $\beta$ 1-40- og A $\beta$ 1-42-fibere som bestemt ved Biacore. For klonene avledet fra den første og andre affinitetsmodningssyklus er verdiene korrigerede for innhold av aktivt Fab til stede i hver prøve som beskrevet i

5 teksten.

<sup>a</sup>: Verdier ble beregnet fra konsentrasjonsavhengige sensorresponser ved likevekt.  
n.d.: Ikke bestemt.

**Tabell 4**

<i>MS-R#</i>	$K_D A\beta_{1-40}$	$K_D A\beta_{1-42}$
	<i>nM</i>	<i>nM</i>
3.3IgG1	3,7	6,6
7.11IgG1	2,3	5,7
7.12IgG1	3,1	13,7
8.1IgG1	6,6	12,3 <sup>5</sup>

$K_D$ -verdier MS-R IgG1-binding til A $\beta$ 1-40- og A $\beta$ 1-42-fibere som bestemt ved Biacore. IgG ble avledet fra MS-R-Fab'er valgt etter første affinitetsmodningssyklus. Verdiene er korrigerede for innhold av aktive MS-R IgG til stede i hver prøve som beskrevet i

20 teksten.

**Tabell 5**

<i>Valgte kloner fra</i>	<i>MS-R#</i>	<i>K<sub>D</sub> Aβ<sub>1-40</sub> nM</i>	<i>K<sub>D</sub> Aβ<sub>1-42</sub> nM</i>
<i>Første affinitetsmodning</i>	3,3	3,7	6,6
	7,11	2,3	5,7
	7,12	3,1	13,7
	8,1	6,6	12,3
<i>Andre affinitetsmodning</i>	3.4.H7	0,10-0,30	0,10-0,30
	7.2.H4	0,09- 0,30	0,10-0,66
	7.9.H2	0,12-0,42	0,11-0,38
	7.9.H3	0,10-0,50	0,10-0,40
	7.9.H7	0,25- 0,69	0,24-0,70
	7.12.L1	1,20-3,50	0,74-2,90
	8.2.H2	0,16-1,00	0,12-0,92
<i>Kryssklonete Fab'er</i>	3.6.H5x3.6.L2	0,20-1,03	0,20-0,95
	3.6.H8x3.6.L2	0,22- 0,95	0,22- 0,82
	7.4.H2x7.2.L1	0,12-0,63	0,12-0,56
	7.11.H1x7.2.L1	0,14-0,66	0,15-0,67
	7.11.H1x7.11.L1	0,11-0,70	0,13-0,70

K<sub>D</sub>-verdier for MS-R IgG1 binding til Aβ<sub>1-40</sub>- og Aβ<sub>1-42</sub>-fibere som bestemt ved Biacore. IgG'ene ble avledet fra MS-R-Fab'er valgt etter første og andre  
5 affinitetsmodningssyklus og fra kryssklonete Fab'er. Verdiene er korrigerede for innholdet av aktive MS-R IgG'er til stede i hver prøve som beskrevet i teksten. De to K<sub>D</sub>-verdier som er gitt for MS-R IgG'er avledet fra det andre affinitetsmodningstrinn og kryssklonete bindere, representerer høyere og lavere affinitetsinteraksjon som beregnet fra de rettkurve Scatchard plottene. Med et antall ytterligere MS-R IgG'er  
10 (for eksempel MS-R IgG 7.9.H2x7.12.L2 og MS-R IgG 7.9.H4x7.12.L2), ble det oppnådd komplekse, rettkurve Scatchard blott, og bestemmelse av K<sub>D</sub>-verdier var derfor ikke mulig.

**Eksempel 9: Farging av genuint, humant amyloid plakk i hjernesnitt av en Alzheimers pasient ved indirekte immunfluorescens.**

Valgte MS-Roche Fab'er og fullengde-IgG1 ble testet for binding til  $\beta$ -amyloid plakk ved immunohistokjemianalyse. Kryostatsnitt av ikke-fikserte vev fra humant temporal korteks (oppnådd post mortem fra en pasient som hadde positiv diagnose for Alzheimers sykdom), ble merket ved indirekte immunfluorescens ved anvendelse av MS-Roche Fab'er eller fullengde human-IgG1-antistoffer ved forskjellige konsentrasjoner. Fab'er og IgG1-antistoffer ble avdekket ved geiteantihumant, affinitetsrenset F(ab')<sub>2</sub> fragment konjugert til Cy3 henholdsvis geiteantihumant (H+L) konjugert til Cy3. Begge sekundære reagenser ble oppnådd fra Jackson Immuno Research. Kontroller inkluderte en ikke-relatert Fab og de sekundære antistoffer alene, som alle ga negative resultater. Typiske eksempler på plakkfarging med utvalgte MS-Roche Fab'er og MS-Roche IgG1-antistoffer, er vist i figurene 5 til 7.

**Eksempel 10: Polymeriseringsanalyse: Forhindring av A $\beta$ -aggregering**

Ved inkubering i vandig buffer i flere dager aggregerte syntetisk A $\beta$  spontant, og dannet fibrillære strukturer som er tilsvarende de som sees ved amyloide avsetninger i hjernen hos Alzheimerpasienter. Søker har utviklet en *in vitro* analyse for å måle innarbeidingen av biotinyllert A $\beta$  i på forhånd dannede A $\beta$ -aggregater for å analysere A $\beta$ -nøytraliserende potensiale av A $\beta$ -antistoffer og andre A $\beta$ -bindingsproteiner som albumin (Bohrmann et al., 1999, J. Biol. Chem. 274, 15990-15995). Virkningen av små molekyler på A $\beta$ -aggregering kan også analyseres ved denne analyse.

*Ekspérimentell prosedyre:*

NUNC Maxisorb mikrotiterplater (MTP) belegges med en 1:1 blanding av A $\beta$ 1-40 og A $\beta$ 1-42 (2  $\mu$ M hver, 100  $\mu$ l/brønn) ved 37 °C i tre dager. Under disse betingelser ble høyaggregert, fibrillær A $\beta$  adsorbent og immobilisert på brønnens overflate. Beleggopløsningen ble så fjernet og platene tørket ved romtemperatur i 2-4 timer. (De tørkede plater kan lagres ved -20 °C). Restbindingssteder blokkeres ved tilsetning av 300  $\mu$ l/brønn fosfatbufret saltopløsning inneholdende 0,05 % Tween-20 (T-PBS) og 1 % bovint serumalbumin (BSA). Etter 1-2 timers inkubering ved romtemperatur ble platene vasket 1 x med 300  $\mu$ l T-PBS. En oppløsning av 20 nM biotinyllert A $\beta$ 1-40 i 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,2 (TBS) inneholdende 0,05 % NaN<sub>3</sub> og seriefortynnet antistoff tilsettes (100  $\mu$ l/brønn) og platen inkuberes ved 37 °C over natten. Etter vasking 3 x med 300  $\mu$ l T-PBS ble et streptavidin-POD konjugat (Roche Molecular Biochemicals) fortynnet 1:1000 i T-PBS inneholdende 1 % BSA, tilsatt i en mengde av 100  $\mu$ l/brønn og inkubert ved romtemperatur i 2 timer.

Brønnene ble vasket 3 x med T-PBS og 100 µl/brønn av en nyfremstilt tetrametylbenzidin (TMB) oppløsning ble tilsatt. [Fremstilling av TMB-oppløsning: 10 ml 30 mM sitronsyre, pH 4,1 (justert med KOH) + 0,5 ml TMB (12 mg TMB i 1 ml aceton + 9 ml metanol) + 0,01 ml 35 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]. Reaksjonen stanses ved tilsetning av 100  
5 µl/brønn 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> og absorbanse avleses ved 450 nm i en mikrotiterplateleser.

#### *Resultat:*

Figur 8 viser at MS-Roche IgG1-antistoffer forhindret inkorporering av biotinyleret Aβ1-40 i på forhånd dannede Aβ1-40/Aβ1-42 aggregater. Aβ-nøytraliseringskapasiteten for disse fullengdehumane IgG'er var tilsvarende den til det musemonoklonale antistoff  
10 BAP-1, som var generert ved en standard immuniseringsprosedyre og spesifikt gjenkjenner aminosyrerestene 4-6 av Aβ-peptid ved analyse ved pepspot-teknikken, som beskrevet i eksempel 7. Musemonoklonalt antistoff BAP-2, som også reagerer utelukkende med aminosyrene 4-6 (Brockhaus, ikke publisert) var betydelig mindre  
15 aktivt ved denne analyse. Enda lavere aktivitet ble funnet med Aβ1-40 C-terminalt spesifikt antistoff BAP-17 (Brockhaus, Neuroreport 9 (1998), 1481-1486) og det monoklonale antistoff 4G8 som gjenkjenner en epitop mellom posisjon 17 og 24 i Aβ-sekvensen (Kim, 1988, Neuroscience Research Communication, bind 2, 121-130). BSA ved en konsentrasjon på opptil 10 µg/ml påvirket ikke innarbeidingen av biotinyleret Aβ,  
20 og tjente som negativ kontroll. Ved høyere konsentrasjoner, dvs. større enn 100 µg/ml, er BSA imidlertid rapportert å inhibere binding av biotinyleret Aβ til på forhånd dannede Aβ-fibere (Bohrmann, (1999) *J. Biol. Chem.* 274 (23), 15990-5), som indikerer at interaksjonen av BSA med Aβ ikke er av høy affinitet.

#### 25 **Eksempel 11: Depolymeriseringsanalyse: Frigivning av biotinyleret Aβ fra aggregert Aβ**

I et tilsvarende forsøksoppsett ble MS-Roche IgG-antistoffers potensiale med henblikk på induksjon av depolymerisering av aggregert Aβ. Biotinyleret Aβ1-40 ble først innarbeidet i på forhånd dannede Aβ1-40/Aβ1-42-fibere før behandling med forskjellige  
30 anti-Aβ-antistoffer. Frisetting av biotinyleret Aβ ble målt ved anvendelse av den samme analyse som beskrevet i polymeriseringsanalysen.

#### *Forsøksprosedyre*

NUNC Maxisorb mikrotiterplater (MTP) belegges med en 1:1 blanding av  
35 Aβ1-40 og Aβ1-42, som beskrevet ved polymeriseringsanalysen. For innarbeiding av biotinyleret Aβ ble de belagte plater inkubert over natten med 200 µl/brønn 20 nM biotinyleret Aβ1-40 i TBS, inneholdende 0,05 % NaN<sub>3</sub> ved 37 °C. Etter vasking 3 x 300

$\mu$ l/brønn T-PBS, ble antistoffer som var seriefortynnet i TBS inneholdende 0,05 %  $\text{NaN}_3$ , tilsatt og inkubert ved 37 °C i 3 timer. Platen ble vasket og analysert med henblikk på nærvær av biotinylert  $\text{A}\beta$ 1-40, som beskrevet ovenfor.

5 *Resultat:*

Figurene 9A til D viser at oppfinnelsens antistoffer induerte depolymerisering av aggregert  $\text{A}\beta$  som målt ved frigivning av innarbeidet, biotinylert  $\text{A}\beta$ 1-40. MS-R-antistoffene og det musemonoklonale antistoff BAP-1 var tilsvarende aktivt, mens BAP-2-, BAP-17- og 4G8-antistoffene var klart mindre effektive ved frisetting av biotinylert  $\text{A}\beta$  fra massen av immobiliserte  $\text{A}\beta$ -aggregater. BAP-1 kan klart differensieres fra MS-R-antistoffene pga. reaktiviteten med celleoverflatefullengde APP (se figur 15), og antistoffer som BAP-1 med slike egenskaper er ikke brukbare for terapeutisk anvendelse da potensielle, autoimmunologiske reaksjoner kan indueres. Det er interessant å merke seg at BAP-2, på tross av spesifisiteten for aminosyrerest 4-6, som eksponeres i aggregert  $\text{A}\beta$ , har en klart lavere aktivitet i denne analyse, som indikerer at ikke alle N-terminusspesifikke antistoffer a priori er like effektive med henblikk på frigivning av  $\text{A}\beta$  fra fordannede aggregater. MS-Roche IgG' ene er klart overlegne BAP-2 med henblikk på depolymeriseringsaktiviteten. Den relativt lave aktivitet for BAP-17 (C-terminusspesifikk) og 4G8 (aminosyrerest 16-24-spesifikk) i denne analyse skyldes den kryptiske art av disse to epitoper i aggregert  $\text{A}\beta$ . Som allerede bemerket i polymeriseringsanalysen, hadde BSA ved de konsentrasjoner som her ble benyttet, ingen effekt på aggregert  $\text{A}\beta$ .

MS-R-antistoffer avledet fra den andre affinitetsmodningssyklus og fra de kryssklonete bindere, viser generelt en høyere effektivitet ved depolymeriseringsanalysen (sammenlikning av figur 9A med figurene 9B og 9C), noe som er konsistent med den økte bindingsaffinitet for disse antistoffer (se tabellene 3-5). De monoklonale antistoffer AMY-33 og 6F/3D er rapportert å forhindre  $\text{A}\beta$ -aggregering *in vitro* under visse forsøksbetingelser (Solomon, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 452-455; AMY-33 og 6F/3D antistoffer oppnådd fra Zymed Laboratories Inc., San Francisco (Order nr. 13-0100) henholdsvis Dako Diagnostics AG, Zug, Sveits (Order nr. M087201)). Som vist i figur 9D var begge disse antistoffer fullstendig inaktive i depolymeriseringsanalysen.

**Eksempel 12: Epitopanalyse ved ELISA på peptidkonjugater**

De følgende heptapeptider (enkeltbokstavkode) ble oppnådd ved fastfasesyntese og rensset ved væskechromatografi ved anvendelse av teknikker kjent innen faget.

AEFRHDC	VFFAEDC
EFRHDSC	FFAEDVC
FRHDSGC	FAEDVGC
RHDSGYC	AEDVGSC
HDSGYEC	EDVGSNC
DSGYEVC	DVGSNKC
SGYEVHC	VGSNKGK
YEVHHQC	GSNKGAC
EVHHQKC	CSNKGAI
VHHQKLC	CNKGAI
HHQKLC	CKGAIIG
HQKLVFC	CGLMVGG
QKLVFFC	CMVGGVV
KLVFFAC	CGGVVIA
LVFFAEC	

5

Peptidene ble oppløst i DMSO for å komme til en 10 mM konsentrasjon.

Bovint albumin (i det vesentlige fettsyrefritt BSA, Sigma Lot 112F-9390), ble oppløst til 10 mg/ml i 0,1 M natriumbikarbonat og aktivert ved tilsetning pr. ml av 50 µl av en 26 mg/ml oppløsning av N-suksinimidyl-maleinimidopropionat (NSMP, Pierce) i DMSO. Etter 15 minutters omsetning ved romtemperatur ble det aktiverte BSA rensset ved gelfiltrering (NAP-10, Pharmacia) i PBS med 0,1 % natriumazid som oppløsningsmiddel. 50 µl NSMP aktivert BSA (6,7 mg/ml) ble fortynnet med 50 µl PBS, 0,1 % natriumazid, og 10 µl peptidoppløsning (1 mM i DMSO) ble tilsatt. Som negativ kontroll ble aktivert BSA narrebehandlet med peptidtilsetning. Etter 4 timer ved romtemperatur ble reaksjonen stanset ved tilsetning av 10 µl 10 mM Cystein. En alikvot av konjugatreaksjonsblandingen ble fortynnet 1:100 med 0,1 M natriumbikarbonatbuffer og ble umiddelbart fylt i brønner på 100 µl av ELISA-plater (Nunc-Immuno-Plate). Etter henstand i 16 timer ved 4 °C, ble 100 µl blokkeringsbuffer (som ovenfor) tilsatt hver brønn og inkubert i ytterligere 30 minutter. Platene ble vasket med 2 x 300 µl/brønn TBST (som ovenfor) og fylt med 100 µl antistoff ved 10 µg/ml eller 2 µg/ml i blokkeringsbuffer. Platene ble holdt i 16 timer ved 4 °C, og vasket med 2

x 300  $\mu$ l TBST. 100  $\mu$ l/brønn HRP-konjugert antihumant Ig H+L (Pierce, fortynning 1:1000 med blokkeringsbuffer) ble tilsatt og inkubert i en time ved omgivelsestemperatur. Platene ble vasket med 3 x 300  $\mu$ l/brønn TBST.

Fargefremkalling ble startet ved tilsetning av 100  $\mu$ l

- 5 tetrametylbenzidin:hydrogenperoksidreagens. Reaksjonen ble stanset etter 50 minutter ved tilsetning av 100  $\mu$ l/brønn 1 M svovelsyre og den optiske tetthet målt med en optisk leser (Microplate Reader 3550, BioRad) ved 450 nm. For sammenlikning ble musemonoklonale antistoffer analysert på samme måte, bortsett fra å benytte HRP-merket antimuse-Ig som fremkallingsmiddel i stedet for antihumant Ig.

10

Ved å benytte spesifikke av de ovenfor beskrevne heptapeptider avledet fra A $\beta$ , ble spesifikke ELISA-tester som beskrevet her gjennomført. Fortrinnsvis omfatter oppfinnelsens antistoffer slike som viser et forholdssignal:bakgrunn på rundt "10" målt ved optiske tettheter, når deres reaktivitet med et A $\beta$ -avledet peptid (AEFRHD; aminosyre 2 til 7 av A $\beta$ ) sammenliknes med et ikke-relatert protein/peptid som BSA. Mest foretrukket er forholdet for de optiske tettheter over "5" for en tilsvarende reaksjon med minst én av de følgende tre A $\beta$ -avledete peptider: (VFFAED; aminosyre 18 til 23 av A $\beta$ ) eller (FFAEDV; aminosyre 19 til 24 av A $\beta$ ) eller (LVFFAE; aminosyre 17 til 22 av A $\beta$ ).

20

Tilsvarende resultater for oppfinnelsens parentale og/eller maturerte antistoffer er vist i de følgende to tabeller:

**Tabell 6.**

MS-R #	Peptid 2-7 <i>2-7/BSA</i>	Peptid 17-22 <i>17-22/BSA</i>	Peptid 18-23 <i>18-23/BSA</i>	Peptid 19-24 <i>19-24/BSA</i>	Peptid forhold <i>17-22/2-7</i>	Peptid forhold <i>18-23/2-7</i>	Peptid forhold <i>19-24/2-7</i>
7	24	4	7	4	0.17	0.29	0.17
8	28	10	29	25	0.36	1.04	0.89
7.2	34	12	16	9	0.35	0.47	0.26
7.3	34	11	15	9	0.32	0.44	0.26
7.4	36	10	13	6	0.28	0.36	0.17
7.9	28	9	13	8	0.32	0.46	0.29
7.11	37	11	15	9	0.30	0.41	0.24
7.12	38	6	8	7	0.16	0.21	0.18
8.1	30	1	11	8	0.03	0.37	0.27
8.2	32	4	28	23	0.13	0.88	0.72
3.2H2	26	12	23	20	0.46	0.88	0.77
3.3H1	23	4	12	8	0.17	0.52	0.35

3.3H3	31	2	5	2	0.06	0.16	0.06
3.4H1	27	2	8	2	0.07	0.30	0.07
3.4H2	16	11	1	1	0.69	0.06	0.06
3.4H3	22	9	17	11	0.41	0.77	0.50
3.4H5	28	5	13	4	0.18	0.46	0.14
3.4H7	24	2	6	5	0.08	0.25	0.21
3.4H17	28	5	12	11	0.18	0.43	0.39
3.4L11	31	6	20	5	0.19	0.65	0.16
3.6H6	25	1	4	7	0.04	0.16	0.28
3.6H1	23	3	13	5	0.13	0.57	0.22
3.6H2	19	2	8	3	0.11	0.42	0.16
7.2H1	38	8	11	9	0.21	0.29	0.24
7.2H2	16	10	10	10	0.63	0.63	0.63
7.2H3	33	17	20	18	0.52	0.61	0.55
7.2H4	23	12	13	12	0.52	0.57	0.52
7.2H5	30	13	18	15	0.43	0.60	0.50
7.2L1	24	14	16	11	0.57	0.68	0.45
7.4H1	31	16	20	16	0.52	0.65	0.51
7.4H2	36	17	20	16	0.47	0.56	0.46
7.9H1	32	7	12	6	0.23	0.36	0.19
7.9H2	35	3	6	8	0.08	0.16	0.23
7.9H3	35	11	20	9	0.31	0.57	0.27
7.9H4	30	10	15	7	0.32	0.49	0.22
7.11H1	31	8	9	8	0.25	0.29	0.25
7.11H2	34	10	12	14	0.29	0.36	0.41
7.12L1	16	10	12	10	0.60	0.70	0.59
8.1H1	29	22	25	25	0.77	0.88	0.86
8.2H1	22	7	23	20	0.34	1.05	0.94
8.2L1	26	15	32	31	0.60	1.26	1.22

Reaktivitet av MS-R Fab'er med BSA-konjugerte A $\beta$ -heptapeptider 2-7 (AEFRHD), 17-22 (LVFFAE), 18-23 (VFFAED) og 19-24 (FFAEDV). Forholdene for ELISA-utlesninger (optisk tetthet) oppnådd med peptidkonjugert og ikke-konjugert BSA er gitt. Signalintensitetene som ble oppnådd med 17-22-, 18-23- og 19-24-peptidene er også

5 indikert i forhold til 2-7 peptidene.

**Tabell 7.**

MS-R IgG #	AEFRHD 2-7/BSA	LVFFAE 17-22/BSA	VFFAED 18-23/BSA	FFAEDV 19-24/BSA	Peptid forhold 17-22/2-7	Peptid forhold 18-23/2-7	Peptid forhold 19-24/2-7
3.3	17	11	16	11	0.65	0.94	0.65
7.12	19	11	13	11	0.58	0.68	0.58
8.1	16	7	16	14	0.44	1.00	0.88
3.4H7	22	3	16	15	0.14	0.73	0.68
7.9H2	13	5	8	6	0.38	0.62	0.46
7.9H3	13	6	8	6	0.46	0.62	0.46
7.9.H7	30	5	16	10	0.17	0.53	0.33
7.11H2	10	6	7	6	0.60	0.70	0.60
8.2.H2	18	10	15	14	0.56	0.83	0.78
3.6.H5x3.6.L2	11	7	9	8	0.64	0.82	0.73
7.11.H2x7.9.L1(L1)	14	8	10	9	0.57	0.71	0.64
8.2.H2x8.2.L1	13	20	25	25	1.54	1.92	1.92
<i>Muse mab</i>							
BAP-1	21	1	1	1	0.05	0.05	0.05
BAP-2	21	1	1	1	0.05	0.05	0.05
4G8	1	23	20	1	23	20	1
6E10	18	1	1	1	0.06	0.06	0.06
6F/3D*	1	1	1	1	1	1	1
Amy 33	16	2	1	3	0.13	0.06	0.19

Reaktivitet av MS-R IgG'er og musemonoklonale antistoffer BAP-1, BAP-2, 4G8, 6E10, Amy-33 og 6F/3D med BSA-konjugerte A $\beta$ -heptapeptider 2-7 (AEFRHD), 17-22 (LVFFAE), 18-23 (VFFAED) og 19-24 (FFAEDV). Forholdene for ELISA-  
5 utlesninger (optisk tetthet) oppnådd med peptidkonjugert og ikke-peptidkonjugert BSA er gitt. Signalintensitetene som ble oppnådd med 17-22-, 18-23- og 19-24-peptidene er også indikert i forhold til 2-7 peptidet.

\* Dette antistoff er spesifikt for sekvens 8-17 og gjenkjenner ikke N-terminalen eller midtepitopsekvenser.

10

### Eksempel 13: Kombinasjon av optimalisert H-CDR2 og L-CDR1 ved krysskloning

Den modulære konstruksjon av HuCAL-biblioteket tillater bytting av komplementaritetsbestemmende områder (CDR'er) av to forskjellige Fab-kodende gener i et enkelt kloningstrinn. For en ytterligere forbedring av affinitet ble de  
15 uavhengig optimaliserte H-CDR2 og L-CDR1 fra maturete kloner med den samme H-CDR3 kombinert, fordi det var en stor sannsynlighet for at denne kombinasjon ville føre

til en ytterligere gevinst av affinitet (Yang et al., 1995, J. Mol. Biol. 254, 392-403; Schier et al., 1996b, J. Mol. Biol. 263, 551-567; Chen et al., 1999, J. Mol. Biol. 293, 865-881). Hele lettkjeder eller fragmenter derav ble overført fra en L-CDR1 optimalisert donorklon til en H-CDR2 optimalisert reseptorklon. Donor- og  
 5 reseptorkloner ble kun kombinert dersom begge bar identiske H-CDR3-sekvenser. Alle donor- og reseptorkloner bar  $V_{H3}$ - $V_{\kappa 3}$  rammeverket.

10 Dette ble gjennomført ved overføring av hele lettkjeder fra den L-CDR1-optimaliserte donorklonen til den H-CDR2-optimaliserte reseptorklonen. Epitopspesifisitet ble bevart ved kun å kombinere kloner med de samme H-CDR3. Ved lettkjedeutbytting oppnådde en H-CDR2-optimalisert klon kun en optimalisert L-CDR1, dersom utbyttingen opptrådte mellom kloner med den samme L-CDR3. Hvis L-CDR3 fra klonene som skulle kombineres var forskjellige, oppnådde den H-CDR2-optimaliserte klon i tillegg til den optimaliserte L-CDR1, en ytterligere L-CDR3  
 15 (L-CDR2 forble HuCAL-konsensussekvensen (Knappik et al., 2000)), og når derivater av MS-Roche nr. 7.12 ble anvendt som donorer av lettkjede L-CDR1, ble 2 og 3 utbyttet med den H-CDR2-optimaliserte akseptorklon. Tre forskjellige kloningsstrategier ble anvendt:

20 1) Ved anvendelse av restriksjonsendonukleaser *Xba*I og *Sph*I ble hele antistofflettkjedefragmentet utskåret fra plasmid 1 (for eksempel pMx9\_Fab\_MS-Roche #7.11.H1\_FS) og den derved oppnådde vektorryggrad ble så ligert til lettkjedefragmentet av plasmid 2 (for eksempel pMx9\_Fab\_MS-Roche #7.2.L1\_FS) generert ved *Xba*I og *Sph*I digestering. Derved ble det skapt et nytt plasmid  
 25 (nomenklatur: pMx9\_Fab\_MS-Roche #7.11.H1x7.2.L1\_FS) som koder L-CDR1,2,3 av parental klon #7.2.L1 og H-CDR1,2,3 av parental klon #7.11.H1.

30 2) Ved anvendelse restriksjonsendonukleaser *Xba*I og *Acc*65I ble et L-CDR1 kodende fragment fra plasmid 1 skåret ut (for eksempel pMx9\_Fab\_MS-Roche #7.11.H2\_FS) og den derved oppnådde vektorryggrad ble så ligert til L-CDR1 fragmentet av plasmid 2 (for eksempel pMx9\_Fab\_MS-Roche #7.12.L1\_FS) generert ved *Xba*I og *Acc*65I. Derved ble et nytt plasmid skapt (nomenklatur: pMx9\_Fab\_MS-Roche #7.11.H2x7.12.L1(L-CDR1)\_FS) som koder L-CDR1 av parental klon #7.12.L1, mens L-CDR2,3 og H-CDR1,2,3 er avledet fra parental klon #7.11.H2.

35

3) Ved anvendelse restriksjonsendonukleaser *Xba*I og *Bam*HI ble et L-CDR1- og L-CDR2-kodende fragment skåret ut fra plasmid 1 (for eksempel pMx9\_Fab\_MS-

Roche #7.11.H2\_FS) og den derved oppnådde vektorryggrad ble så ligert til L-CDR1- og L-CDR2-fragmentet av plasmid 2 (for eksempel pMx9\_Fab\_MS-Roche #7.12.L1\_FS) generert ved *Xba*I- og *Bam*HI-digestering. Derved ble et nytt plasmid skapt (nomenklatur: pMx9\_Fab\_MS-Roche #7.11.H2x7.12.L1(L-CDR1+2)\_FS) som  
5 koder L-CDR1 og L-CDR2 av parental klon #7.12.L1, mens L-CDR3 og H-CDR1,2,3 er avledet fra parental klon #7.11.H2.

Illustrerende eksempler for de forskjellige kloningsstrategier så vel som for sekvensdonorer og reseptorkloner er gitt i tabell 8.

10

Etter storskalaekspresjon og rensing ble affinitetene bestemt på A $\beta$ (1-40) fibere. Videre er  $K_D$ -verdier for valgte kryssklonete MS-R Fab/antistoffer gitt i den vedlagte tabell 9.

85

Tabell 8.

Bindernavn	L-CDR1	pos.49	L-CDR2	pos.85	L-CDR3	H-CDR1	pos.47	H-CDR2	H-CDR3
------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

**kloningsstrategi 1)**      ↓      ↓

MS-Roche #7.11.H1	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPPH	GFTFSSY AMS	W	GINAAGFRYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche #7.2.L1	RASQYVDRTYLA	Y	GASSRAT	T	QQYSPFH	GFTFSSY AMS	W	AISGSGSSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche 7.11.H1x7.2.L1	RASQYVDRTYLA	Y	GASSRAT	T	QQYSPFH	GFTFSSY AMS	W	GINAAGFRYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV

**kloningsstrategi 2)**      ↓      ↓

85

MS-Roche #7.11.H2	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPPH	GFTFSSYAMS	W	AINANGYKYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche #7.12.L1	RASQYVFRRYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYGMS	W	NISGSGSSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche #7.11.H2x7.12.L1(LCDRI)	RASQYVFRRYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPPH	GFTFSSY AMS	W	AINANGYKYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV

**kloningsstrategi 3)**      ↓      ↓

MS-Roche #7.11.H2	RASQVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPPH	GFTFSSYAMS	W	AINANGYKYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche #7.12.L1	RASQYVFRRYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYGMS	W	NISGSGSSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche #7.11.H2x7.12.L1(LCDRI+2)	RASQYVFRRYLA	S	GSSNRAT	T	QQVYSPPH	GFTFSSYAMS	W	AINANGYKYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV

86

Tabell 8 fortsetter ...(side 2)

Bindernavn	L-CDR1	pos.49	L-CDR2	pos.85	L-CDR3	H-CDR1	pos.47	H-CDR2	H-CDR3
MS-Roche #3.6H5	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQIYNYPP	GFTFSSYAMS	W	AISESGKTKYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.6L2	RASQFLSRYLA	Y	GASSRAT	V	QQIYNYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGGGTTYADSVKG	LTHYARYRYFDV
<b>MS-Roche #3.6H5x3.6L2</b>	RASQFLSRYLA	Y	GASSRAT	V	QQIYNYPP	GFTFSSYAMS	W	AISESGKTKYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.6H8	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQIYNYPP	GFTFSSYAMS	W	AISEYSKFKYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.6L2	RASQFLSRYLA	Y	GASSRAT	V	QQIYNYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGGGTTYADSVKG	LTHYARYRYFDV
<b>MS-Roche #3.6H8x3.6L2</b>	RASQFLSRYLA	Y	GASSRAT	V	QQIYNYPP	GFTFSSYAMS	W	AISEYSKFKYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #7.4.H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQIYNFPH	GFTFSSYAMS	W	AINYNGARIYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRFDV
MS-Roche #7.2.L1	RASQYVDRTYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AISGGGTTYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRFDV
<b>MS-Roche #7.4.H2x7.2.L1</b>	RASQYVDRTYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AINYNGARIYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRFDV
MS-Roche #7.9H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	LQIYNMPI	GFTFSSYAMS	W	AINADGNRKYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRFDV
MS-Roche #7.12L2	RASQRFYKYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYGMS	W	NISGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRFDV
<b>MS-Roche #7.9H2x7.12L2</b>	RASQRFYKYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYAMS	W	AINADGNRKYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRFDV
MS-Roche #7.9H4	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	LQIYNMPI	GFTFSSYAMS	W	AINAVGMKKFYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRFDV
MS-Roche #7.12.L2	RASQRFYKYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYGMS	W	NISGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRFDV
<b>MS-Roche #7.9H4x7.12L2</b>	RASQRFYKYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYAMS	W	AINAVGMKKFYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRFDV

86

87

Tabell 8 fortsetter ... (side 3)

Bindernavn	L-CDR1	pos.49	L-CDR2	pos.85	L-CDR3	H-CDR1	pos.47	H-CDR2	H-CDR3
MS-Roche #7.1IH1	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPPH	GFTFSSYAMS	W	GINAAGFRITYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche #7.1L1	RASQRILRIYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPPH	GFTFSSYAMS	W	AISGGGGSTYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
<b>MS-Roche #7.1IH1x7.1L1</b>	RASQRILRIYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPPH	GFTFSSYAMS	W	GINAAGFRITYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche #7.1IH1	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPPH	GFTFSSYAMS	W	GINAAGFRITYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche #7.2L1	RASQYVDRITYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AISGGGGSTYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
<b>MS-Roche #7.1IH1x7.2L1</b>	RASQYVDRITYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	GINAAGFRITYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche #3.3H1	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	HQMSSYPP	GFTFSSYAMS	W	VISEKSRFIYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.4L9	RASRRIHVYYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGGGGSTYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
<b>MS-Roche #3.3H1x3.4L9</b>	RASRRIHVYYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	VISEKSRFIYYADSVKGG	LTHYARVRYFDV
MS-Roche #3.4H1	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISETSIRKYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.4L9	RASRRIHVYYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGGGGSTYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
<b>MS-Roche #3.4H1x3.4L9</b>	RASRRIHVYYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISETSIRKYYADSVKGG	LTHYARVRYFDV
MS-Roche #3.4H3	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	VISQIGRKIYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche #3.4L7	RASQRLGRLYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGGGGSTYYADSVKGG	LTHYARYRYFDV
<b>MS-Roche #3.4H3x3.4L7</b>	RASQRLGRLYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	VISQIGRKIYYADSVKGG	LTHYARVRYFDV

88

Tabell 8 fortsetter ...(side 4)

Bindernavn	L-CDR1	pos.49	L-CDR2	pos.85	L-CDR3	H-CDR1	pos.47	H-CDR2	H-CDR3
------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

MS-Roche #3.4H3	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	VISQTGRKIIYADSVKGG	LTHYARYYRYFDV
MS-Roche #3.4L9	RASRRIHVYILA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKGG	LTHYARYYRYFDV
<b>MS-Roche #3.4H3x3.4L9</b>	RASRRIHVYILA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	VISQTGRKIIYADSVKGG	LTHYARYYRYFDV

MS-Roche #3.4H7	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	VISETGKNIYYADSVKGG	LTHYARYYRYFDV
MS-Roche #3.4L9	RASRRIHVYILA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKGG	LTHYARYYRYFDV
<b>MS-Roche #3.4H7x3.4L9</b>	RASRRIHVYILA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	VISETGKNIYYADSVKGG	LTHYARYYRYFDV

MS-Roche #3.4H7	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	VISETGKNIYYADSVKGG	LTHYARYYRYFDV
MS-Roche #3.4L7	RASQRLGRLYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKGG	LTHYARYYRYFDV
<b>MS-Roche #3.4H7x3.4L7</b>	RASQRLGRLYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	VISETGKNIYYADSVKGG	LTHYARYYRYFDV

88

MS-Roche #3.6H5	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYPP	GFTFSSYAMS	W	AISESGKTKYYADSVKGG	LTHYARYYRYFDV
MS-Roche #3.6L1	RASQFIQRFYLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKGG	LTHYARYYRYFDV
<b>MS-Roche #3.6H5x3.6L1</b>	RASQFIQRFYLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYPP	GFTFSSYAMS	W	AISESGKTKYYADSVKGG	LTHYARYYRYFDV

MS-Roche #7.2H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AINGTGMKIIYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche #7.2L1	RASQYVDRTYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
<b>MS-Roche #7.2H2x7.2L1</b>	RASQYVDRTYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AINGTGMKIIYYADSVKGG	GKGNTHKPYGYVRYFDV

Tabell 8 fortsetter ... (side 5)

Bindernavn	L-CDR1	pos.49	L-CDR2	pos.85	L-CDR3	H-CDR1	pos.47	H-CDR2	H-CDR3
MS-Roche #7.4H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQIYNFPH	GFTFSSYAMS	W	AINYNGARIYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche #7.12L2	RASQRFFKYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYGMS	W	NISGSGSYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
<b>MS-Roche #7.4H2x7.12L2</b>	RASQRFFKYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYAMS	W	AINYNGARIYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche #7.9H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	LQIYNMPI	GFTFSSYAMS	W	AINADGNRKYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche #7.2L1	RASQYVDRTYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AISGSGSYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
<b>MS-Roche #7.9H2x7.2L1</b>	RASQYVDRTYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AINADGNRKYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche #7.11H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPPH	GFTFSSYAMS	W	AINANGYKYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche #7.2L1	RASQYVDRTYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AISGSGSYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
<b>MS-Roche #7.11H2x7.2L1</b>	RASQYVDRTYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AINANGYKYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche #7.9H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	LQIYNMPI	GFTFSSYAMS	W	AINADGNRKYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche #7.12L1	RASQYVFRRYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYGMS	W	NISGSGSYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
<b>MS-Roche #7.9H2x7.12L1</b>	RASQYVFRRYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYAMS	W	AINADGNRKYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche #7.11H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPPH	GFTFSSYAMS	W	AINANGYKYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche #7.9L1	RASQRLSPRYLA	Y	GASSRAT	T	LQIYNMPI	GFTFSSYAMS	W	AISGSGSYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
<b>MS-Roche #7.11H2x7.9L1</b>	RASQRLSPRYLA	Y	GASSRAT	T	LQIYNMPI	GFTFSSYAMS	W	AINANGYKYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV

Tabell 8 fortsetter ...(side 6)

Bindernavn	L-CDR1	pos.49	L-CDR2	pos.85	L-CDR3	H-CDR1	pos.47	H-CDR2	H-CDR3
MS-Roche #8.1H1	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQLSNYPP	GFTFSSYAMS	W	AISRSGSNIYYADSVKVG	LLSRGYNGYYHKKFDV
MS-Roche #8.2L1	RASQVSGRYLA	Y	GASSRAT	T	QQLSSYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKVG	LLSRGYNGYYHKKFDV
<b>MS-Roche #8.1Hx8.2L1</b>	RASQVSGRYLA	Y	GASSRAT	T	QQLSSYPP	GFTFSSYAMS	W	AISRSGSNIYYADSVKVG	LLSRGYNGYYHKKFDV
MS-Roche #7.11H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPPH	GFTFSSYAMS	W	ADNANGYKKYYADSVKVG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche #7.12L1	RASQYVFRRYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYGMS	W	NISGSGSSTYYADSVKVG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
<b>MS-Roche #7.11H2x7.12L1</b>	RASQYVFRRYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYAMS	W	ADNANGYKKYYADSVKVG	GKGNTHKPYGYVRYFDV

Pilene i tabell 8 antyder lokasjonen av restriksjonsenzymseter anvendt for digestering av tilsvarende plasmider.

**Tabell 9.**

MS-R #	$K_D$ A $\beta$ <sub>1-40</sub> nM	$K_D$ A $\beta$ <sub>1-42</sub> nM
3.3H1x3.4L9	2,16	2,97
3.4H1x3.4L9	0,25	0,5
3.4H3x3.4L7	0,92	0,92
3.4H3x3.4L9	1,05	0,93
3.4H7x3.4L9	2,66	3,51
3.4H7x3.4L7	1,19	1,23
3.6H5x3.6L1	1,25	1,04
3.6H5x3.6L2	1,26	0,84
7.2H2x7.2L1	1,29	1,43
7.4H2x7.2L1	1,4	1,4
7.4H2x7.12L2	1,4	1,8
7.9H2x7.2L1 (L1)	1,4	1,4
7.9H2x7.12L1	1,2	1,1
7.9H2x7.12L2(L1+2)	0,4	0,4
7.11 H1x7.2L1	1,75	1,39
7.11H1x7.11L1	0,41	0,47
7.11H2x7.2L1(L1)	1	0,6
7.11H2x7.9L1 (L1)	0,1	1
8.1 H1x8.2L1	1,3	1,6

$K_D$ -verdier for kryssklonet MS-R Fab-binding til A $\beta$ <sub>1-40</sub>- og A $\beta$ <sub>1-42</sub>-fibere som bestemt ved Biacore. Tilberedningen av kryssklonete Fab'er er beskrevet i eksempel 13.

- 5  $K_D$ -verdiene ble bestemt ved kinetisk kurvetilpasning og korrigeret for innholdet av aktivt Fab til stede i hver prøve, som beskrevet i teksten. Noen Fab'ene ble i tillegg rensed ved størrelseseksklusjonskromatografi eller preparativ ultrasentrifugering for å fjerne aggregert materiale. (L1), den H-CDR2-matureerte akseptorklon fikk kun L-CDR1 fra den L-CDR1-forbedrete donorklon; (L1+2), den H-CDR2-matureerte reseptorklon
- 10 fikk L-CDR1+2 fra den L-CDR1-forbedrete donorklon.

**Eksempel 14: *In vivo* amyloid plakkdekorering i en musemodell av Alzheimers sykdom, som avdekket ved konfokal laserskanningsmikroskopi og kolokaliseringsanalyse.**

Valgte MS-R IgG1-antistoffer ble testet i APP/PS2 dobbelttransgene mus (referanse: Richards et al., Soc. Neurosci. Abstr., bind 27, program nr. 5467, 2001) på amyloid plakkdekorering *in vivo*. Antistoffene (1 mg/mus) ble tilført intravenøst og etter 3 dager ble hjernene perfusert ved saltoppløsning og preparert for kryosnitt. I en annen studie ble musene eksponert til høyere konsentrasjoner av antistoffene, dvs. 2 mg injisert intravenøst dag 0, 3 og 6, og dyrene ble avlivet dag 9. Nærværet av antistoffer bundet til amyloide plakk ble bedømt på ikke-fikserte kryostatsnitt ved dobbeltmerket, indirekte immunfluorescens ved anvendelse av geiteantihumant IgG (H+L) konjugert til Cy3 (#109-165-003, Jackson Immuno Research) fulgt av BAP-2-Alexa488 immunkonjugat. Avbildning ble gjort ved konfokal lasermikroskopi og bildeprosessering for kvantitativ påvisning av kolokaliseringer ved IMARIS- og COLOCALIZATION-program (Bitplane, Sveits). Typiske eksempler er gitt i figurene 10-14. Alle av de testete MS-R antistoffer ble funnet positive ved immundekorering av amyloide plakk *in vivo*, selv om en viss variabilitet ble bemerket.

**Eksempel 15: Undersøkelse av binding av forskjellige monoklonale antistoffer til amyloid forløperprotein (APP) på overflaten av HEK293-celler.**

APP er utstrakt uttrykt i det sentrale nervesystem. Binding av antistoff til celleoverflate APP kan føre til komplementaktivering og celledestruering i sunne hjerneområder. Derfor er det avgjørende for terapeutiske A $\beta$ -antistoffer å være fri for reaktivitet mot APP. Høyaffinitetsantistoffer mot N-terminalt doméne av A $\beta$  (for eksempel BAP-1, BAP-2) gjenkjenner den respektive epitop også i rammeverket av APP. I motsetning til dette er antistoffene mot midtepitopen (for eksempel 4G8), og antistoffene ifølge oppfinnelsen, overraskende ikke i stand til å gjenkjenne celleoverflate-APP. Således er antistoffene ifølge oppfinnelsen som dekorerer A $\beta$ , men ikke APP *in vivo*, overlegene ikke-selektive antistoffer.

Fremgangsmåten som omfatter cytometri er velkjent i teknikken. Relative enheter for fluorescens (FL1-H) målt ved strømningscytometri, antyder celleoverflatebinding av det respektive antistoff. Et fluorescensskift på APP-transfektete HEK293, sammenliknet med ikke-transfektete HEK293-celler, antyder den uønskete reaksjon med celleoverflate-APP. Som eksempel viser antistoffene BAP-1 og BAP-2 mot N-terminalt doméne, et betydelig skift av FL-1-signal i HEK293/APP (tykk linje), sammenliknet med ikke-transfektete HEK293-celler (stiplet linje). 4G8-antistoffet (spesifikt for

midtre A $\beta$ -epitopen) og alle antistoffene ifølge oppfinnelsen (spesifikke for N-terminale- og midt-A $\beta$ -epitoper) viser intet betydelig skift i fluorescens. Differanser i basal fluorescens mellom HE293/APP- og HEK293-celler skyldes forskjellig celledørrelse. Et FACScan-instrument ble anvendt i kombinasjon med Cellquest Pro  
5 programpakken (begge Becton Dickinson).

**Eksempel 16: Liste av identifiserte SEKV. ID numre relatert til oppfinnelsens antistoffmolekyler.**

Tabell 10 angår sekvenser som definert her for visse spesifikke antistoffmolekyler  
10 ifølge oppfinnelsen.

**Tabell 10. Identifisering av SEKV. ID numre for parentale antistoffer, så vel som optimaliserte, maturerte og/eller kryssklonete antistoffmolekyler.**

Molekyl nr.	VH prot	VL prot	VH DNA	VL DNA	HCDR3 prot	HCDR3 DNA	LCDR3 prot	LCDR3 DNA
3	4	10	3	9	22	21	16	15
7	6	12	5	11	24	23	18	17
8	8	14	7	13	26	25	20	19
3.6H5 x 3.6L2	33	47	32	46	61	60	75	74
3.6H8 x 3.6L2	35	49	34	48	63	62	77	76
7.4H2 x 7.2L1	37	51	36	50	65	64	79	78
7.9H2 x 7.12L2	39	53	38	52	67	66	81	80
7.9H4 x 7.12L2	41	55	40	54	69	68	83	82
7.11H1 x 7.11L1	43	57	42	56	71	70	85	84
7.11H1 x 7.2L1	45	59	44	58	73	72	87	86
7.9H7	89	91	88	90	93	92	95	94
3.3H1 x 3.4L9	295	325	294	324	355	354	385	384
3.4H1 x 3.4L9	297	327	296	326	357	356	387	386
3.4H3 x 3.4L7	299	329	298	328	359	358	389	388
3.4H3 x 3.4L9	301	331	300	330	361	360	391	390
3.4H7 x 3.4L9	303	333	302	332	363	362	393	392
3.4H7 x 3.4L7	305	335	304	334	365	364	395	394
3.6H5 x 3.6L1	307	337	306	336	367	366	397	396
7.2H2 x 7.2L1	309	339	308	338	369	368	399	398
7.4H2 x 7.12L2	311	341	310	340	371	370	401	400
7.9H2 x 7.2L1	313	343	312	342	373	372	403	402
7.9H2 x 7.12L1	315	345	314	344	375	374	405	404
7.11H2 x 7.2L1	317	347	316	346	377	376	407	406
7.11H2 x 7.9L1	319	349	318	348	379	378	409	408
7.11H2 x 7.12L1	321	351	320	350	381	380	411	410
8.1H1x8.2L1	323	353	322	352	383	382	413	412

P a t e n t k r a v

1.  
 Antistoffmolekyl i stand til spesifikt å gjenkjenne to områder av  $\beta$ -A4 peptid/A $\beta$ 4,  
 5 k a r a k t e r i s e r t v e d at det første området omfatter aminosyresekvensen  
 AEFRHDSGY som vist SEKV. ID nr. 1 eller et fragment derav, og der det andre  
 området omfatter aminosyresekvensen VHHQKLVFFAEDVG som vist i SEKV. ID nr.  
 2 eller et fragment derav, hvori nevnte antistoff molekyl omfatter
- a) en variabel VL- region omfattende komplementære bestemmende regioner,  
 10 L-CDR1, L-CDR2 og L-CDR3, hvor
- i) L-CDR1 omfatter SEKV ID nr.143;  
 ii) L-CDR2 omfatter SEKV ID nr.144 og  
 iii) L-CDR3 omfatter SEKV ID nr.95 og
- b) en variabel VH-region omfattende komplementære bestemmende regioner,  
 15 H-CDR1, H-CDR2 og H-CDR3 der
- i) H-CDR1 omfatter SEKV ID nr.146;  
 ii) H-CDR2 omfatter SEKV ID nr.192 og  
 iii) H-CDR3 omfatter SEKV ID nr.93.
- 20 2.  
 Antistoffmolekyl ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at antistoffmolekylet  
 gjenkjenner minst to konsekutive aminosyrer innen de to områdene av  $\beta$ -A4.
3.  
 25 Antistoffmolekyl ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at  
 antistoffmolekylet gjenkjenner i det første område en aminosyresekvens omfattende:  
 AEFRHD, EF, EFR, FR, EFRHDSG, EFRHD eller HDSG og i det andre området en  
 aminosyresekvens omfattende: HHQKL, LV, LVFFAE, VFFAED eller VFFA,  
 FFAEDV.
- 30 4.  
 Antistoffmolekyl ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, k a r a k t e r i s e r t  
 v e d at antistoffmolekylet omfatter et variabelt VH-område som vist i SEKV. ID nr.  
 89 og et variabelt VL-område som vist i SEKV. ID nr. 91.
- 35 5.  
 Antistoffmolekyl ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, k a r a k t e r i s e r t

v e d at antistoffmolekylet omfatter et variabelt VH-område som kodet av et nukleinsyremolekyl som vist i et SEKV. ID nr. 88 et variabelt VL-område kodet for av et nukleinsyremolekyl som vist i SEKV ID nr. 90.

5 6.

Antistoffmolekyl ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at antistoffmolekylet er et fullstendig antistoff (immunoglobulin), et F(ab)-fragment, et F(ab)<sub>2</sub>-fragment, et enkelt kjede antistoff, et kimært antistoff, et CDR-podet antistoff, en bivalent antistoff-kontruksjon, et syntetisk antistoff eller et kryssklonet  
10 antistoff.

7.

Antistoffmolekyl ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at minst to områder av  $\beta$ -A4 danner et konformasjonsepitop eller et  
15 diskontinuerlig epitop.

8.

Nukleinsyremolekyl, k a r a k t e r i s e r t v e d at det koder et antistoffmolekyl ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7.

20

9.

Vektor, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter nukleinsyremolekylet ifølge krav 8.

25 10.

Vertscelle, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter vektoren ifølge krav 9.

11.

Fremgangsmåte for fremstilling av et antistoffmolekyl ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter dyrking av vertscellen ifølge krav 10 under betingelser som tillater syntese av antistoffmolekylet, og gjenvinning av antistoffmolekylet fra kulturen.

35 12.

Preparat, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et antistoffmolekyl i følge et hvilket som helst av kravene 1-7 eller et antistoff molekyl produsert ved fremgangsmåten i følge krav 11.

13.

Preparat i følge krav 12, k a r a k t e r i s e r t v e d at det er et farmasøytisk eller diagnostisk preparat.

5

14.

Anvendelse av et antistoffmolekyl ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, eller et antistoffmolekyl fremstilt ved fremgangsmåten ifølge krav 11, eller et nukleinsyremolekyl ifølge krav 8, eller en vektor ifølge krav 9, eller en vert ifølge krav 10 for fremstilling av et farmasøytisk preparat for forebygging og/eller behandling av en sykdom assosiert med amyloidogenese og/eller amyloid plakkdannelse.

15.

Farmasøytiskpreparat, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et antistoffmolekyl i følge et hvilket som helst av kravene 1-7 eller et antistoff molekyl produsert ved fremgangsmåten i følge krav 11, eller et nukleinsyremolekyl ifølge krav 8, eller en vektor ifølge krav 9, eller en vert ifølge krav 10 for anvendelse i forebygging og/eller behandling av en sykdom assosiert med amyloidogenese og/eller amyloid plakkdannelse.

20

16.

Anvendelse av et antistoffmolekyl ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, eller et antistoffmolekyl fremstilt ved fremgangsmåten ifølge krav 11 for fremstilling av et diagnostisk preparat for påvisning av en sykdom assosiert med amyloidogenese og/eller amyloid plakkdannelse.

25

17.

Diagnostisk preparat, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et antistoffmolekyl ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, eller et antistoffmolekyl fremstilt ved fremgangsmåten ifølge krav 11, for anvendelse i deteksjon av en sykdom assosiert med amyloidogenese og/eller amyloid plakkdannelse.

30

18.

Anvendelse av et antistoffmolekyl ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, eller et antistoffmolekyl fremstilt ved fremgangsmåten ifølge krav 11 for fremstilling av et farmasøytisk preparat for disintegrasjon av  $\beta$ - amyloide plakk.

35

19.

Farmasøytisk preparat, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et antistoffmolekyl ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, eller et antistoffmolekyl fremstilt ved fremgangsmåten ifølge krav 11 for anvendelse i disintegrasjonen av  $\beta$ -amyloide plakk.

20.

Anvendelse av et antistoffmolekyl ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, eller et antistoffmolekyl fremstilt ved fremgangsmåten ifølge krav 11 for fremstilling av et farmasøytisk preparat for passiv immunisering mot  $\beta$ -amyloide plakk dannelse.

21.

Farmasøytisk preparat, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et antistoffmolekyl ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, eller et antistoffmolekyl fremstilt ved fremgangsmåten ifølge krav 11 for anvendelse i passiv immunisering mot  $\beta$ -amyloide plakk dannelse.

22.

Anvendelse av et hvilket som helst av kravene 14, 16, 18 eller 20, eller det farmasøytiske preparatet i følge krav 15 eller 16, eller det diagnostiske preparatet i følge krav 17, hvori nevnte sykdom er demens, Alzheimers sykdom, motor neuropati, Downs syndrom, Creutzfeld Jacobs sykdom, arvelig cerebral hemorhage med amyloidosis nederlandsk type, Parkinsons sykdom, HIV relatert demens, ALS eller neuronal forstyrrelse relatert til alder.



Fig. 1a

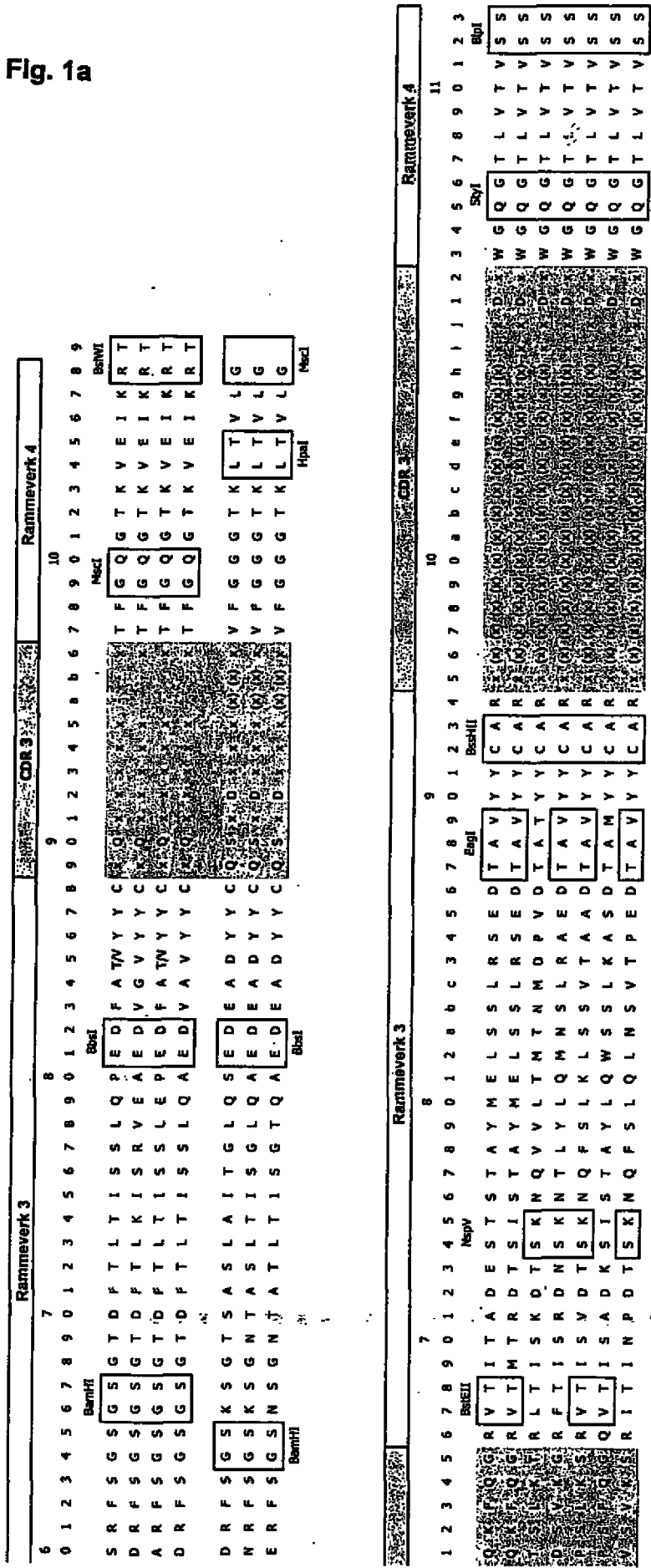
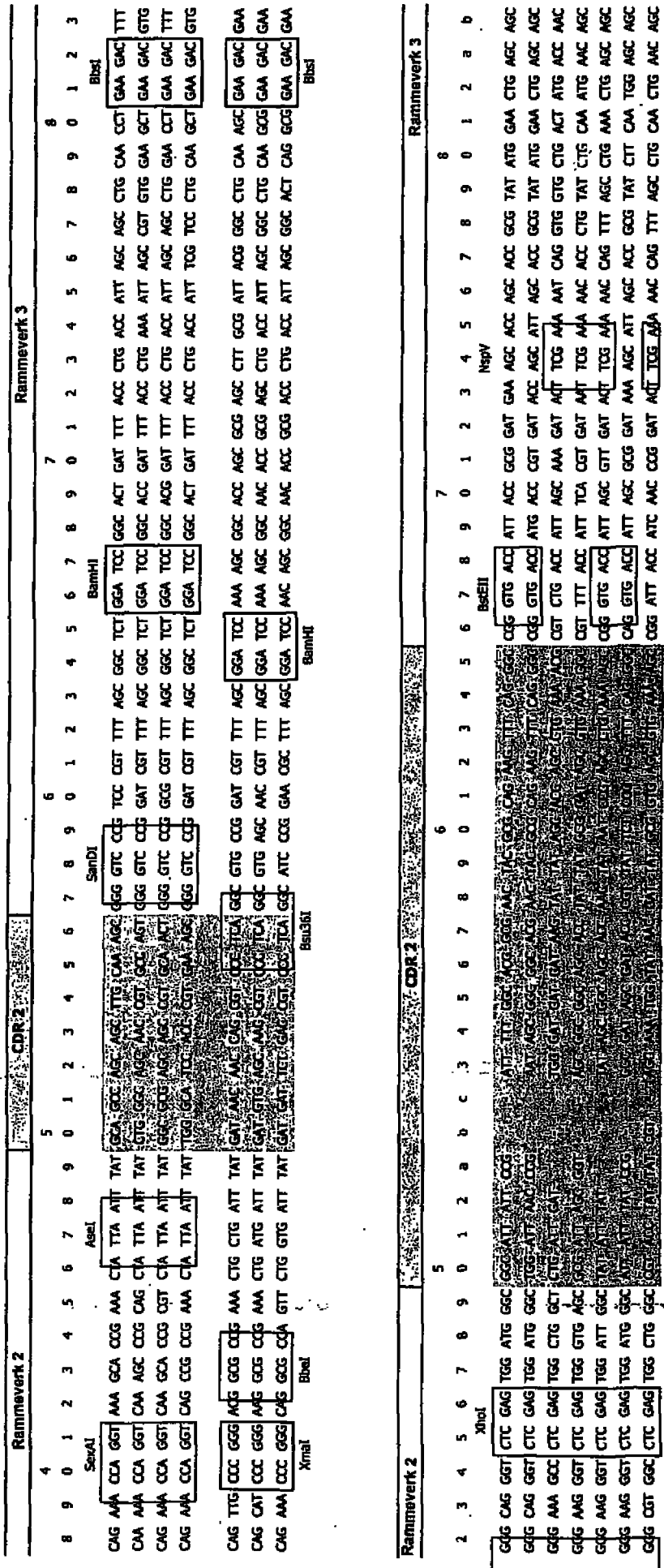




Fig. 1b



5/43

Fig. 1b

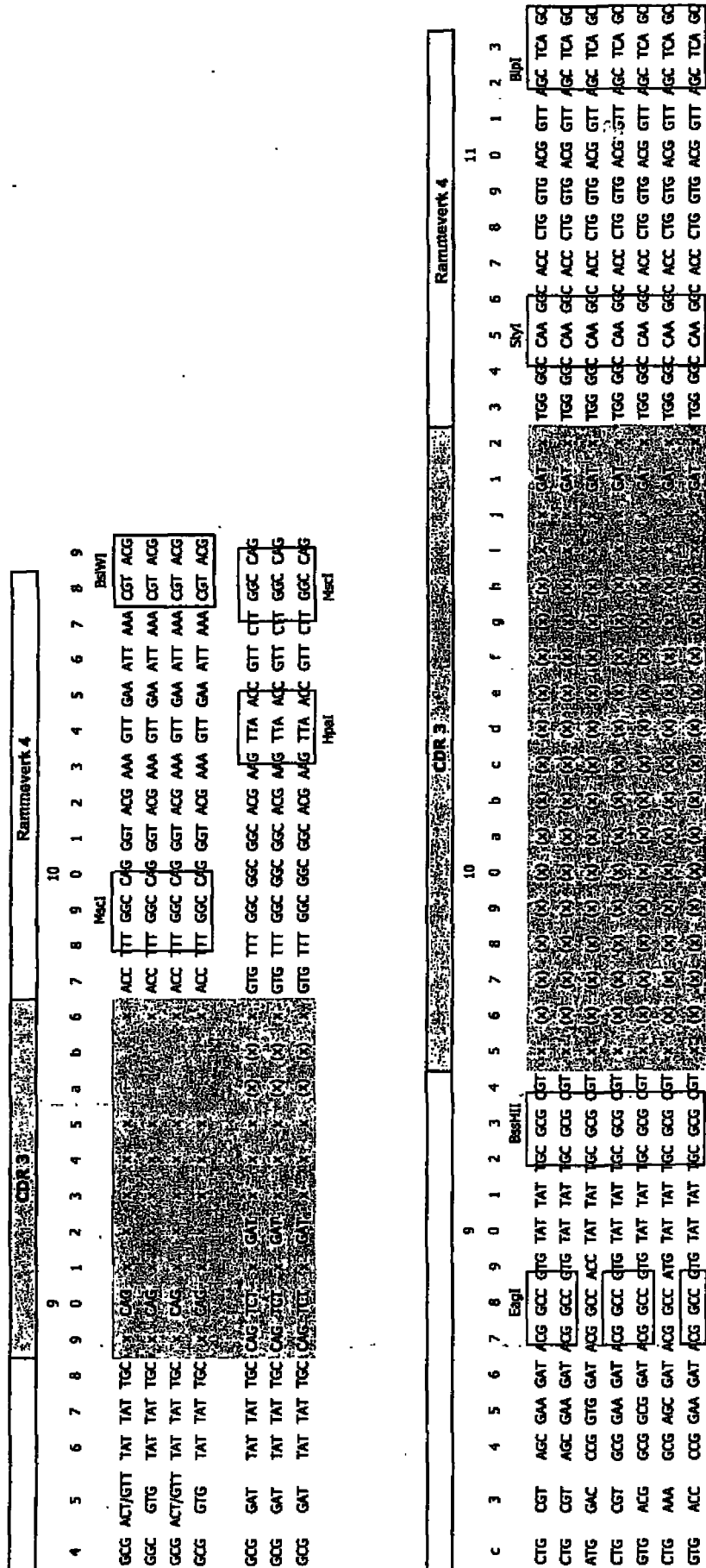
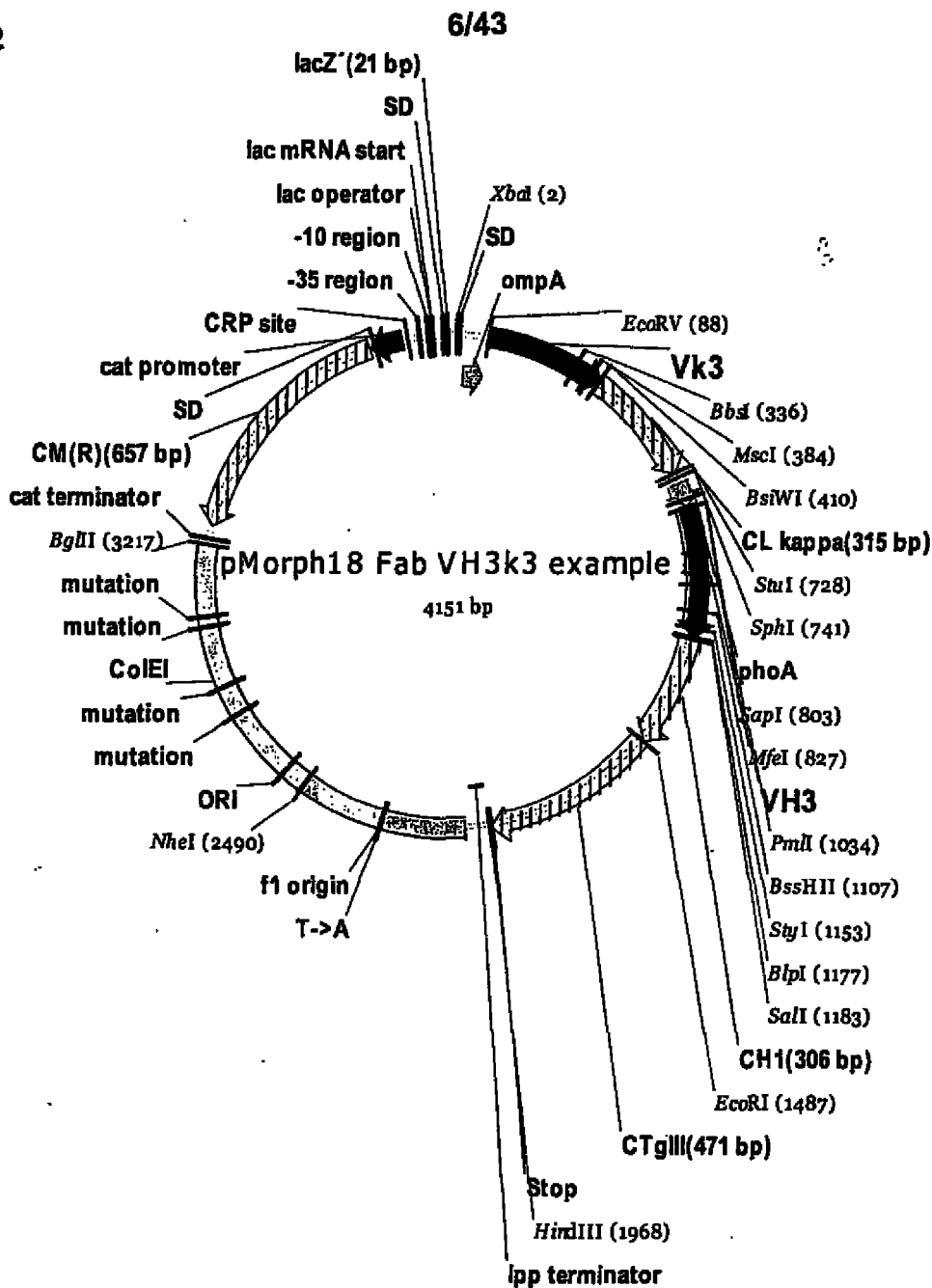


Fig. 2



```

lacZ'      SD      ompA
-----
XbaI
-----
      M K K T A I A I A V
1 TCTAGATAAC GAGGGCAAAA AATGAAAAAG ACAGCTATCG CGATTGCAGT
  AGATCTATTG CTCCCCTTTT TTA CTTTTC TGTCGATAGC GCTAACGTCA
                                     Vk3
-----
      ompA
-----
                                     EcoRV
-----
  A L A G F A T V A Q A D I V L T Q
51 GGC ACTGGCT GGTTCGCTA CCGTAGCGCA GGCCGATATC GTGCTGACCC
  
```

## 7/43 Fig. 2

CCGTGACCGA CCAAAGCGAT GGCATCGCGT CCGGCTATAG CACGACTGGG  
Vk3

-----  
· S P A T L S L S P G E R A T L S  
101 AGAGCCCCGGC GACCCTGAGC CTGTCTCCGG GCGAACGTGC GACCCTGAGC  
TCTCGGGCCG CTGGGACTCG GACAGAGGCC CGCTTGCACG CTGGGACTCG  
Vk3

-----  
C R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q  
151 TGCAGAGCGA GCCAGAGCGT GAGCAGCAGC TATCTGGCGT GGTACCAGCA  
ACGTCTCGCT CGGTCTCGCA CTCGTCTGTCG ATAGACCGCA CCATGGTCGT  
Vk3

-----  
· K P G Q A P R L L I Y G A S S R A  
201 GAAACCAGGT CAAGCACCGC GTCTATTAAT TTATGGCGCG AGCAGCCGTG  
CTTTGGTCCA GTTCGTGGCG CAGATAATTA AATACCGCGC TCGTCGGCAC  
Vk3

-----  
· T G V P A R F S G S G S G T D F  
251 CAACTGGGGT CCCGGCGCGT TTAGCGGCT CTGGATCCGG CACGGATTTT  
GTTGACCCCA GGGCCGCGCA AAATCGCCGA GACCTAGGCC GTGCCTAAAA  
Vk3

-----  
BbsI  
-----

T L T I S S L E P E D F A V Y Y C  
301 ACCCTGACCA TTAGCAGCCT GGAACCTGAA GACTTTGCGG TGTATTATTG  
TGGGACTGGT AATCGTCGGA CCTTGGACTT CTGAAACGCC ACATAATAAC  
Vk3

-----  
MscI  
-----

· Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E  
351 CCAGCAGCAT TATACCACCC CGCCGACCTT TGGCCAGGGT ACGAAAGTTG  
GGTCGTCGTA ATATGGTGGG GCGGCTGGAA ACCGGTCCCA TGCTTTCAAC  
CL kappa

-----  
Vk3  
-----

BsiWI  
-----

· I K R T V A A P S V F I F P P S  
401 AAATTAACG TACGGTGGCT GCTCCGAGCG TGTTTATTTT TCCGCCGAGC  
TTTAATTTGC ATGCCACCGA CGAGGCTCGC ACAAATAAAA AGGCGGCTCG  
CL kappa

-----  
D E Q L K S G T A S V V C L L N N  
451 GATGAACAAC TGAAAAGCGG CACGGCGAGC GTGGTGTGCC TGCTGAACAA  
CTACTTGTG ACTTTTCGCC GTGCCGCTCG CACCACACGG ACGACTTGT  
CL kappa

-----  
· F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q  
501 CTTTTATCCG CGTGAAGCGA AAGTTCAGTG GAAAGTAGAC AACCGCTGC  
GAAAATAGGC GCACTTCGCT TTCAAGTCAC CTTTCATCTG TTGCGCGACG  
CL kappa

-----  
· S G N S Q E S V T E Q D S K D S  
551 AAAGCGCAA CAGCCAGGAA AGCGTGACCG AACAGGATAG CAAAGATAGC  
TTTCGCCGTT GTCGGTCCTT TCGCACTGGC TTGTCCTATC GTTTCATCG  
CL kappa  
-----



## 9/43 Fig. 2

-----  
 · Y C A R W G G D G F Y A M D Y W G ·  
 1101 TTATTGCGCG CGTTGGGGCG GCGATGGCTT TTATGCGATG GATTATTGGG  
 AATAACGCGC GCAACCCCGC CGCTACCGAA AATACGCTAC CTAATAACCC  
 CH1  
 -----  
 VH3  
 -----  
 StyI BspI  
 -----  
 · Q G T L V T V S S A S T K G P S  
 1151 GCCAAGGCAC CCTGGTGACG GTTAGCTCAG CGTCGACCAA AGGTCCAAGC  
 CGGTTCCGTG GGACCACTGC CAATCGAGTC GCAGCTGGTT TCCAGGTTCC  
 CH1  
 -----  
 V F P L A P S S K S T S G G T A A  
 1201 GTGTTTCCGC TGGCTCCGAG CAGCAAAGC ACCAGCGGCG GCACGGCTGC  
 CACAAAGGCG ACCGAGGCTC GTCGTTTTCG TGGTCGCCGC CGTGCCGACG  
 CH1  
 -----  
 · L G C L V K D Y F P E P V T V S W ·  
 1251 CCTGGGCTGC CTGGTTAAAG ATTATTTCCT GGAACCAGTC ACCGTGAGCT  
 GGACCCGACG GACCAATTC TAATAAAGG CCTTGGTCAG TGGCACTCGA  
 CH1  
 -----  
 · N S G A L T S G V H T F P A V L  
 1301 GGAACAGCGG GCGCTGACC AGCGGCGTGC ATACCTTTCC GGCGGTGCTG  
 CCTTGTCGCC CCGCGACTGG TCGCCGACG TATGGAAAG CCGCCACGAC  
 CH1  
 -----  
 Q S S G L Y S L S S V V T V P S S  
 1351 CAAAGCAGCG GCCTGTATAG CCTGAGCAGC GTTGTGACCG TGCCGAGCAG  
 GTTTCGTGCG CGACATATC GGACTCGTCG CAACACTGGC ACGGCTCGTC  
 CH1  
 -----  
 · S L G T Q T Y I C N V N H K P S N ·  
 1401 CAGCTTAGGC ACTCAGACCT ATATTTGCAA CGTGAACCAT AAACCGAGCA  
 GTCGAATCCG TGAGTCTGGA TATAAACGTT GCACTTGGTA TTTGGCTCGT  
 CH1 CTgIII  
 -----  
 EcoRI  
 -----  
 · T K V D K K V E P K S E F G G G  
 1451 ACACCAAAGT GGATAAAAAA GTGGAACCGA AAAGCGAATT CGGGGGAGGG  
 TGTGGTTTTCA CCTATTTTTT CACCTTGGCT TTTCGCTTAA GCCCCCTCCC  
 CTgIII  
 -----  
 S G S G D F D Y E K M A N A N K G  
 1501 AGCGGGAGCG GTGATTTTGA TTATGAAAAG ATGGCAAACG CTAATAAGGG  
 TCGCCCTCGC CACTAAACT AATACTTTC TACCGTTGC GATTATCCC  
 CTgIII  
 -----  
 · A M T E N A D E N A L Q S D A K G ·  
 1551 GGCTATGACC GAAAATGCCG ATGAAAACGC GCTACAGTCT GACGCTAAAG  
 CCGATACTGG CTTTTACGGC TACTTTTGGC CGATGTCAGA CTGCGATTTC  
 CTgIII  
 -----  
 · K L D S V A T D Y G A A I D G F  
 1601 GCAAACCTGA TTCTGTGCT ACTGATTACG GTGCTGCTAT CGATGGTTTC

## 10/43 Fig. 2

CGTTTGA ACT AAGACAGCGA TGACTAATGC CACGACGATA GCTACCAAAG  
CTgIII

-----  
I G D V S G L A N G N G A T G D F  
1651 ATTGGTGACG TTTCCGGCCT TGCTAATGGT AATGGTGCTA CTGGTGATT  
TAACCACTGC AAAGGCCGGA ACGATTACCA TTACCACGAT GACCACTAAA  
CTgIII

-----  
A G S N S Q M A Q V G D G D N S P  
1701 TGCTGGCTCT AATCCCAA TGGCTCAAGT CGGTGACGGT GATAATTCAC  
ACGACCGAGA TTAAGGGTTT ACCGAGTTCA GCCACTGCCA CTATTAAGTG  
CTgIII

-----  
L M N N F R Q Y L P S L P Q S V  
1751 CTTAATGAA TAATTTCCGT CAATATTTAC CTTCCCTCCC TCAATCGGTT  
GAAATTA CTT ATTAAGGCA GTTATAAATG GAAGGGAGGG AGTTAGCCAA  
CTgIII

-----  
E C R P F V F G A G K P Y E F S I  
1801 GAATGTCGCC CTTTTGTCTT TGGCGCTGGT AAACCATATG AATTTTCTAT  
CTTACAGCGG GAAAACAGAA ACCGCGACCA TTTGGTATAC TTAAAAGATA  
CTgIII

-----  
D C D K I N L F R G V F A F L L Y  
1851 TGATTGTGAC AAAATAAACT TATTCCTGGT TGTCTTTGCG TTTCTTTTAT  
ACTAACACTG TTTTATTTGA ATAAGGCACC ACAGAAACGC AAAGAAAATA  
CTgIII

-----  
V A T F M Y V F S T F A N I L R  
1901 ATGTTGCCAC CTTTATGTAT GTATTTTCTA CGTTTGCTAA CATACTGCGT  
TACAACGGTG GAAATACATA CATAAAAGAT GCAAACGATT GTATGACGCA  
CTgIII

-----  
Stop lpp terminator  
-----

HindIII  
-----

N K E S  
1951 AATAAGGAGT CTTGATAAGC TTGACCTGTG AAGTGAAAAA TGGCGCAGAT  
TTATTCCTCA GAACATATCG AACTGGACAC TTCACTTTTT ACCGCGTCTA  
lpp terminator

-----  
2001 TGTGCGACAT TTTTTTTGTC TGCCGTTTAA TGAAATTTGTA AACGTTAATA  
ACACGCTGTA AAAAAACAG ACGGCAAATT ACTTTAACAT TTGCAATTAT

f1 origin

2051 TTTTGTAAA ATTCGCGTTA AATTTTGTG AAATCAGCTC ATTTTTTAAC  
AAAACAATTT TAAGCGCAAT TTAAAAACAA TTTAGTCGAG TAAAAATTG

f1 origin

2101 CAATAGGCCG AAATCGGCAA AATCCCTTAT AAATCAAAAAG AATAGACCGA  
GTTATCCGGC TTTAGCCGTT TTAGGGAATA TTTAGTTTTC TTATCTGGCT

f1 origin

2151 GATAGGGTTG AGTGTGTTC CAGTTTGGA CAAGAGTCCA CTATTAAGA  
CTATCCCAAC TCACAACAAG GTCAAACCTT GTTCTCAGGT GATAATTTCT

f1 origin

2201 ACGTGGACTC CAACGTCAAA GGGCGAAAAA CCGTCTATCA GGGCGATGGC  
TGCACCTGAG GTTGCAGTTT CCCGCTTTTT GGCAGATAGT CCCGCTACCG

11/43

f1 origin

Fig. 2

T-&gt;A

```

2251  CCACTACGAG AACCATCACC CTAATCAAGT TTTTGGGGT CGAGGTGCCG
      GGTGATGCTC TTGGTAGTGG GATTAGTTCA AAAAACCCCA GCTCCACGGC
-----
                        f1 origin
2301  TAAAGCACTA AATCGGAACC CTAAGGGAG CCCCCGATTT AGAGCTTGAC
      ATTTCTGTGAT TTAGCCTTGG GATTTCCCTC GGGGGCTAAA TCTCGAACTG
-----
                        f1 origin
2351  GGGGAAAGCC GGCGAACGTG GCGAGAAAGG AAGGGAAGAA AGCGAAAGGA
      CCCCTTTCGG CCGCTTGCAC CGCTCTTTC TCCCTTCTT TCGCTTTCCT
-----
                        f1 origin
2401  GCGGGCGCTA GGGCGCTGGC AAGTGTAGCG GTCACGCTGC GCGTAACCAC
      CGCCCGGAT CCCGCGACCG TTCACATCGC CAGTGCAGC CGCATTGGTG
-----
                        f1 origin
                                           NheI
2451  CACACCCGCC GCGCTTAATG CGCCGCTACA GGGCGCGTGC TAGCCATGTG
      GTGTGGGCGG CGCGAATTAC GCGCGATGT CCCGCGCAG ATCGGTACAC
-----
                        f1 origin
                                           ColEI
2501  AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAGGCC GCGTTGCTGG
      TCGTTTTCCG GTCGTTTCC GGTCCCTGGC ATTTTTCCGG CGCAACGACC
-----
                        ColEI
ORI
2551  CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC
      GCAAAAAGGT ATCCGAGGCG GGGGACTGC TCGTAGTGT TTAGCTGCG
-----
                        ColEI
2601  TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT
      AGTTCAGTCT CCACCGCTTT GGGCTGTCT GATATTTCTA TGGTCCGCAA
-----
                        ColEI
2651  TCCCCCTGGA AGCTCCCTCG TCGCTCTCC TGTTCGACC CTGCCGCTTA
      AGGGGACCT TCGAGGGAGC ACGCGAGAG ACAAGGCTGG GACGGCGAAT
-----
                        ColEI
                                           mutation
-2701- CGGATACCT GTCEGCCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTCTCAT
      GGCCTATGGA CAGGCGGAAA GAGGGAAGCC CTTCCGACCG CGAAAGAGTA
-----
                        ColEI
mutation
2751  AGCTCAGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTT GCTCCAAGCT
      TCGAGTGC GAATCCATAGA GTCAAGCCAC ATCCAGCAAG CGAGGTTGCA
-----
                        ColEI
                                           mutation
2801  GGGCTGTGTG CACGAACCC CCGTTCAGTC CGACCGCTGC GCCTTATCCG
      CCCGACACAC GTGCTTGGGG GGCAAGTCAG GCTGGCGACG CGGAATAGGC
-----
                        ColEI

```

## 12/43 Fig. 2

2851 GTAAGTATCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG  
CATTGATAGC AGAACTCAGG TTGGGCCATT CTGTGCTGAA TAGCGGTGAC

-----  
ColEI

2901 GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC  
CGTCGTCGGT GACCATTGTC CTAATCGTCT CGCTCCATAC ATCCGCCACG

-----  
ColEI

mutation

2951 TACAGAGTTC TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGAACAG  
ATGTCTCAAG AACTTCACCA CCGGATTGAT GCCGATGTGA TCTTCTTGTC

-----  
ColEI

mutation

3001 TATTTGGTAT CTGCGCTCTG CTGTAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT  
ATAAACCATA GACGCGAGAC GACATCGGTC AATGGAAGCC TTTTCTCAA

-----  
ColEI

3051 GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAAACCACC GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT  
CCATCGAGAA CTAGGCCGTT TGTTTGGTGG CGACCATCGC CACCAAAAAA

-----  
ColEI

3101 TGTTTGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC  
ACAAACGTTT GTCGTCTAAT GCGCGTCTTT TTTTCTTAGA GTTCTTCTAG

-----  
ColEI

3151 CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AAACCTCACGT  
GAAACTAGAA AAGATGCCCC AGACTGCGAG TCACCTTGCT TTTGAGTGCA

-----  
ColEI

cat terminator

-----  
BglII

3201 TAAGGGATTT TGGTCAGATC TAGCACCAGG CGTTTAAGGG CACCAATAAC  
ATTCCCTAAA ACCAGTCTAG ATCGTGGTCC GCAAATTCCC GTGGTTATTG

-----  
ColEI  
cat terminator

3251 TGCCTTAAAA AAATTACGCC CCGCCCTGCC ACTCATCGCA GTACTGTTGT  
ACGGAATTTT TTTAATGCGG GCGGGGACGG TGAGTAGCGT CATGACAACA

-----  
CM(R)

3301 AATTCATTAA GCATTCTGCC GACATGGAAG CCATCACAAA CGGCATGATG  
TTAAGTAATT CGTAAGACGG CTGTACCTTC GGTAGTGTTT GCCGTACTAC

-----  
CM(R)

3351 AACCTGAATC GCCAGCGGCA TCAGCACCTT GTCGCCTTGC GTATAATATT  
TTGGACTTAG CCGTCGCCGT AGTCGTGGAA CAGCGGAACG CATATTATAA

-----  
CM(R)

3401 TGCCCATAGT GAAAACGGGG GCGAAGAAGT TGTCCATATT GGCTACGTTT  
ACGGGTATCA CTTTTGCCCC CGCTTCTTCA ACAGGTATAA CCGATGCAAA

-----  
CM(R)

3451 AAATCAAAAC TGGTGAAACT CACCCAGGGA TTGGCTGAGA CGAAAAACAT  
TTTAGTTTTG ACCACTTTGA GTGGGTCCCT AACCGACTCT GCTTTTTGTA

13/43

Fig. 2

CM(R)  
 3501 ATTCCTCAATA AACCC'TTTTAG GGAAATAGGC CAGGTTTTTCA CCGTAACACG  
 TAAGAGTTAT TTGGGAAATC CCTTTATCCG GTCCAAAAGT GGCATTGTGC  
 -----  
 CM(R)  
 3551 CCACATCTTG CGAATATATG TGTAGAAACT GCCGGAAATC GTCGTGGTAT  
 GGTGTAGAAC GCTTATATAC ACATCTTTGA CGGCCTTTAG CAGCACCATA  
 -----  
 CM(R)  
 3601 TCACTCCAGA GCGATGAAAA CGTTTCAGTT TGCTCATGGA AAACGGTGTA  
 AGTGAGGTCT CGCTACTTTT GCAAAGTCAA ACGAGTACCT TTTGCCACAT  
 -----  
 CM(R)  
 3651 ACAAGGGTGA ACACTATCCC ATATCACCAG CTCACCGTCT TTCATTGCCA  
 TGTTC'CCACT TGTGATAGGG TATAGTGGTC GAGTGGCAGA AAGTAACGGT  
 -----  
 CM(R)  
 3701 TACGGAACTC CGGGTGAGCA TTCATCAGGC GGGCAAGAAT GTGAATAAAG  
 ATGCCTTGAG GCCCACTCGT AAGTAGTCCG CCCGTTCTTA CACTTATTTT  
 -----  
 CM(R)  
 3751 GCCGGATAAA ACTTGTGCTT ATTTTCTTT ACGGTCTTTA AAAAGGCCGT  
 CGGCCTATTT TGAACACGAA TAAAAAGAAA TGCCAGAAAT TTTTCCGGCA  
 -----  
 CM(R)  
 3801 AATATCCAGC TGAACGGTCT GGTATAGGT ACATTGAGCA ACTGACTGAA  
 TTATAGGTCG ACTTGCCAGA CCAATATCCA TGTAAC'CTCGT TGACTGACTT  
 -----  
 CM(R)  
 3851 ATGCCTCAA'AA ATGTTCTTFA CGATGCCATT GGGATATATC AACGGTGGTA  
 TACGGAGTTT TACAAGAAAT GCTACGGTAA CCCTATATAG TTGCCACCAT  
 -----  
 CM(R)  
 3901 TATCCAGTGA TTTTTTCTC CATT'TTAGCT TCCTTAGCTC CTGAAAATCT  
 ATAGGTC'ACT AAAAAAGAG GTAAAATCGA AGGAATCGAG GACTTTTAGA  
 -----  
 CM(R) SD  
 -----  
 cat promoter  
 3951 CGATAACTCA AAAAATACGC CCGGTAGTGA TCTTATTTCA TTATGGTGAA  
 GCTATTGAGT TTTTATGCG GGCCATCACT AGAATAAAGT AATACCACTT  
 -----  
 cat promoter  
 CRP site  
 -----  
 4001 AGTIGGAACC TCACCEGACG TCTAATGTGA GTTAGCTCAC TCATTAGGCA  
 TCAACCTTGG AGTGGGCTGC AGATTACACT CAATCGAGTG AGTAATCCGT  
 -----  
 cat promoter  
 start lac mRNA  
 -----  
 lac operator  
 -----  
 -35 region -10 region  
 -----  
 4051 CCCAGGCTT TACTTTTAT GCTTCCGGCT CGTATGTTGT GTGGAATTGT  
 GGGGTCCGAA ATGTGAAATA CGAAGGCCGA GCATAACAAC CACCTTAACA  
 lac operator SD lacZ'  
 -----  
 4101 GAGCGGATAA CAATTT'CAAC CAGGAAACAG CTATGACCAT GATTACGAAT

14/43 ' Fig. 2

CTCGCCTATT GTTAAAGTGT GTCCTTTGTC GATACTGGTA CTAATGCTTA  
lacZ'

4151 T  
A



## 16/43 Fig. 3

	EcoRV				SexAI
	---				-----
1	ATCGTGCTGA	CCCAGCCGCC	TTCAGTGAGT	GGCGCACCAG	GTCAGCGTGT
	TAGCACGACT	GGGTCGGCGG	AAGTCACTCA	CCGCGTGGTC	CAGTCGCACA
51	GACCATCTCG	TGTAGCGGCA	GCAGCAGCAA	CATTGGCAGC	AACTATGTGA
	CTGGTAGAGC	ACATCGCCGT	CGTCGTCGTT	GTAACCGTCG	TTGATACT
			XmaI		
			-----		
	KpnI		SmaI		
	-----		-----		
	Acc65I		AvaI		
	-----		-----		
101	GCTGGTACCA	GCAGTTGCC	GGGACGGCGC	CGAAACTGCT	GATTTATGAT
	CGACCATGGT	CGTCAACGGG	CCCTGCCGCG	GCTTTGACGA	CTAAATACTA
			Bsu36I		BamHI
			-----		-----
151	AACAACCAGC	GTCCCTCAGG	CGTGCCGGAT	CGTTTTAGCG	GATCCAAAAG
	TTGTTGGTCG	CAGGGAGTCC	GCACGGCCTA	GCAAAATCGC	CTAGGTTTTC
					BpuAI
					-----
					BbsI
					-----
201	CGGCACCAGC	GCGAGCCTTG	CGATTACGGG	CCTGCAAAGC	GAAGACGAAG
	GCCGTGGTCG	CGCTCGGAAC	GCTAATGCC	GGACGTTTCG	CTTCTGCTTC
					Bsu36I
			-----		-----
251	CGGATTATTA	TTGCCAGAGC	TATGACATGC	CTCAGGCTGT	GTTTGGCGGC
	GCCTAATAAT	AACGGTCTCG	ATACTGTACG	GAGTCCGACA	CAAACCGCCG
					MscI
			-----		DraIII
			-----		-----
301	GGCACGAAGT	TTAACCGTTC	TTGGCCAGCC	GAAAGCCGCA	CCGAGTGTGA
	CCGTGCTTCA	AATTGGCAAG	AACCGGTCGG	CTTTCGGCGT	GGCTCACACT
351	CGCTGTTTCC	GCCGAGCAGC	GAAGAATTGC	AGGCGAACAA	AGCGACCCTG
	GCGACAAAGG	CGGCTCGTCG	CTTCTTAACG	TCCGCTTGTT	TCGCTGGGAC
401	GTGTGCCTGA	TTAGCGACTT	TTATCCGGGA	GCCGTGACAG	TGGCCTGGAA
	CACACGGACT	AATCGCTGAA	AATAGGCCCT	CGGCACTGTC	ACCGGACCTT
451	GGCAGATAGC	AGCCCCGTCA	AGGCGGGAGT	GGAGACCACC	ACACCCTCCA
	CCGTCTATCG	TCGGGGCAGT	TCCGCCCTCA	CCTCTGGTGG	TGTGGGAGGT
501	AACAAAGCAA	CAACAAGTAC	GCGGCCAGCA	GCTATCTGAG	CCTGACGCCT
	TTGTTTCGTT	GTTGTTCATG	CGCCGGTCGT	CGATAGACTC	GGACTGCGGA
551	GAGCAGTGGA	AGTCCCACAG	AAGCTACAGC	TGCCAGGTCA	CGCATGAGGG
	CTCGTCACCT	TCAGGGTGTC	TTCGATGTCG	ACGGTCCAGT	GCGTACTCCC

17/43

Fig. 3

				StuI -----	SphI -----
601	GAGCACCGTG	GAAAAAACCG	TTGCGCCGAC	TGAGGCCTGA	TAAGCATGCG
	CTCGTGGCAC	CTTTTTTGGC	AACGCGGCTG	ACTCCGGACT	ATTCGTACGC
651	TAGGAGAAAA	TAAAATGAAA	CAAAGCACTA	TTGCACTGGC	ACTCTTACCG
	ATCCTCTTTT	ATTTTACTTT	GTTTCGTGAT	AACGTGACCG	TGAGAATGGC
				MfeI -----	
701	TTGCTCTTCA	CCCCTGTTAC	CAAAGCCCAG	GTGCAATTGA	AAGAAAGCGG
	AACGAGAAGT	GGGACAATG	GTTTCGGGTC	CACGTTAACT	TTCTTTCGCC
					BspEI -----
751	CCCGGCCCTG	GTGAAACCGA	CCCAAACCCT	GACCCTGACC	TGTACCTTTT
	GGGCCGGGAC	CACTTTGGCT	GGGTTTGGGA	CTGGGACTGG	ACATGGAAAA
				BspEI -----	
801	CCGGATTTAG	CCTGTCCACG	TCTGGCGTTG	GCGTGGGCTG	GATTCGCCAG
	GGCCTAAATC	GGACAGGTGC	AGACCGCAAC	CGCACCCGAC	CTAAGCGGTC
				XhoI -----	
				AvaI -----	
851	CCGCCTGGGA	AAGCCCTCGA	GTGGCTGGCT	CTGATTGATT	GGGATGATGA
	GGCGGACCCT	TTCGGGAGCT	CACCGACCGA	GACTAACTAA	CCCTACTACT
901	TAAGTATTAT	AGCACCAGCC	TGAAAACGCG	TCTGACCATT	AGCAAAGATA
	ATTCATAATA	TCGTGGTCCG	ACTTTTGCGC	AGACTGGTAA	TCGTTTCTAT
				BstBI -----	
				SfuI -----	
				NspV -----	
951	CTTCGAAAAA	TCAGGTGGTG	CTGACTATGA	CCAACATGGA	CCCGGTGGAT
	GAAGCTTTTT	AGTCCACCAC	GACTGATACT	GGTTGTACCT	GGGCCACCTA
				BssHII -----	
1001	ACGGCCACCT	ATTATTGCGC	GCGTTCCTCCT	CGTTATCGTG	GTGCTTTTGA
	TGCCGGTGGG	TAATAACGCG	CGCAAGAGGA	GCAATAGCAC	CACGAAAACCT
				BlpI -----	
				StyI -----	
				CelII -----	
1051	TTATTGGGGC	CAAGGCACCC	TGGTGACGGT	TAGCTCAGCG	TCGACCAAAG
	AATAACCCCG	GTTCCGTGGG	ACCACCTGCCA	ATCGAGTCGC	AGCTGGTTTC

## 18/43 Fig. 3

1101 GTCCAAGCGT GTTTCCGCTG GCTCCGAGCA GCAAAAGCAC CAGCGGCGGG  
 CAGGTTTCGCA CAAAGGCGAC CGAGGCTCGT CGTTTTTCGTG GTCGCCGCCG

1151 ACGGCTGCCC TGGGCTGCCT GGTTAAAGAT TATTTCCCGG AACCAAGTCAC  
 TGCCGACGGG ACCCGACGGA CCAATTTCTA ATAAAGGGCC TTGGTCAGTG

1201 CGTGAGCTGG AACAGCGGGG CGCTGACCAG CGGCGTGCAT ACCTTTCCGG  
 GCACTCGACC TTGTCGCCCC GCGACTGGTC GCCGCACGTA TGGAAAGGCC

1251 CGGTGCTGCA AAGCAGCGGC CTGTATAGCC TGAGCAGCGT TGTGACCGTG  
 GCCACGACGT TTCGTCGCCG GACATATCGG ACTCGTCGCA ACACTGGCAC

1301 CCGAGCAGCA GCTTAGGCAC TCAGACCTAT ATTTGCAACG TGAACCATAA  
 GGCTCGTCGT CGAATCCGTG AGTCTGGATA TAAACGTTGC ACTTGGTATT

EcoRI  
-----

1351 ACCGAGCAAC ACCAAAGTGG ATAAAAAAGT GGAACCGAAA AGCGAATTCG  
 TGGCTCGTTG TGGTTTCACC TATTTTTTCA CCTTGGCTTT TCGCTTAAGC

BssHII  
-----

1401 ACTATAAAGA TGACGATGAC AAAGGCGCGC CGTGGAGCCA CCCGCAGTTT  
 TGATATTTCT ACTGCTACTG TTTCCGCGCG GCACCTCGGT GGGCGTCAAA

HindIII  
-----

1451 GAAAAATGAT AAGCTTGACC TGTGAAGTGA AAAATGGCGC AGATTGTGCG  
 CTTTTTACTA TTCGAACTGG ACACTTCACT TTTTACCGCG TCTAACACGC

OGIII3 100.0%  
=====

1501 ACATTTTTTT TGTCTGCCGT TTAATTAAG GGGGGGGGGG GCCGGCCTGG  
 TGTAATAAAA ACAGACGGCA AATTAATTTT CCCCCCCCCC CGGCCGGACC

1551 GGGGGGGTGT ACATGAAATT GTAAACGTTA ATATTTTGTT AAAATTCGCG  
 CCCCCCACA TGTACTTTAA CATTTGCAAT TATAAAACAA TTTTAAGCGC

1601 TTAAATTTTT GTTAAATCAG CTCATTTTTT AACCAATAGG CCGAAATCGG  
 AATTTAAAAA CAATTTAGTC GAGTAAAAAA TTGGTTATCC GGCTTTAGCC

1651 CAAAATCCCT TATAAATCAA AAGAATAGAC CGAGATAGGG TTGAGTGTTG  
 GTTTTAGGGA ATATTTAGTT TTCTTATCTG GCTCTATCC AACTCACAAC

1701 TTCCAGTTTG GAACAAGAGT CCACTATTAA AGAACGTGGA CTCCAACGTC  
 AAGGTCAAAC CTTGTTCTCA GGTGATAATT TCTTGCACCT GAGGTTGCAG

1751 AAAGGGCGAA AAACCGTCTA TCAGGGCGAT GGCCCACTAC GAGAACCATC  
 TTTCCCGCTT TTTGGCAGAT AGTCCCGCTA CCGGGTGATG CTCTTGGTAG

1801 ACCCTAATCA AGTTTTTTGG GGTCGAGGTG CCGTAAAGCA CTAATCGGA  
 TGGGATTAGT TCAAAAAACC CCAGCTCCAC GGCATTTTCGT GATTTAGCCT

## 19/43 Fig. 3

1851	ACCCTAAAGG TGGGATTTCC	GAGCCCCCGA CTCGGGGGCT	TTTAGAGCTT AAATCTCGAA	GACGGGGAAA CTGCCCTTT	GCCGGCGAAC CGGCCGCTTG
1901	GTGGCGAGAA CACCGCTCTT	AGGAAGGGAA TCCTTCCCTT	GAAAGCGAAA CTTTCGCTTT	GGAGCGGGCG CCTCGCCCCG	CTAGGGCGCT GATCCCAGCA
1951	GGCAAGTGTA CCGTTACAT	GCGGTCACGC CGCCAGTGCG	TGCGCGTAAC ACGCGCATTG	CACCACACC GTGGTGTGGG	GCCGCGCTTA CGGCGCGAAT
2001	ATGCGCCGCT TACGCGGCGA	ACAGGGCGCG TGTCCCGCGC	TGCTAGACTA ACGATCTGAT	GTGTTTAAAC CACAAATTG	CGGACCGGGG GCCTGGCCCC
2051	GGGGGCTTAA CCCCGAATT	GTGGGCTGCA CACCCGACGT	AAACAAAACG TTTGTTTTGC	GCCTCCTGTC CGGAGGACAG	AGGAAGCCGC TCCTTCGGCG
2101	TTTTATCGGG AAAATAGCCC	TAGCCTCACT ATCGGAGTGA	GCCCGCTTTC CGGGCGAAAG	CAGTCGGGAA GTCAGCCCTT	ACCTGTCGTG TGGACAGCAC
2151	CCAGCTGCAT GGTCGACGTA	CAGTGAATCG GTCACCTAGC	GCCAACGCGC CGGTTGCGCG	GGGAGAGGC CCCCTCTCCG	GGTTTGCGTA CCAAACGCAT
2201	TTGGGAGCCA AACCCTCGGT	GGGTGGTTTT CCCACCAAAA	TCTTTTCACC AGAAAAGTGG	AGTGAGACGG TCACTCTGCC	GCAACAGCTG CGTTGTGAC
2251	ATTGCCCTTC TAACGGGAAG	ACCGCCTGGC TGGCGGACCG	CCTGAGAGAG GGACTCTCTC	TTGCAGCAAG AACGTGCTTC	CGGTCCACGC GCCAGGTGCG
2301	TGGTTTGCCC ACCAAACGGG	CAGCAGGCGA GTCGTCCGCT	AAATCCTGTT TTTAGACAA	TGATGGTGGT ACTACCACCA	CAGCGGCGGG GTCGCCGCC
2351	ATATAACATG TATATTGTAC	AGCTGTCCTC TCGACAGGAG	GGTATCGTCG CCATAGCAGC	TATCCCCTA ATAGGGTGAT	CCGAGATGTC GGCTCTACAG
2401	CGCACCAACG GCGTGGTTGC	CGCAGCCCGG GCGTCGGGCC	ACTCGGTAAT TGAGCCATTA	GGCACGCATT CCGTGCGTAA	GCGCCAGCG CGCGGGTGC
2451	CCATCTGATC GGTAGACTAG	GTTGGCAACC CAACCGTTGG	AGCATCGCAG TCGTAGCGTC	TGGGAACGAT ACCCTTGCTA	GCCCTCATTC CGGGAGTAAG
2501	AGCATTTGCA TCGTAAACGT	TGGTTTGTG ACCAAACAAC	AAAACCGGAC TTTTGGCCTG	ATGGCACTCC TACCGTGAGG	AGTCGCCTTC TCAGCGGAAG
2551	CCGTTCCGCT GGCAAGGCGA	ATCGGCTGAA TAGCCGACTT	TTTGATTGCG AAACTAACGC	AGTGAGATAT TCACTCTATA	TTATGCCAGC AATACGGTCG
2601	CAGCCAGACG GTCGGTCTGC	CAGACGCGCC GTCTGCGCGG	GAGACAGAAC CTCTGTCTTG	TTAATGGGCC AATTACCCGG	AGCTAACAGC TCGATTGTCG
2651	GCGATTTGCT CGCTAAACGA	GGTGGCCCAA CCACCGGGTT	TGCGACCAGA ACGCTGGTCT	TGCTCCACGC ACGAGGTGCG	CCAGTCGCGT GGTCAGCGCA
2701	ACCGTCCTCA TGGCAGGAGT	TGGGAGAAAA ACCCTCTTTT	TAATACTGTT ATTATGACAA	GATGGGTGTC CTACCCACAG	TGGTCAGAGA ACCAGTCTCT

20/43

Fig. 3

2751 CATCAAGAAA TAACGCCGGA ACATTAGTGC AGGCAGCTTC CACAGCAATA  
GTAGTTCTTT ATTGCGGCCT TGTAATCACG TCCGTCGAAG GTGTCGTTAT

2801 GCATCCTGGT CATCCAGCGG ATAGTTAATA ATCAGCCCAC TGACACGTTG  
CGTAGGACCA GTAGGTCGCC TATCAATTAT TAGTCGGGTG ACTGTGCAAC

ApaLI

-----

2851 CGCGAGAAGA TTGTGCACCG CCGCTTTACA GGCTTCGACG CCGCTTCGTT  
GCGCTCTTCT AACACGTGGC GCGCAAATGT CCGAAGCTGC GCGCAAAGCAA

2901 CTACCATCGA CACGACCACG CTGGCACCCA GTTGATCGGC GCGAGATTTA  
GATGGTAGCT GTGCTGGTGC GACCGTGGGT CAACTAGCCG CGCTCTAAAT

2951 ATCGCCGCGA CAATTTGCGA CGGCGCGTGC AGGGCCAGAC TGGAGGTGGC  
TAGCGGCGCT GTTAAACGCT GCCGCGCACG TCCCGGTCTG ACCTCCACCG

3001 AACGCCAATC AGCAACGACT GTTTGCCCGC CAGTTGTTGT GCCACGCGGT  
TTGCGGTTAG TCGTTGCTGA CAAACGGGCG GTCAACAACA CGGTGCGCCA

3051 TAGGAATGTA AFTCAGCTCC GCCATCGCCG CTTCCACTTT TTCCCGCGTT  
ATCCTTACAT TAAGTCGAGG CGGTAGCGGC GAAGGTGAAA AAGGGCGCAA

3101 TTCGCAGAAA CGTGGCTGGC CTGGTTCACC ACGCGGGAAA CGGTCTGATA  
AAGCGTCTTT GCACCGACCG GACCAAGTGG TGCGCCCTTT GCCAGACTAT

3151 AGAGACACCG GCATACTCTG CGACATCGTA TAACGTTACT GGTTTCACAT  
TCTCTGTGGC CGTATGAGAC GCTGTAGCAT ATTGCAATGA CCAAAGTGTA

3201 TCACCACCCT GAATTGACTC TCTTCCGGGC GCTATCATGC CATAACGCGA  
AGTGGTGGGA CTTAACTGAG AGAAGGCCCG CGATAGTACG GTATGGCGCT

3251 AAGGTTTTGC GCCATTCGAT GCTAGCCATG TGAGCAAAAG GCCAGCAAAA  
TTCCAAAACG CCGTAAGCTA CGATCGGTAC ACTCGTTTTT CGGTCTGTTTT

3301 GGCCAGGAAC CGTAAAAAGG CCGCGTTGCT GCGTTTTTTC CATAGGCTCC  
CCGGTCCTTG GCATTTTTCC GCGCAACGA CCGCAAAAAG GTATCCGAGG

3351 GCCCCCTGA CGAGCATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA GAGGTGGCGA  
CGGGGGGACT GTCGTAGTG TTTTAGCTG CGAGTTCAGT CTCCACCGCT

3401 AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG GAAGCTCCCT  
TTGGGCTGTC CTGATATTTT TATGGTCCGC AAAGGGGAC CTTGAGGGA

3451 CGTGCGCTCT CCTGTTCCGA CCCTGCCGCT TACCGGATAC CTGTCCGCCT  
GCACGCGAGA GGACAAGGCT GGGACGGCGA ATGGCTATG GACAGGCGGA

3501 TTCTCCCTTC GGGAAGCGTG GCGCTTTCTC ATAGCTCACG CTGTAGGTAT  
AAGAGGGAAG CCCTTCGCAC CCGCAAAGAG TATCGAGTGC GACATCCATA

ApaLI

-----

3551 CTCAGTTCGG TGTAGGTCGT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG TGCACGAACC  
GAGTCAAGCC ACATCCAGCA AGCGAGGTTT GACCCGACAC ACGTGCTTGG

21/43

Fig. 3

3601	CCCCGTTTCAG GGGGCAAGTC	CCCACCCTGCT GGGCTGGCGA	GCGCCTTATC CGCGGAATAG	CGGTAACATAT GCCATTGATA	CGTCTTGAGT GCAGAACTCA
3651	CCAACCCGGT GGTTGGGCCA	AAGACACGAC TTCTGTGCTG	TTATCGCCAC AATAGCGGTG	TGGCAGCAGC ACCGTCGTCC	CACTGGTAAC GTGACCATTG
3701	AGGATTAGCA TCCTAATCGT	GAGCGAGGTA CTCGCTCCAT	TGTAGGCGGT ACATCCGCCA	GCTACAGAGT CGATGTCTCA	TCTTGAAGTG AGAACTTCAC
3751	GTGGCCTAAC CACCGGATTG	TACGGCTACA ATGCCGATGT	CTAGAAGAAC GATCTTCTTG	AGTATTTGGT TCATAAACCA	ATCTGCGCTC TAGACGCGAG
3801	TGCTGTAGCC ACGACATCGG	AGTTACCTTC TCAATGGAAG	GGAAAAAGAG CCTTTTCTC	TTGGTAGCTC AACCATCGAG	TTGATCCGGC AACTAGGCCG
3851	AAACAAACCA TTTGTTTGGT	CCGCTGGTAG GGCGACCATC	CGGTGGTTTT GCCACCAAAA	TTTGTTTGCA AAACAAACGT	AGCAGCAGAT TCGTGCTCTA
3901	TACGCGCAGA ATGCGCGTCT	AAAAAAGGAT TTTTTTCCTA	CTCAAGAAGA GAGTTCCTCT	TCCTTTGATC AGGAAACTAG	TTTTCTACGG AAAAGATGCC
3951	GGTCTGACGC CCAGACTGCG	TCAGTGGAAC AGTCACCTTG	GAAAACCTCAC CTTTTGAGTG	GTTAAGGGAT CAATTCCTA	TTTGGTCAGA AAACCAGTCT
4001	TCTAGCACCA AGATCGTGGT	GGCGTTTAAG CCGCAAATTC	GGCACCAATA CCGTGGTTAT	ACTGCCTTAA TGACGGAATT	AAAAATTACG TTTTTAATGC
4051	CCCCGCCCTG GGGGCGGGAC	CCACTCATCG GGTGAGTAGC	CAGTACTGTT GTCATGACAA	GTAATTCATT CATTAAAGTAA	AAGCATTCTG TTCGTAAGAC
4101	CCGACATGGA GGCTGTACCT	AGCCATCACA TCGGTAGTGT	AACGGCATGA TTGCCGTACT	TGAACCTGAA ACTTGGACTT	TCGCCAGCGG AGCGGTGCGC
4151	CATCAGCACC GTAGTCGTGG	TTGTGCGCTT AACAGCGGAA	GCGTATAATA CGCATATTAT	TTTGCCATA AAACGGGTAT	GTGAAAACGG CACTTTTGCC
4201	GGGCGAAGAA CCCCTTCTT	GTTGTCCATA CAACAGGTAT	TTGGCTACGT AACCGATGCA	TAAATCAAA AATTTAGTTT	ACTGGTGAAA TGACCACTTT
4251	CTCACCCAGG GAGTGGGTCC	GATTGGCTGA CTAACCGACT	GACGAAAAAC CTGCTTTTTG	ATATTCTCAA TATAAGAGTT	TAAACCCTTT ATTTGGGAAA
4301	AGGGAAATAG TCCCTTTATC	GCCAGGTTTT CGGTCCAAAA	CACCGTAACA GTGGCATTGT	CGCCACATCT GCGGTGTAGA	TGCGAATATA ACGCTTATAT
4351	TGTGTAGAAA ACACATCTTT	CTGCCGGAAA GACGGCCTTT	TCGTCGTGGT AGCAGCACCA	ATTCACTCCA TAAGTGAGGT	GAGCGATGAA CTCGCTACTT
4401	AACGTTTCAG TTGCAAAGTC	TTTGCTCATG AAACGAGTAC	GAAAACGGTG CTTTTGCCAC	TAACAAGGGT ATTGTTCCCA	GAACACTATC CTTGTGATAG
4451	CCATATCACC GGTATAGTGG	AGCTCACCGT TCGAGTGGCA	CTTTCATTGC GAAAGTAACG	CATACGGAAC GTATGCCTTG	TCCGGGTGAG AGGCCCACTC

22/43

Fig. 3

4501 CATTTCATCAG GCGGGCAAGA ATGTGAATAA AGGCCGGATA AAACCTTGTC  
 GTAAGTAGTC CGCCCGTTCT TACACTTATT TCCGGCCTAT TTTGAACACG

4551 TTATTTTTCT TTACGGTCTT TAAAAAGGCC GTAATATCCA GCTGAACGGT  
 AATAAAAAGA AATGCCAGAA ATTTTCCGG CATTATAGGT CGACTTGCCA

4601 CTGGTTATAG GTACATTGAG CAACTGACTG AAATGCCTCA AAATGTTCTT  
 GACCAATATC CATGTAACTC GTTGACTGAC TTTACGGAGT TTTACAAGAA

4651 TACGATGCCA TTGGGATATA TCAACGGTGG TATATCCAGT GATTTTTTTC  
 ATGCTACGGT AACCTATAT AGTTGCCACC ATATAGGTCA CTAAAAAAG

4701 TCCATTTTAG CTTCCTTAGC TCCTGAAAAT CTCGATAACT CAAAAAATAC  
 AGGTAAAATC GAAGGAATCG AGGACTTTTA GAGCTATTGA GTTTTTTATG

4751 GCCCGGTAGT GATCTTATTT CATTATGGTG AAAGTTGGAA CCTCACCCGA  
 CGGGCCATCA CTAGAATAAA GTAATACCAC TTTCAACCTT GGAGTGGGCT

4801 CGTCTAATGT GAGTTAGCTC ACTCATTAGG CACCCAGGC TTTACTTTT  
 GCAGATTACA CTCAATCGAG TGAGTAATCC GTGGGGTCCG AAATGTGAAA

4851 ATGCTTCCGG CTCGTATGTT GTGTGGAATT GTGAGCGGAT AACAAATTCA  
 TACGAAGGCC GAGCATACAA CACACCTTAA CACTCGCCTA TTGTAAAGT

M13 Reverse primer 100.0% XbaI  
 =====

4901 CACAGGAAAC AGCTATGACC ATGATTACGA ATTTCTAGAT AACGAGGGCA  
 GTGTCCTTTG TCGATACTGG TACTAATGCT TAAAGATCTA TTGCTCCCGT

4951 AAAAATGAAA AAGACAGCTA TCGCGATTGC AGTGGCACTG GCTGGTTTCG  
 TTTTACTTT TTCTGTCGAT AGCGCTAACG TCACCGTGAC CGACCAAAGC

EcoRV  
 ---

5001 CTACCGTAGC GCAGGCCGAT  
 GATGGCATCG CGTCCGGCTA



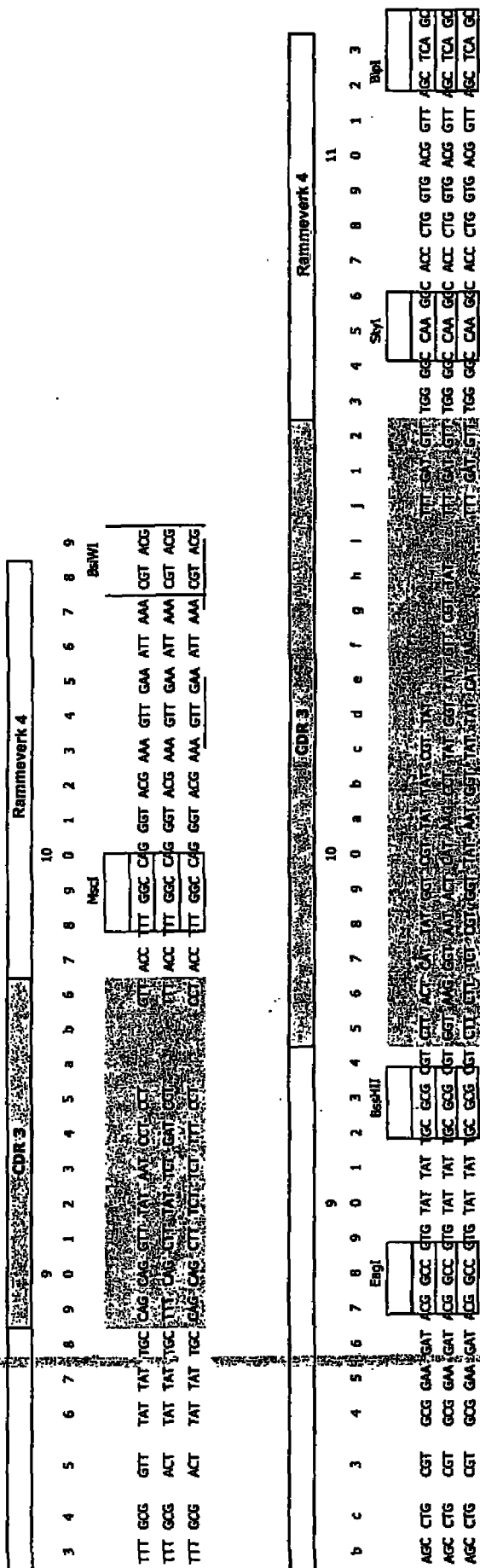






27/43

Fig. 4b

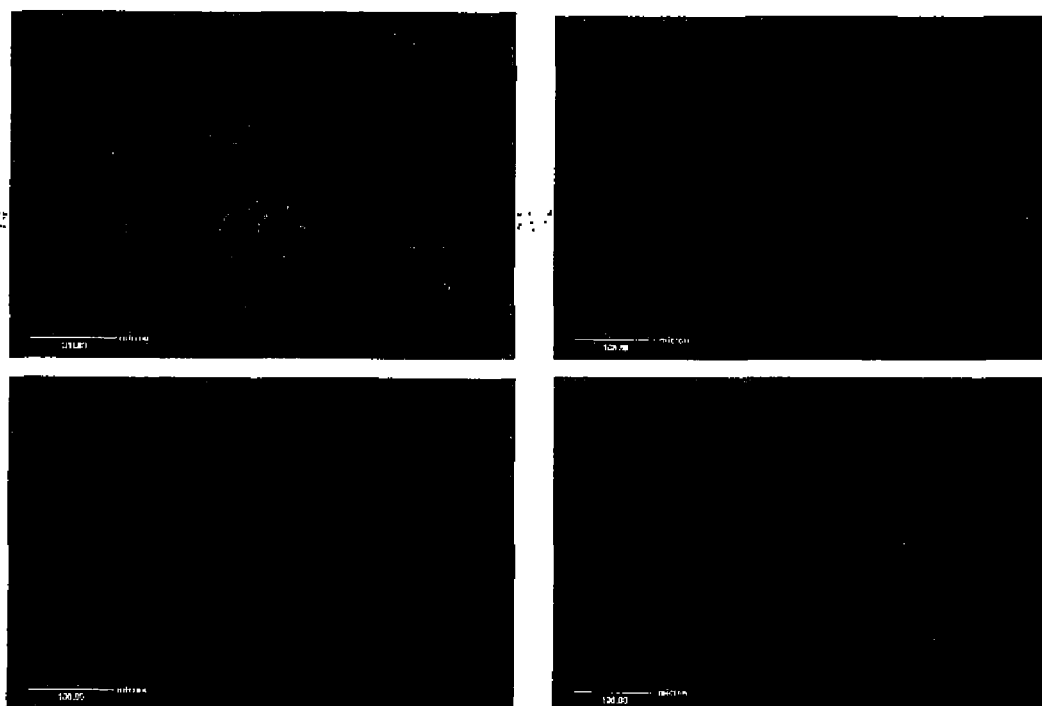


28/43

Fig. 5

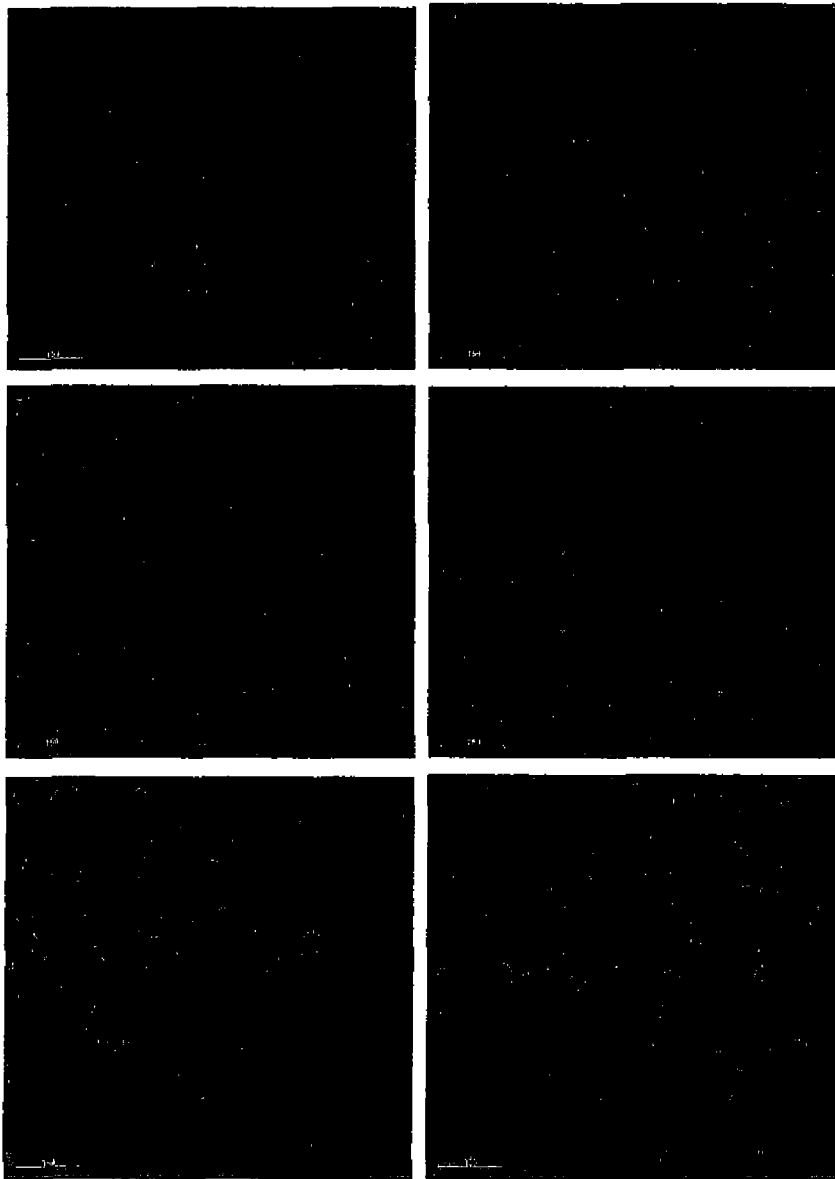


Fig. 6



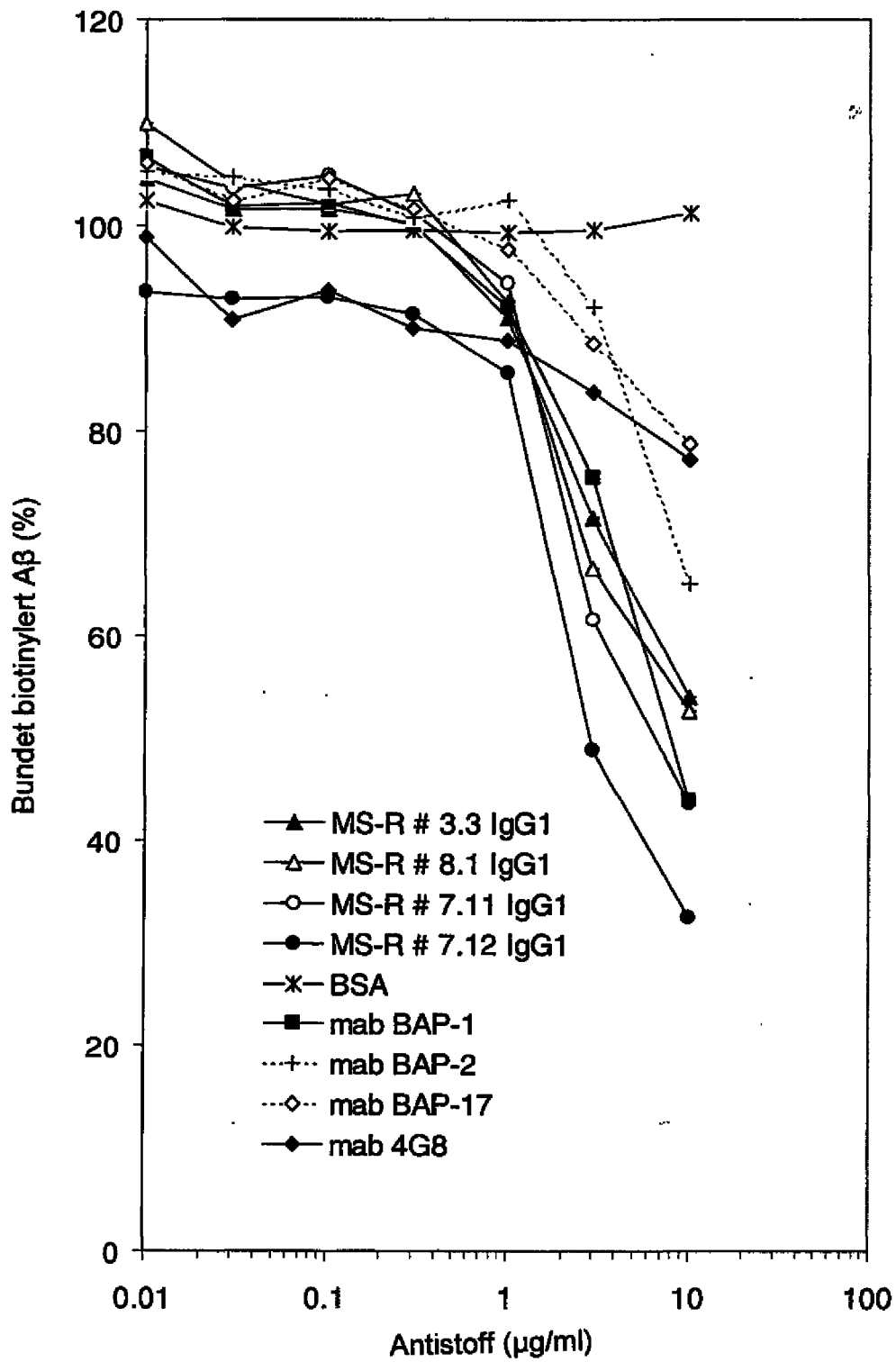
29/43

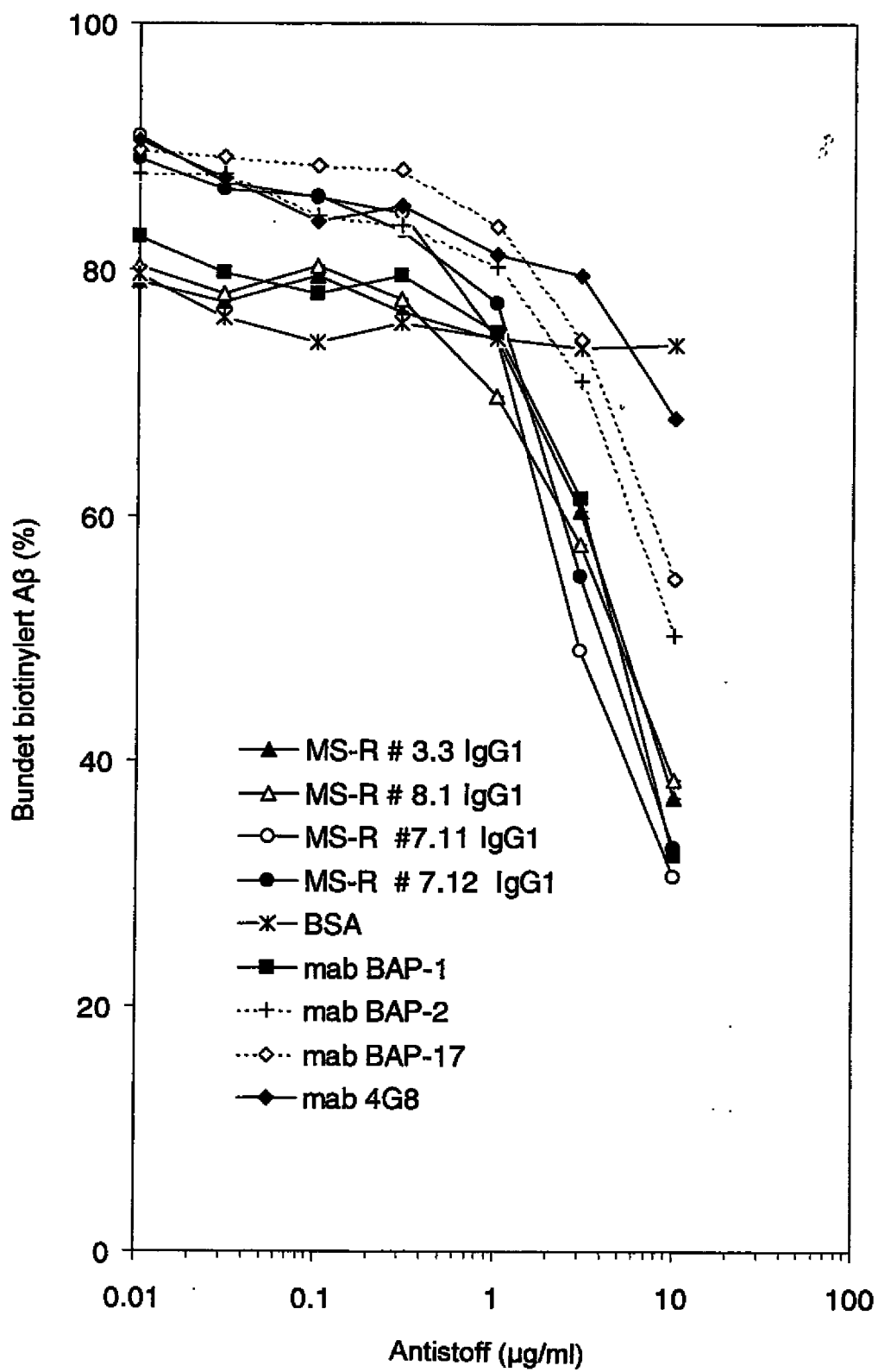
Fig. 7



30/43

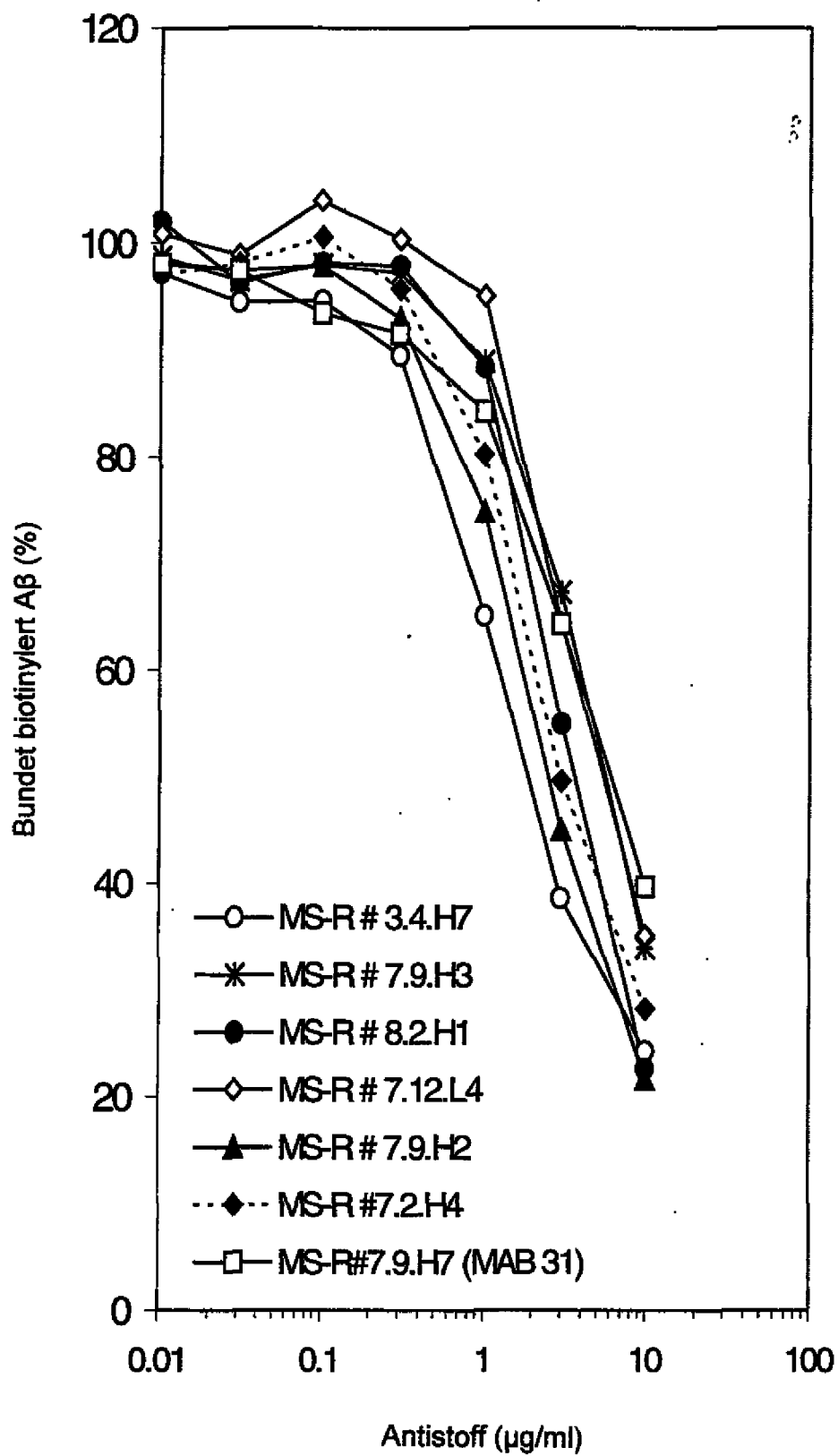
Fig. 8



31/43  
Fig. 9A

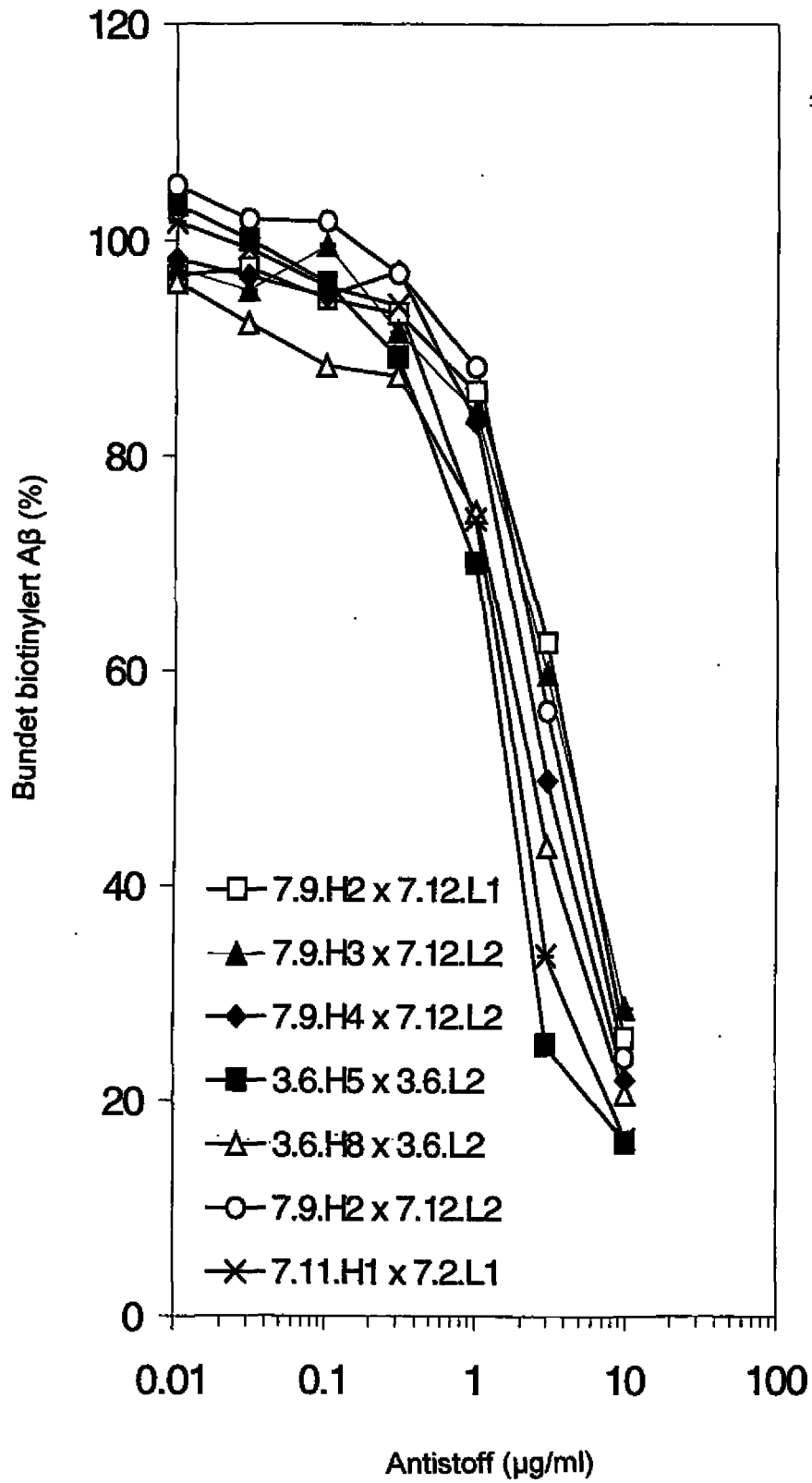
32/43

Fig. 9B

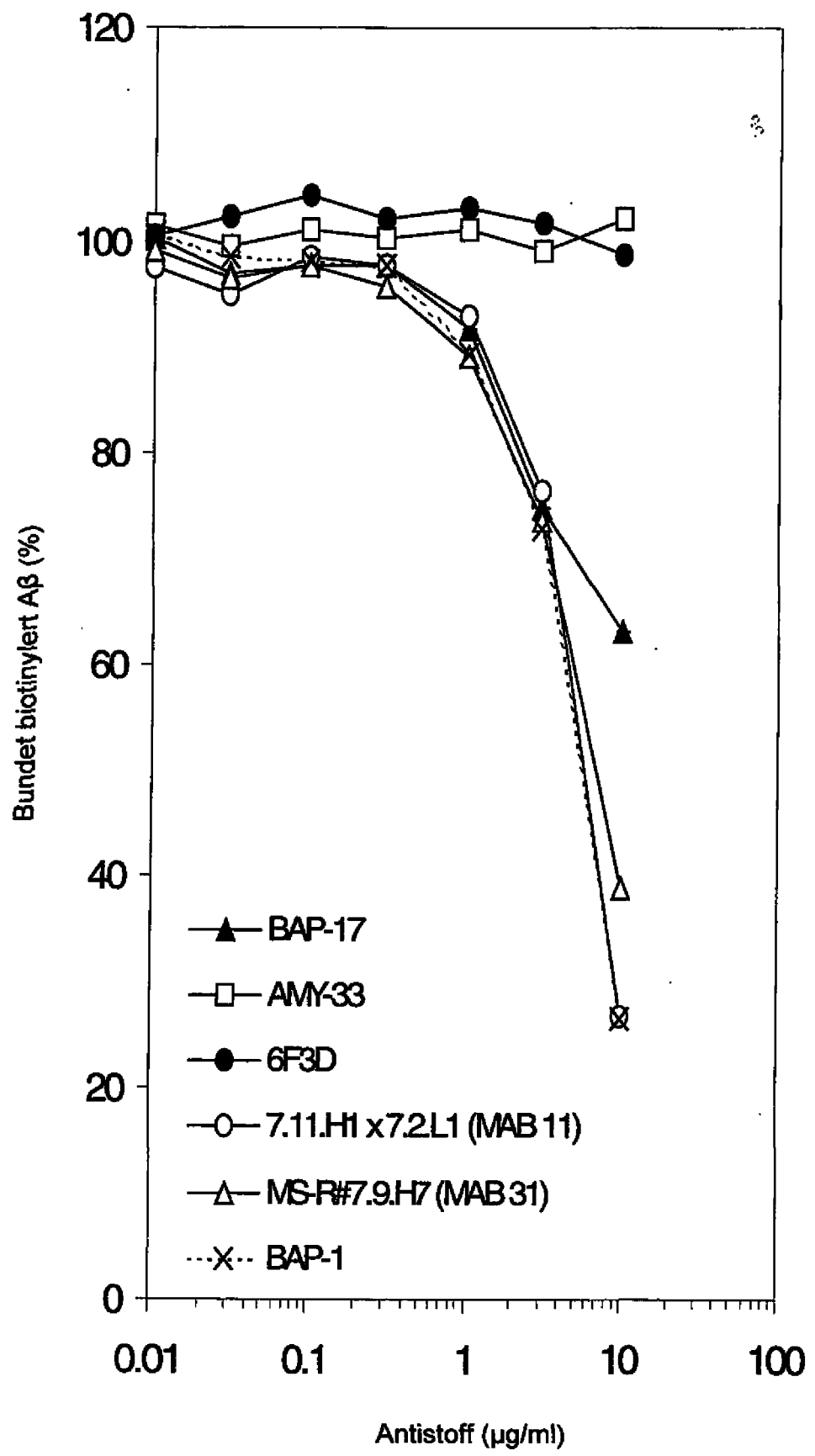


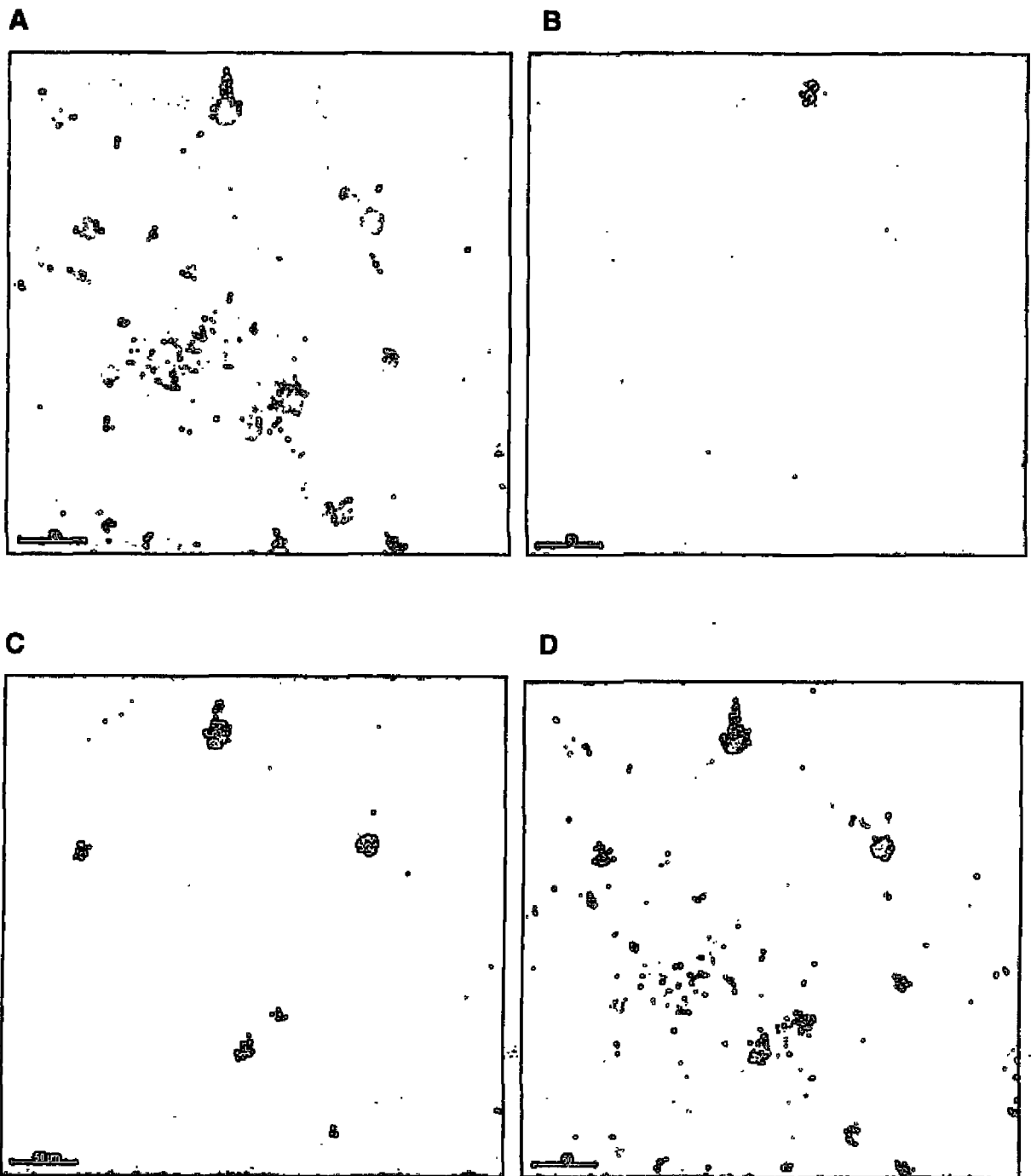
33/43

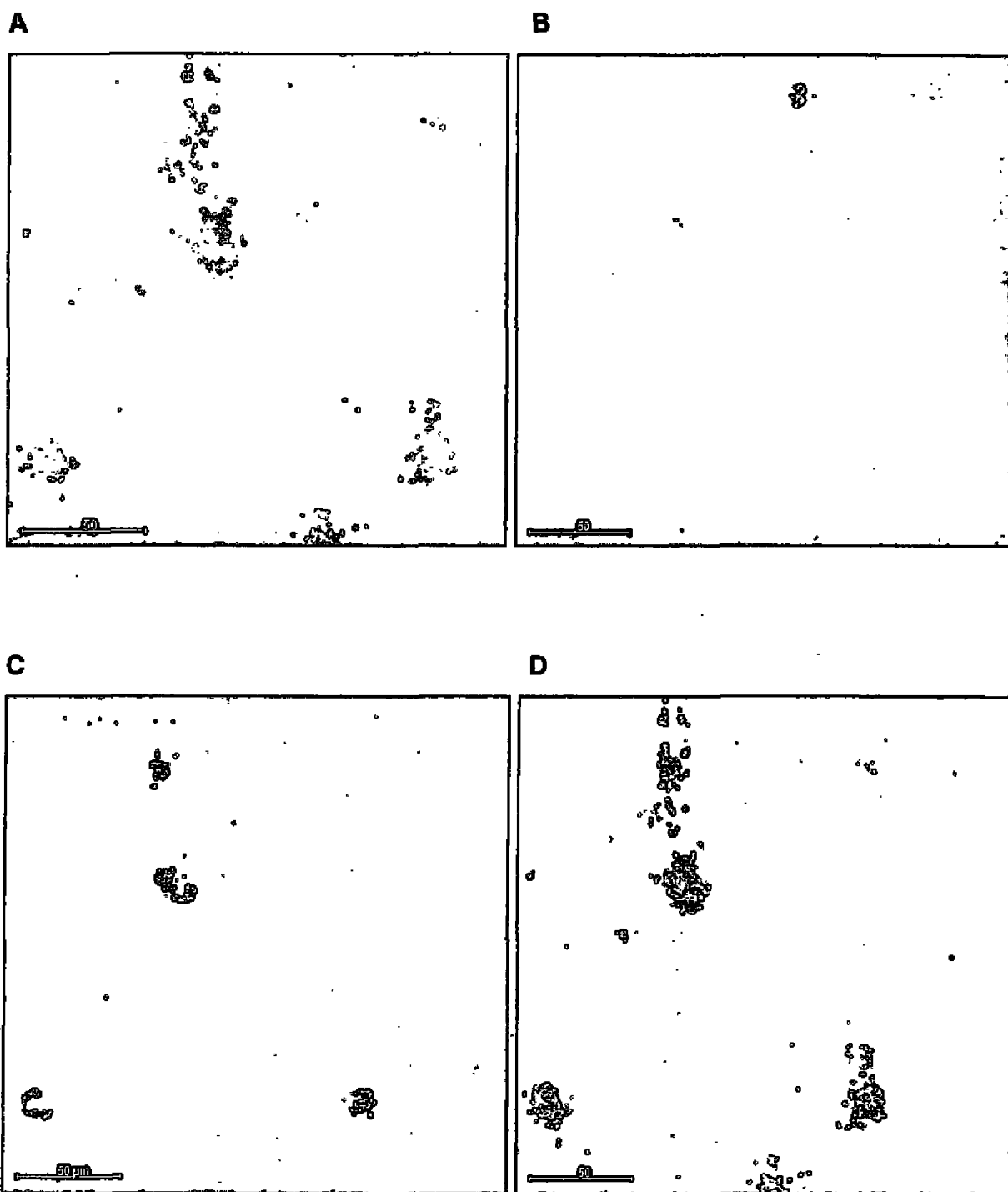
Fig. 9C



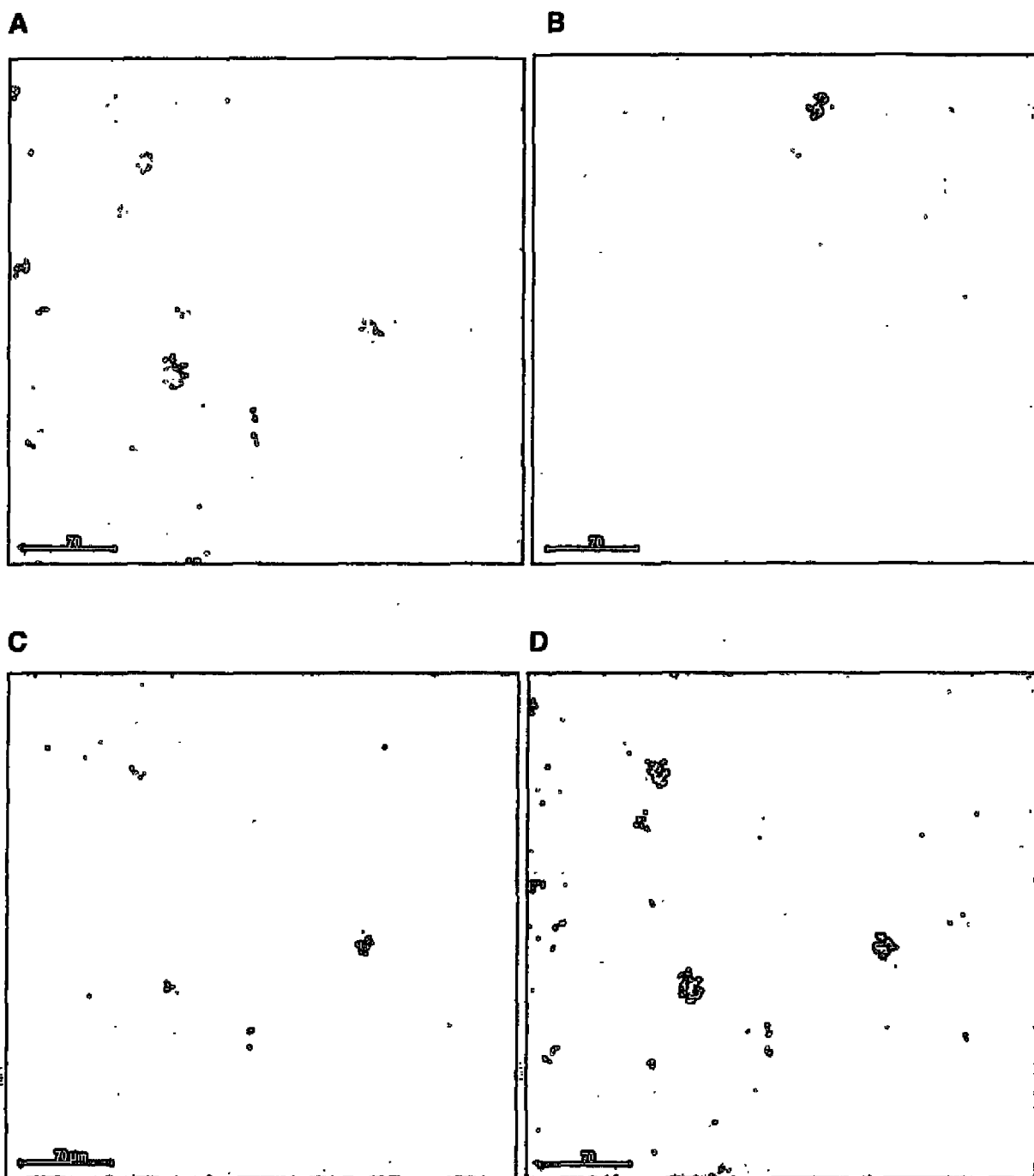
34/43  
Fig. 9D

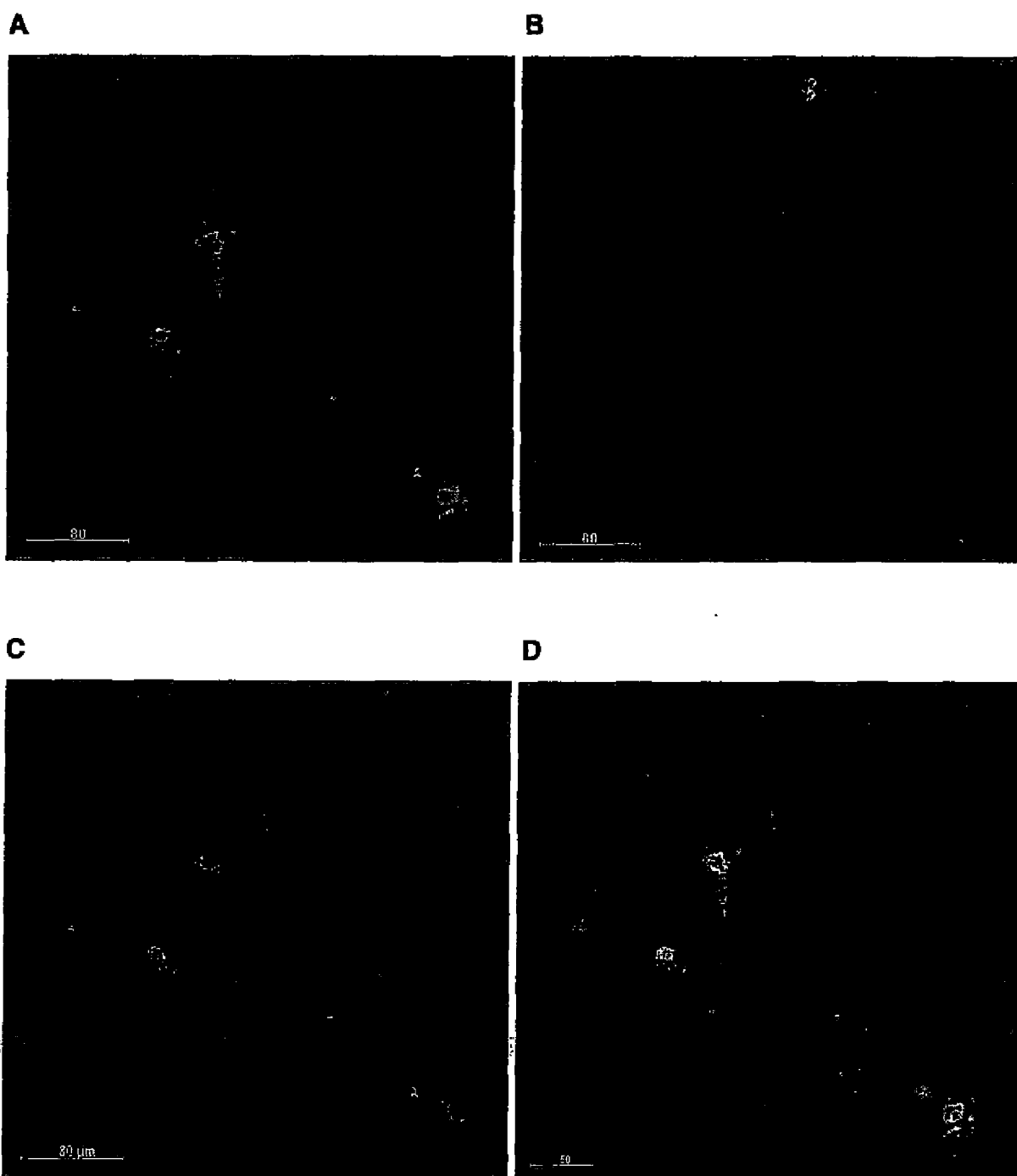


35/43  
Fig. 10

36/43  
Fig. 11

37/43  
Fig. 12



38/43  
Fig. 13

39/43  
Fig. 14

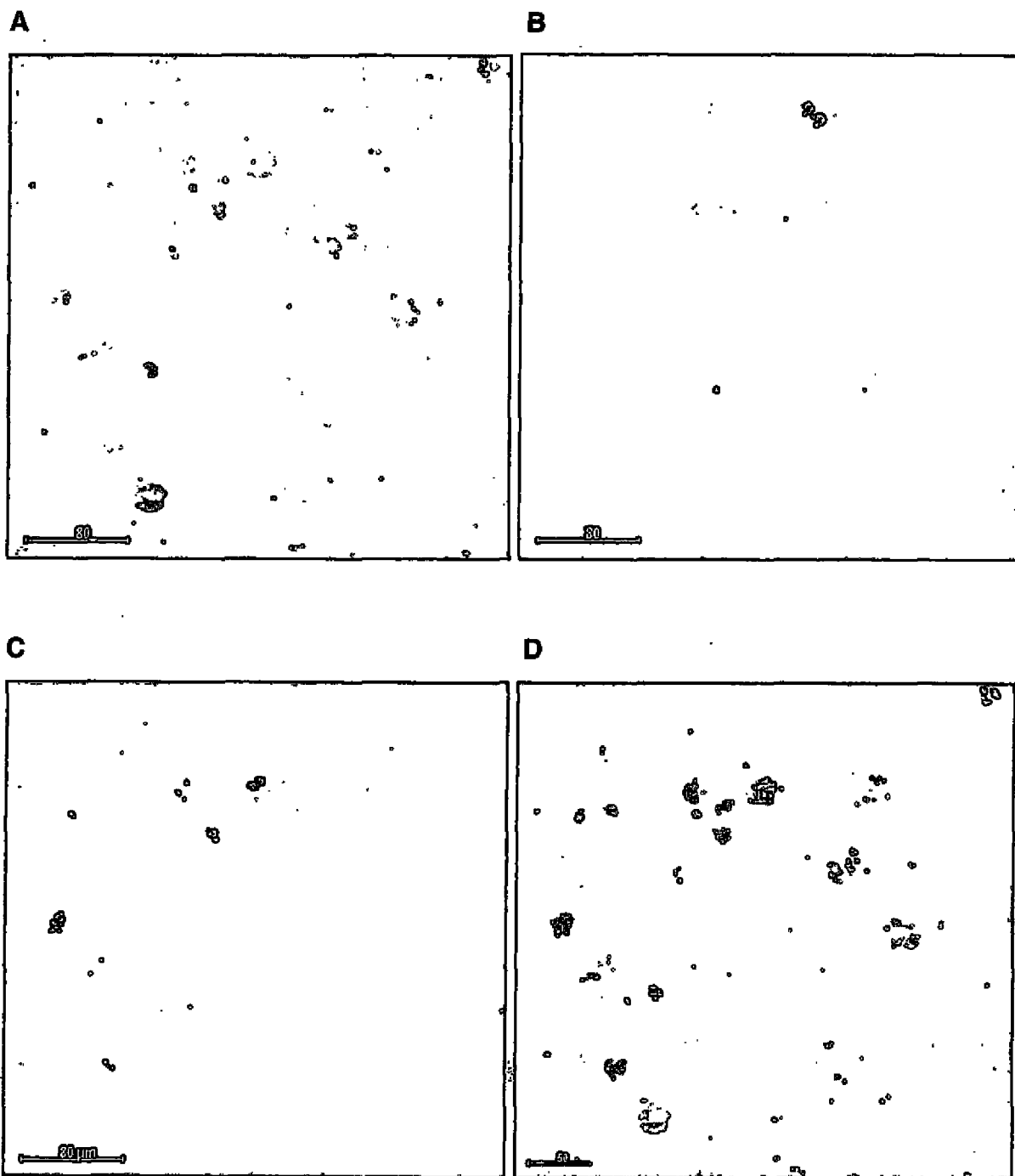


Fig. 15 - 1

40/43

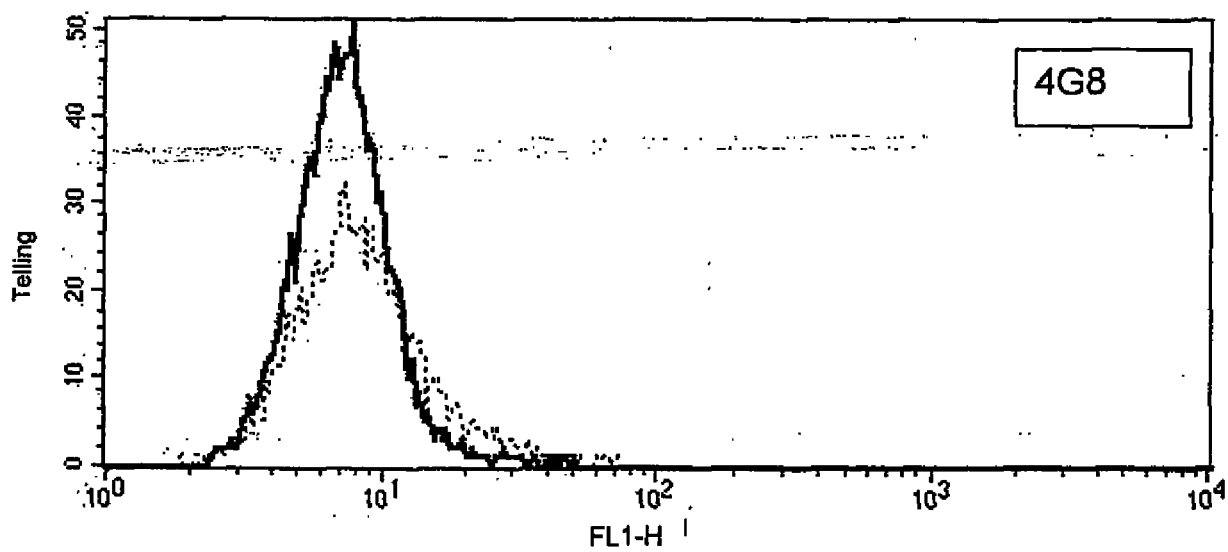
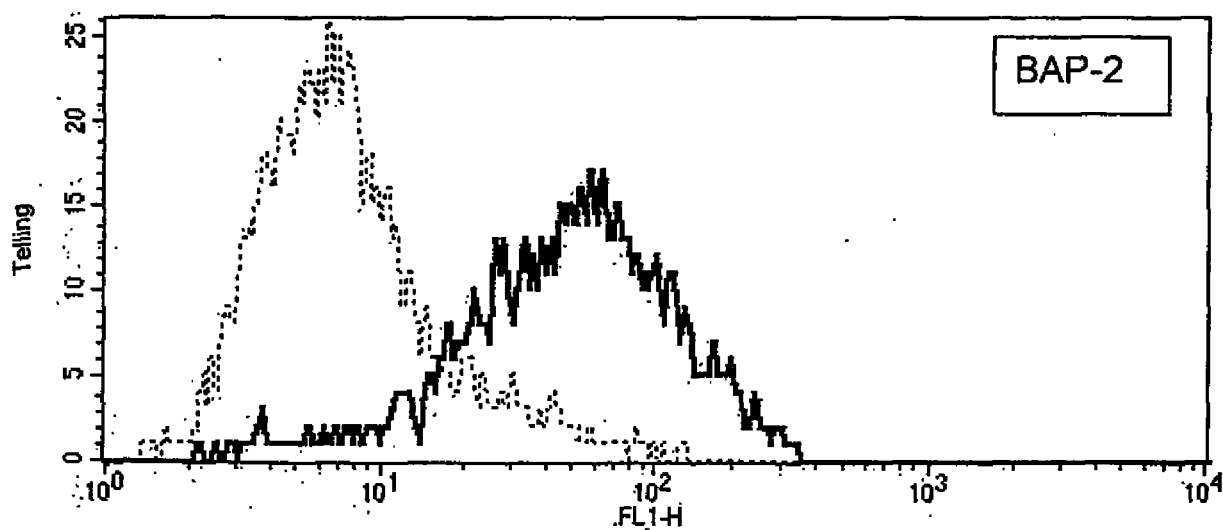
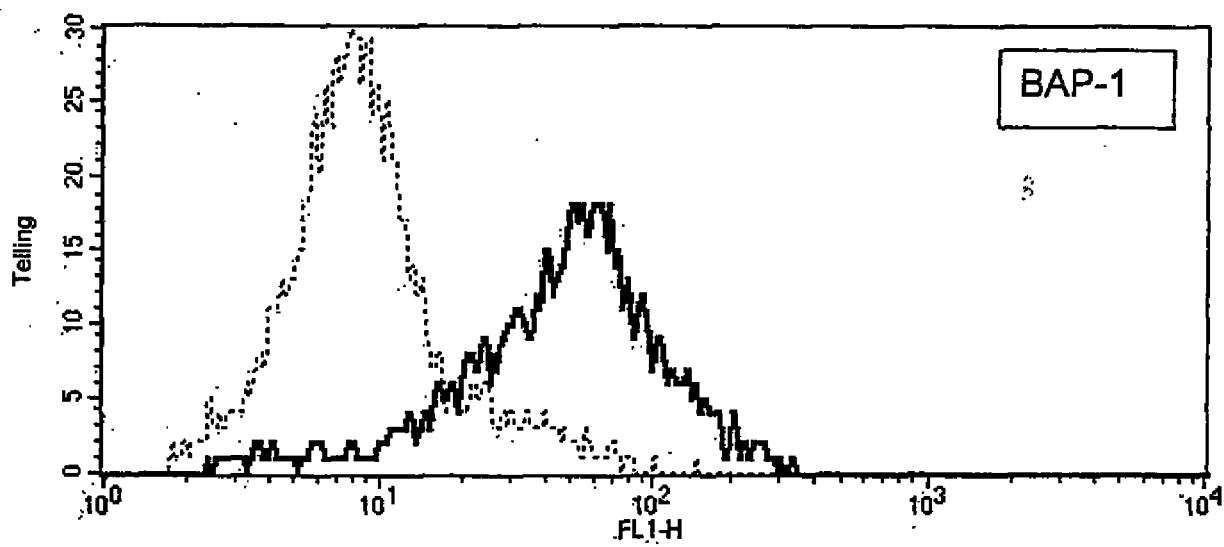


Fig. 15 - 2 41/43

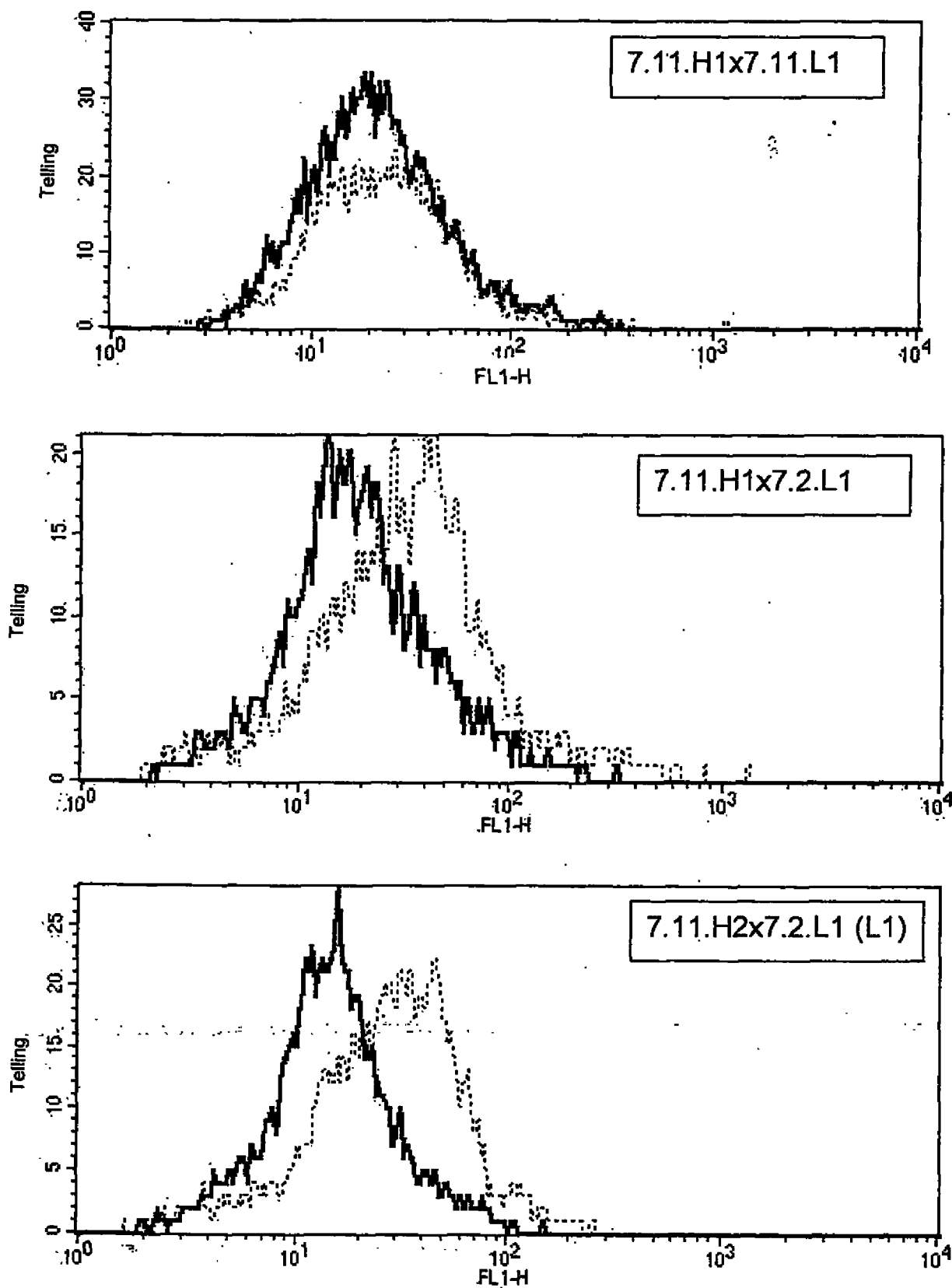


Fig. 15 - 3 42/43

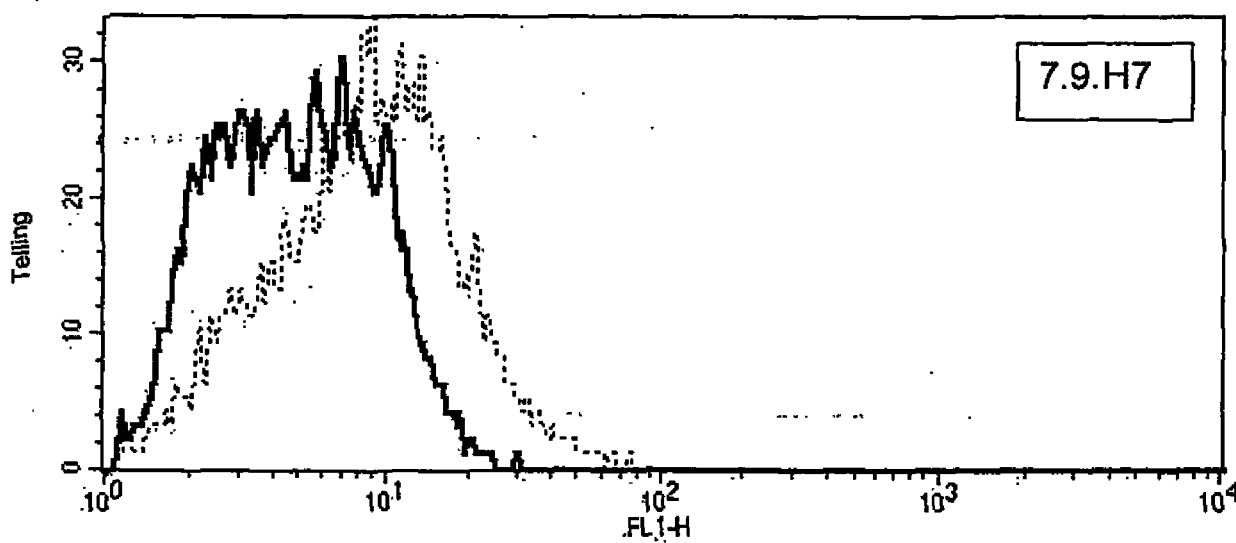
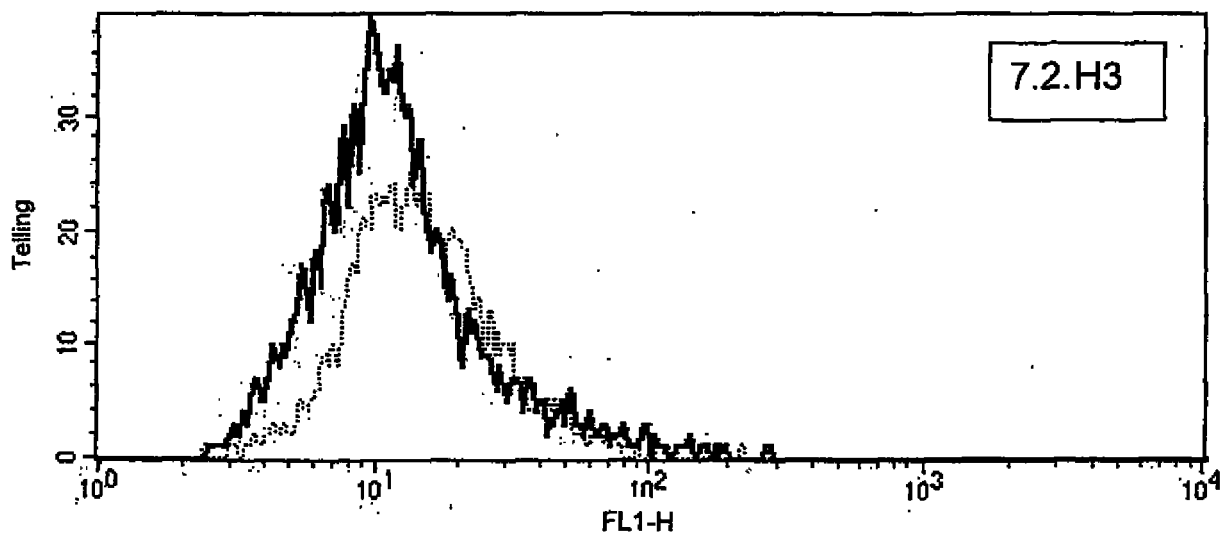
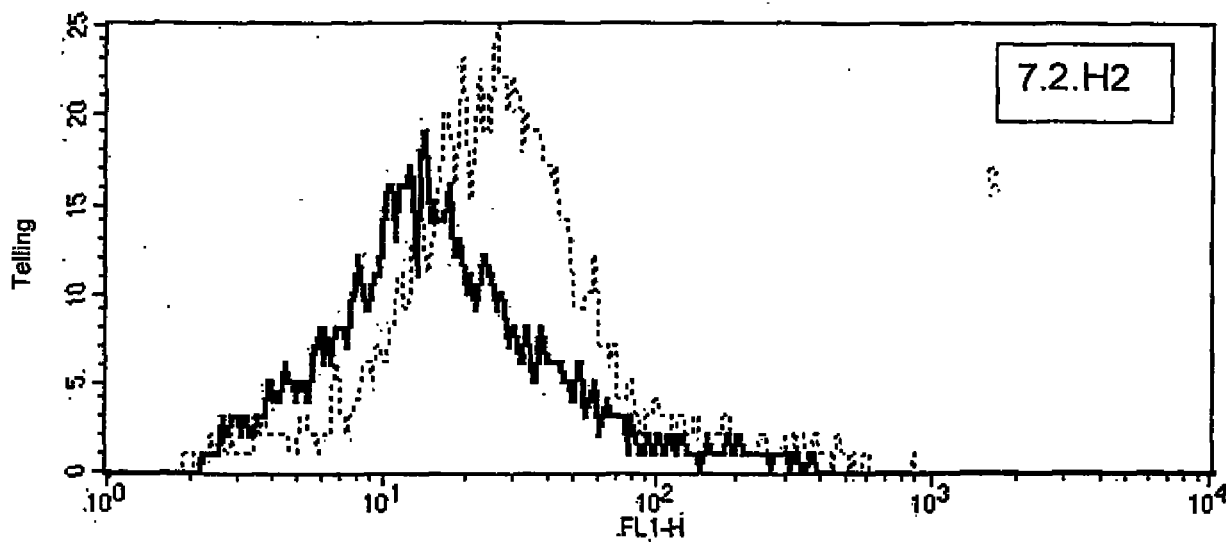


Fig. 15 - 4

43/43

