



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 322252

(13) B1

(51) Int Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19954626	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1995.03.16 PCT/EP95/00978
(22)	Inng.dag	1995.11.16	(85)	Videreføringsdag	1995.11.16
(24)	Løpedag	1995.03.16	(30)	Prioritet	1994.03.17, EP, 94104160 1994.12.02, EP, 94118970
(41)	Alm.tilgj	1995.11.16			
(45)	Meddelt	2006.09.04			
(73)	Innehaver	Merck Patent GmbH, Frankfurter Strasse 250, 64293 DARMSTADT, DE			
(72)	Oppfinner	Mary M. Bendig, London, England, GB Cathrine A. Kettleborough, Watford, England, GB Keith H. Ansell, Hatfield, England, GB Detlef Güssow, London, England, GB Jaume Adan, Mataró, ES Francesc Mijans, Igualada, ES Elisabet Rosell, Barcelona, ES Francesc Blasco, Sant Just Desvern, ES Jaume Piulats, Barcelona, ES			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 7085 Majorstua, 0306 OSLO, NO			

(54)	Benevnelse	Anti-EGFR-enkeltkjede-Fv-er, DNA-molekyl som koder for denne, fremgangsmåte for fremstilling av denne, kimert anti-EGFR-antistoff, fremgangsmåte for fremstilling av helt kimert anti-EGFR-antistoff, farmasøytisk preparat som omfatter disse og anvendelse av disse for fremstilling av legemiddel mot tumorer.			
(56)	Anførte publikasjoner	Clackson et al., 1991, Nature, Vol. 352, pp. 624-628. Kettleborough et al., 1991, Protein Engineering, Vol. 4, No. 7, pp. 773-783.			
(57)	Sammendrag				

Denne oppfinnelsen vedrører nye anti-EGFR-antistoffer og enkeltkjede-Fv-er (scFv-er) derav som kan erholdes fra fagantistoffbiblioteker konstruert fra celler fra et immunisert pattedyr, fortrinnsvis en mus. To av enkeltkjede-Fv-ene isolert fra fagantistoffbibliotekene, ble bearbeidet for å danne delvis humaniserte, hele antistoffmolekyler. Disse kimære anti-EGFR-antistoffer inneholder konstante områder fra humanimmunglobuliner og kan anvendes på samme måte som enkeltkjede-Fv-er som midler for diagnose og terapi av humantumorer.

Oppfinnelsens tekniske område

Denne oppfinnelsen vedrører nye anti-EGFR-antistoffer og antistofffragmenter, fortrinnsvis enkeltkjede-Fv-er (scFv-er) som kan fås fra fagantistoffbiblioteker konstruert fra
5 celler fra et immunisert pattedyr, fortrinnsvis en mus. Antistofffragmentene isolert fra fagantistoffbibliotekene, kan bearbejdes slik at det dannes delvis humaniserte, hele antistoffmolekyler. Disse kimære anti-EGFR-antistoffene inneholder konstante områder av humanimmunglobuliner og kan anvendes, på
10 samme måte som deres fragmenter, som midler for diagnose og behandling av humantumorer.

Dessuten viser oppfinnelsen at fagantistoffbiblioteker er en alternativ, og mer allsidig, fremgangsmåte for isolering av antistoffer fra immuniserte pattedyr sammenlignet
15 med den vanlige hybridomteknikken.

Oppfinnelsen vedrører dessuten farmasøytiske preparater som omfatter antistoffene eller fragmentene, for de formål å behandle tumorer som melanom, gliom eller karsinom. Antistoffene eller fragmentene kan anvendes også til diagnostiske applikasjoner når det gjelder lokalisering og vurdering
20 av tumorene *in vitro* eller *in vivo*.

Oppfinnelsen gjelder dermed anti-EGFR-enkeltkjede-Fv, kjennetegnet ved at den er mulig å fremskaffe fra et bakteriofagantistoffbibliotek som er fremstilt fra lymfeknuten til en
25 immunisert mus (i), milten til en immunisert mus (ii) eller *in vitro*-immuniserte museceller (iii), der den variable regionen til enkeltkjede-Fv omfatter en tungkjede- og en lettkjede-sekvens som er valgt fra gruppene som består av

- (i) L2 12B som er gitt ved lettkjeden med sekvensidentitet
30 nr.6 og tungkjeden med sekvensidentitet nr.8,
L3 11D som er gitt ved lettkjeden med sekvensidentitet nr.10 og tungkjeden med sekvensidentitet nr.12,
L3 10A som er gitt med lettkjede og tungkjede i figur 1(A),
35 L2 1C som er gitt med lettkjede og tungkjede i figur 1(A),
(ii) S4 2D som er gitt ved lettkjeden med sekvensidentitet nr.14 og tungkjeden med sekvensidentitet nr.16,

S4 10H som er gitt med lettkjede og tungkjede i figur 1(B),

S4 5A som er gitt med lettkjede og tungkjede i figur 1(B),

- 5 (iii) 4B2 som er gitt ved lettkjede og tungkjede i sekvensidentitet nr.18,
10D2 som er gitt ved lettkjede og tungkjede i sekvensidentitet nr.20,
3D3 som er gitt ved lettkjede og tungkjede i
10 sekvensidentitet nr.22,
IE3 som er gitt ved lettkjede og tungkjede i sekvensidentitet nr.24.

Den gjelder også DNA-molekyl, kjennetegnet ved at det koder for anti-EGFR-enkeltkjede-Fv-molekylet ifølge
15 oppfinnelsen.

Oppfinnelsen gjelder videre kimert anti-EGFR-antistoff, kjennetegnet ved at det er kodet for av et DNA-molekyl som omfatter sekvenser ifølge oppfinnelsen og sekvenser som koder for tungkjede- og lettkjedekonstantområder i humane immuno-
20 globuliner.

Oppfinnelsen vedrører også fremgangsmåte for fremstilling av et anti-EGFR-enkeltkjede-Fv ifølge oppfinnelsen, kjennetegnet ved at den omfatter følgende trinn:

- (i) isolering av RNA fra immuniserte museceller som er
25 fremskaffet ved

immunisering med A431-celler, løsrevne membranvesikler fra A431-celler eller

renset humant EGFR,

- (ii) syntetisering av førstetråds-cDNA,

- 30 (iii) amplifisering av V_H - og V_K -genene i cDNA fra de immuniserte cellene,

(iv) kloning av nevnte gener sammen med egnede restriksjonssteder inn i en fagemidvektor,

- 35 (v) transformering av prokaryote celler med ligeringsblandingen,

(vi) screening av fagbibliotekene for fagantistoffer rettet mot EGFR ved å benytte

renset EGFR og

(vii) fremstille nevnte enkeltkjede-Fv i prokaryote
 vertsceller, fortrinnsvis E.coli og fremgangsmåte for
 fremstilling av et helt kimert anti-EGFR-antistoff,
 5 kjennetegnet ved at det foregår ved å klonе DNA ifølge
 oppfinnelsen som koder for tungkjede- og lettkjedevariabel-
 områdene til anti-EGFR-antistofffragmenter som er mulig å
 fremskaffe ved hjelp av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen,
 inn i minst én eukaryot ekspresjonsvektor som inneholder
 10 genomisk DNA som koder for tungkjede- og lettkjedekonstant-
 områdene til humane immunoglobuliner, transformere eukaryote
 celler med nevnte vektor(er) og uttrykke og isolere
 antistoffet, farmasøytisk preparat, kjennetegnet ved at det i
 en farmasøytisk effektiv mengde omfatter et anti-EGFR-
 15 enkeltkjede-Fv ifølge oppfinnelsen eller et helt kimert anti-
 EGFR-antistoff ifølge oppfinnelsen, eventuelt sammen med en
 bærer, et fortynningsmiddel eller en eksipiens og anvendelse
 av et anti-EGFR-enkeltkjede-Fv ifølge oppfinnelsen eller et
 helt anti-EGFR-antistoff ifølge oppfinnelsen, for fremstilling
 20 av et legemiddel som er rettet mot tumorer.

Beskrivelsen vedrører flere tekniske uttrykk som her-
 ved er definert som følger:

"FR-er" (rammeområder) betyr de fire underområdene i
 de variable områdene til lett eller tung kjede som understøt-
 25 ter de tre CDR-ene.

"CDR-er" (komplementaritetsbestemmende områder) betyr
 de tre underområdene i de variable områdene til lett eller
 tung kjede som har hypervariable sekvenser og som danner
 sløfestructurer som primært er ansvarlige for å lage direkte
 30 kontakt med antigen.

"Kimære" eller delvis humaniserte antistoffer betyr
 antistoffer som omfatter konstante områder som skriver seg fra
 humankilder, og variable områder (CDR-er inkludert) som
 skriver seg fra ikke-humane kilder, f.eks. fra mus.

35 "Humaniserte" eller fullstendig humaniserte antistof-
 fer betyr antistoffer som omfatter konstante områder, og FR-er
 som skriver seg fra humane kilder, mens CDR-ene skriver seg
 fra ikke-humane kilder.

"EGF" og "EGFR" betyr epidermvekstfaktoren og dens reseptor.

"PCR" betyr polymerasekjedereaksjonen.

"scFv" betyr enkeltkjede-Fv som er et antistofffragment.
5 ment.

"V_L" betyr variabelt område i lett kjede.

"V_K" betyr variabelt område i kappa-lettkjede.

"V_H" betyr variabelt område i tung kjede.

PBS betyr fosfatbufret koksaltoppløsning.

10 FCS betyr kalvefosterserum.

HBSS betyr Hanks balanserte saltoppløsning.

FITC betyr fluoresceinisotiocyanat.

MTC betyr blandet cellekultur.

15 Oppfinnelsens bakgrunn

Epidermvekstfaktor (EGF) er et polypeptidhormon som er mitogent for epiderm- og epitelceller. Når EGF reagerer med følsomme celler, bindes det til membranreseptorer (EGFR). EGFR er et transmembranglykoprotein på ca. 170 kD og er et genprod-
20 ukt av c-erb-B-*proto-onkogenet*.

MAb 425 er et murint, monoklonalt antistoff frembrakt mot den velkjente, humane A431 karsinomcellelinje (ATCC CRL 1555) som bindes til en polypeptidepitop i det eksterne domene i human-EGFR, og som inhiberer bindingen av EGF. MAb 425 (ATCC
25 HB 9629) ble funnet å mediere tumorcytotoksitetet *in vitro* og undertrykke tumorcellevekst av epidermoide og colorektale, karsinomavledede cellelinjer *in vitro* (Rodeck et al., Cancer Res. 1987, 47:3692). Humaniserte og kimære versjoner av MAb 425 er blitt beskrevet i WO 92/15683.

30 I løpet av de siste få årene er det blitt beskrevet fremgangsmåter (Skerra og Plückthun, Science 1988, 240:1038; Better et al., Science 1988, 240:1041) hvorved funksjonelle antistofffragmenter kan produseres i eukaryote vertsceller, slik som *E. coli*. Disse omfatter Fv-fragmentet og Fab-fragmentet,
35 idet Fv-fragmentet er av spesiell interesse. Enkeltkjede-Fv-er (hvor V_L- og V_H-kjeden er bundet sammen) er også blitt beskrevet (Bird et al., Science 1988, 242:423; Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85:5879).

Fagantistoffbiblioteker byr på en alternativ teknologi i forhold til hybridomteknologien når det gjelder isoleringen av antistoffer fra immuniserte dyr. Hybridomteknologi virker ved å udødeliggjøre cellene som produserer antistoffene. Fagantistoffteknologi virker ved å udødeliggjøre genene som koder for antistoffene (Winter, G. og Milstein, C., Nature 1991, 349:293). Ved fagantistoffteknologi PCR-amplifiseres genene for det variable område i antistofftungkjede (V_H) og variabelt område i lett kjede (V_L), de variable områdene kombineres vilkårlig og uttrykkes som antistofffragmenter på overflaten av fagpartikler, og biblioteker med fagantistoffer screenes med hensyn på antistoffer som binder seg til antigener av interesse.

Hybridomteknologi har vært svært vellykket når det gjelder å isolere monoklonale antistoffer fra mus når det har vært mulig å frembringe en sterk immunrespons i miltene til dyrene. For eksempel er muse-MAb-er mot humanepidermvekstfaktorreseptor (EGFR) blitt isolert fra miltene til mus immunisert intraperitonealt med humane A431-tumorceller (Murthy et al., Arch. Biochem. Biophys. 1987, 252:549). Den potensielle fordel ved fagantistoffteknologi sammenlignet med hybridomteknologi, er at praktisk talt hvilken som helst kilde for antistoffuttrykkende celler kan brukes som utgangsmateriale, og at det store antall av forskjellige antistoffer kan screenes hurtig. En annen fordel ved fagantistoffteknologien er at genene som koder for de variable områdene i antistoffene av interesse, allerede er blitt klonet og er umiddelbart tilgjengelige for videre genteknisk bearbeidelse.

I én rapport ble et anti-tetanustoksoid-Fab-fragment isolert fra et fagantistoffbibliotek omdannet til et helt antistoffmolekyl (Bender et al., Hum. Antibod. Hybridomas 1993, 4:74).

I løpet av de siste ti årene er *in vitro* immunisering blitt brukt som en alternativ teknikk til aktiv immunisering for å frembringe monoklonale antistoffer (mAb-er) mot mange forskjellige antigener fra både humane og murine systemer (f.eks. Vaux, D.J.T.; Helenius, A. og Mellman, I.; Nature, 1988, 336:36; Gathuru, J.K. et al., J. Immunol. Methods, 1991,

137:95; Borrebaeck, C.A.K.; Immunol. Today, 1988, 9:355). Fordeler ved denne fremgangsmåten er at bare små mengder antigen er påkrevet og at fremgangsmåten er anvendbar for frembringelse av humanhybridomer. Frembringelsene av IgM-antistoffer med dårlig affinitet og vanskeligheten med å udødeliggjøre humanlymfocytter etter *in vitro* immunisering er imidlertid blitt gjenstridige problemer forbundet med denne teknologien.

En ny måte for å oppnå antistoffer er ved hjelp av PCR-amplifikasjon av samlinger av gener for variabelt område i tung (V_H) og lett (V_L) kjede som så rekombineres vilkårlig og uttrykkes som fagfremvisningsbiblioteker (7-9). Gener for variabelt område i antistoff ble klonet og smeltet sammen med det mindre kappeprotein (gen 3) som et enkeltkjede-Fv-fragment (scFv) (10). Fagpartikkelen fremviser på sin overflate antistoffragmentet og kan velges ut ved "panning" under anvendelse av antistoffets bindende egenskaper. Denne teknologien har den fordel at vilkårlig rekombinasjon av V-gener kan gi nye paringer med nye spesifisiteter og affiniteter som ikke ville kunne velges ut ved hjelp av naturlige prosesser. En slik fremgangsmåte muliggjør dessuten bruken av naive eller *in vitro* immuniserte lymfocytter fra murine eller humane kilder.

Tidligere forsøk på å oppnå mAb-er mot EGFR ved hjelp av murine B-celler, *in vitro* immunisering og hybridomteknologi ga lavaffinitets-, kryssreagerende antistoffer. For å overvinne slike ulemper ble kombinasjonen av *in vitro* immunisering etterfulgt av PCR-kloningsteknologi, utført.

Det er derfor et formål ved oppfinnelsen å utvikle antistoffer og antistoffragmenter som har en høy affinitet til EGF-reseptoren, og som kan oppnås ved hjelp av den fordelaktige fremgangsmåten beskrevet ovenfor og nedenunder.

Oppsummering av oppfinnelsen

Denne oppfinnelsen sammenligner muse-anti-EGFR-antistoffer isolert fra tre forskjellige fagantistoffbiblioteker med et muse-MAb (425) isolert ved hjelp av standard hybridomteknologi (Murthy et al., Arch. Biochem. Biophys. 1987, 252:549; Kettleborough et al., Protein Eng. 1991, 4:773). Det ble fremstilt biblioteker, ikke bare fra milten til en immu-

isert mus, men også fra den drenerende lymfeknute hos en immunisert mus og fra *in vitro* immuniserte museceller. To av enkeltkjede-Fv-ene (scFv-ene) som var isolert fra bibliotekene, ble bearbeidet for å danne kimære, hele antistoffmolekyler med de variable områdene fra mus knyttet til humane, konstante områder.

Nærmere bestemt vedrører foreliggende oppfinnelse et anti-EGFR-enkeltkjede-Fv som lar seg erholde fra fagantistoffbiblioteker konstruert fra celler, fortrinnsvis fra milten eller den drenerende lymfeknute fra et immunisert pattedyr, fortrinnsvis en mus, eller fra *in vitro* immuniserte celler. I prinsippet er oppfinnelsen ikke begrenset til scFv-er, men omfatter også andre anti-EGFR-antistofffragmenter, slik som Fab eller F(ab')₂.

Noen av scFv-ene ifølge oppfinnelsen har veldefinerte DNA- og aminosyresekvenser. Det er derfor et annet formål ved oppfinnelsen å tilveiebringe et enkeltkjede-Fv-fragment hvor de variable områdene i den tunge og lette kjede omfatter en DNA- og/eller en aminosyresekvens valgt fra én av tung- og lettkjedesekvensene angitt i sekvensidentitetene nr. 1-32, fortrinnsvis i figur 5-8.

Ettersom i mange tilfeller bare fullstendig virkende, hele antistoffer kan anvendes til diagnostiske og terapeutiske formål, er det i oppfinnelsens interesse å knytte de variable områdene fra enkeltkjede-Fv-er til de konstante områdene i humanimmunglobuliner som danner hele, delvis eller humaniserte anti-EGFR-antistoffer.

Det er derfor et formål ved denne oppfinnelsen å tilveiebringe et helt anti-EGFR-antistoff konstruert fra DNA-sekvenser som skriver seg fra antistofffragmenter som definert ovenfor, nedenunder eller som definert i kravene, og fra DNA-sekvenser som er utledet fra konstante områder av humanimmunglobuliner, hvor den tunge kjede som en foretrukket utførelsesform, omfatter aminosyresekvensen til en gamma-1-kjede, og den lette kjeden omfatter aminosyresekvensen til en kappa-kjede.

Ifølge foreliggende oppfinnelse isoleres anti-EGFR-scFv-ene ved å bruke fag-antistoffbiblioteksteknologien. Opp-

finnelsen vedrører derfor en fremgangsmåte for fremstilling av et anti-EGFR-enkeltkjede-Fv som omfatter de følgende trinn:

- (i) isolering av RNA fra immuniserte pattedyrceller, fortrinnsvis museceller,
- 5 (ii) syntetisering av førstetråds-cDNA,
- (iii) amplifisering av V_H - og V_L -genene i cDNA-er fra de immuniserte celler,
- (iv) kloning av genene sammen med egnede restriksjonssteder i en fagmidvektor,
- 10 (v) transformering av prokaryote celler med ligeringsblandingene,
- (vi) screening av fagbibliotekene med hensyn på fagantistoffer rettet mot EGFR under anvendelse av rensset EGFR, og
- 15 (vii) fremstilling av det ønskede enkeltkjede-Fv i prokaryote vertsceller, fortrinnsvis *E. coli*.

I tillegg er det et formål ved oppfinnelsen å beskrive en fremgangsmåte for fremstilling av et helt anti-EGFR-antistoff ved kloning av den DNA som koder for de variable områdene i anti-EGFR-antistofffragmenter fremstilt som angitt ovenfor, eller som definert i kravene, i minst én eukaryot ekspresjonsvektor som inneholder genom-DNA og som koder for de konstante områdene til humanimmunglobuliner, transformere eukaryote celler med vektoren(e) og uttrykke og isolere anti-

25 stoffet.

Anti-EGFR-scFv-ene, og fremfor alt, de hele anti-EGFR-antistoffer, kan anvendes i diagnose og behandling av humantumorer. Oppfinnelsen vedrører således et farmasøytisk preparat som omfatter et anti-EGFR-enkeltkjede-Fv eller et

30 helt anti-EGFR-antistoff som definert ovenfor eller som definert i kravene.

Resultatene og fordelene ved foreliggende oppfinnelse kan oppsummeres på følgende måte:

Nye muse-anti-EGFR-antistoffer ble isolert fra fagantistoffbiblioteker. De nye antistoffene utgjorde minst fire

35 forskjellige V_H -undergrupper og fire forskjellige V_L -undergrupper (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5. utg., U.S. Dept. of Health and Human Services,

Bethesda 1991). De oppviste forskjellige paringer og sekvenser sammenlignet med de som ble brukt av et muse-MAb isolert under anvendelse av hybridomteknologi. Muse-425-MAb har en V_H2b- og V_K4-paring som ikke ble observert i fagantistoffene. V_H til scFv L3 11D hadde den høyeste prosentvise identitet med 425 V_H (84,9%). Hoveddelen av forskjellene var i CDR-ene. V_K til scFv S4 2D hadde den høyeste prosentvise identitet med 425 V_K (83,2%). Igjen var hoveddelen av forskjellene i CDR-ene, særlig CDR3. Ved denne oppfinnelsen ble mange forskjellige nye anti-EGFR-antistoffer isolert fra fagantistoffbibliotekene, og disse antistoffene atskiller seg alle fra 425 MAb ved at minst to av scFv-ene gjenkjenner en annen epitop på EGFR enn den som gjenkjennes av 425 MAb. Dette er i motsetning til en tidligere rapport hvor antistoffene isolert fra kombinasjonsbiblioteker, ble rapportert å være svært like med de som ble isolert ved hjelp av hybridomteknologi (Caton og Koprowski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87:6450).

Av de tre fagantistoffbibliotekene var det beste bibliotek når det gjelder antallet av seleksjonstrinn som var påkrevet for å få høyaffinitetsantistoffer, og når det gjelder diversiteten til høyaffinitetsantistoffer isolert, det biblioteket som ble frembrakt fra den drenerende lymfeknute. Lymfeknuter ble valgt ut som en kilde for RNA for konstruksjonen av fagantistoffbiblioteker av to grunner. For det første hadde tidligere arbeide vist at en høyere andel av B-celler som produserer høyaffinitets-IgG-antistoffer, ble erholdt fra knehaselymfeknutene etter immunisering via fotputen, enn fra milter etter immunisering via bukningen (Venn og Dresser, J. Immunol. Methods 1987, 102:95). For det andre anses drenerende lymfeknuter som en god kilde for isoleringen av humane anti-tumorantistoffer. Isoleringen av muse-anti-EGFR-antistoffer fra knehaselymfeknuten til en fotputeimmunisert mus var således en modell for isoleringen av humane anti-EGFR-antistoffer fra armhulelymfeknutene til en brystkreftpasient. Lettvintheten ved å fremstille biblioteker med god størrelse fra små mengder av lymfeknutemateriale og så isolere høyaffinitetsantistoffer fra bibliotekene, ble demonstrert.

Selv om muse-anti-EGFR-antistoffer ble isolert fra

alle tre fagantistoffbibliotekene, er det ikke klart at hvilket som helst av de nyisolerte antistoffer har høyere affiniteter enn muse-425-MAb isolert ved å bruke hybridomteknologi. I de første analysene syntes de fagantistoff-

5 avledede scFv-er å binde seg til EGFR bedre enn det scFv som ble konstruert fra 425 MAb (figur 2). I andre forsøk med kimære, hele antistoffmolekyler oppviste ett av de kimære antistoffene (S4 2D) en affinitet for EGFR som var lik affiniteten til det kimære 425-antistoff. Det andre kimære antistoff

10 (L3 11D) hadde en affinitet som var fire ganger lavere enn affiniteten til kimært 425-antistoff (figur 4). Bindingsdata erholdt ved å bruke scFv-er, var misvisende, sannsynligvis fordi preparater av scFv-er kan inneholde blandinger av monomerer og dimerer (Griffiths et al., EMBO J. 1993, 12:725). I

15 motsetning til dette forventes ikke kimære IgG-antistoffer å danne dimerer, og de kimære L3 11D- og S4 2D-antistoffer ble vist å være av den størrelse som var forventet for toverdige, monomere, kimære IgG-antistoffer. Analyse av affinitetsrensede preparater av 425-, L3 11D- og S4 2D-scFv-er viste imidlertid

20 at disse preparatene av scFv-er inneholdt monomer-, dimer- og andre multimerformer. I tillegg varierte de relative andelene av monomer- og multimerformer for hvert scFv. 425-scFv hadde den laveste prosentandel av dimerformer. Som forutsagt, oppviste dimer- og særlig de større multimerformene sterkere binding til rensset EGFR enn monomerformen gjorde. Det synes som

25 om 425 scFv har en lavere tendens til å dimerisere enn noen av de nyisolerte scFv-er.

Selv om ekspresjonen av antistofffragmenter på overflaten av fagpartikler danner grunnlaget for en kraftfull

30 fremgangsmåte for hurtig utvelgelse av antistoffer med de ønskede spesifisiteter, er det ikke sannsynlig at hverken fagantistoffer eller antistofffragmentene selv (scFv-er eller Fab-er) er det ønskede sluttprodukt. Videre er det vist hvordan muse-scFv-ene isolert fra fagbiblioteker, lett kan omdannes

35 til hele antistoffmolekyler. I dette tilfellet ble de variable museområdene knyttet sammen til humane, konstante områder for å danne delvis humaniserte, kimære antistoffer.

Disse resultatene viser at det er mulig å bruke fag-

antistoffteknologi til å isolere mange forskjellige anti-EGFR-antistofffragmenter fra immuniserte mus. Hele antistoffmolekyler med de ønskede konstante områder kan så konstrueres fra antistofffragmentene. I noen tilfeller vil hybridomteknologi
5 fortsatt kunne være den fremgangsmåte som velges for å isolere monoklonale antistoffer fra mus. Dersom et svært immunogent antigen er tilgjengelig og dersom noen få hybridomcellelinjer som produserer ett eller flere forskjellige anti-antigen-antistoffer er adekvate, er det sannsynligvis liten grunn til
10 å vurdere fagantistoffteknologi. Dersom imidlertid spesielle immuniseringsfremgangsmåter, slik som fotputeinjeksjoner, ville være fordelaktige ved frembringelse av høyaffinitetsantistoffer, eller dersom et stort antall antistoffer mot mange forskjellige epitoper på antigenet er påkrevet, eller
15 dersom antistoffer rettet mot en svært fintfølede, og muligens mindre immunogen, epitop er påkrevet, vil fagantistoffteknologi kunne være den fremgangsmåte som velges. Dersom det videre forventes ytterligere genteknikkbearbeiding av antistoffene, er fagantistoffteknologien fordelaktig ved at
20 antistoffgenene allerede er blitt klonet.

Den foreliggende fremgangsmåte med kombinerings *in vitro* og immunisering med et bestemt antigen og PCR-kloningsteknologi har frembrakt scFv-fragmenter som reagerer med EGFR og som ikke kryssreagerer med andre antigener. Immuniserings-
25 fremgangsmåtene som her er rapportert, avhenger av antigenpresentasjonen, som ikke er oppløselig, men er et membranvesikkelpreparat, og av selve dyrkningsmediet som er uten FCS. Begge metodikkene er blitt rapportert som et middel for å øke virkningsfullheten av *in vitro* immunisering ved å gjøre antigenet tilgjengelig for de antigenpresenterende celler (f.eks.
30 Brams, P. et al.; J. Immunol. Methods, 1987, 98:11).

Resultatene oppnådd med MTC, er i overensstemmelse med de tidligere artikler (f.eks. Borrebaeck, C.A.K. og Möller, S.A.; J. Immunol., 1986, 136:3710; Möller, S.A. og
35 Borrebaeck, C.A.K., i Borrebaeck, C.A.K. (red.), *In vitro Immunization in Hybridome Technology*, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam 1988, s. 3) hvor det foreslås anvendelse av MTC-supernatanter som en kilde for lymfokiner for

forbedring av den *in vitro* immuniseringsprosess. Membranvesik-
kelpreparatet bør betraktes som et polyantigen ettersom mange
forskjellige antigene determinanter er til stede i slike
vesikler. Av denne grunn vil det fremgå at de induserer et
5 visst nivå av polyklonal aktivering. Vi har utelukket dette
ettersom den anti-EGFR-spesifikke respons var klart forskjel-
lig fra responsen oppnådd etter en standard polyklonal aktiva-
tor.

I stedet for å udødeliggjøre B-cellene etter *in vitro*
10 immuniseringer har vi brukt den molekylære strategi med å
udødeliggjøre antistoff- V_H - og - V_L -genene. Disse monoklonale
antistofffragmentene ble uttrykt og produsert i bakterier. Fag-
fremvisningsystemet er en kraftfull fremgangsmåte for å iso-
lere antistofffragmenter mot spesifikke antigener. Tilstedevær-
15 elsen av et stoppkodon mellom antistofffragmentet og g3p-
kappeproteinet muliggjør vekslingen mellom overflatefremvis-
ning og sekresjon som et oppløselig scFv-fragment under anven-
delse av suppressor- eller ikke-suppressorstammer (Hoogenboom
et al., Nucl. Acids Res. 1991, 19:4133).

20 På grunn av økningen av spesifikk respons og mRNA-
nivåer i *in vitro* antigenstimulerte B-celler bidrar *in vitro*
immunisering til isoleringen av antistofffragmenter med høye
spesifisiteter til antigenet. Etter to runder med utvelgelse
var 100% av klonene positive med hensyn til binding til EGFR.
25 I motsetning til dette var kloner avledet fra *in vivo* immunis-
eringsprosesser, 100% positive bare etter fire runder med ut-
velgelse (Kettleborough et al., EP 94104160 og Eur. J.
Immunol. 1994, 24:952).

Bruken av fagfremvisningsbiblioteker fra naturlige
30 antistoffgener vil kunne gjøre det mulig å lage spesifikke
humanantistofffragmenter uten immunisering eller etter *in vitro*
immunisering. Antistofffragmenter kan fremstilles direkte i
bakterier, følgelig på en enkel, hurtig og økonomisk måte.

Biologiske materialer og generelle fremgangsmåter

Mikroorganismer, cellelinjer, plasmider, fagmider, promoterer, resistensmarkører, replikasjonsopprinnelsessteder eller andre fragmenter av vektorer som er nevnt i denne søknaden, er kommersielt eller generelt tilgjengelige på annen måte. Forutsatt at det ikke er gitt noen annen informasjon i søknaden, brukes de bare som eksempler og er ikke av avgjørende betydning i henhold til oppfinnelsen og kan erstattes av andre egnede, henholdsvis verktøy og biologiske materialer.

10 Bakterielle verter brukes fortrinnsvis for kloning av scFv-ene og for fremstilling av scFv-proteinene. Eksempler på disse vertene er: *E. coli* eller *Bacillus*.

Eukaryote verter, slik som f.eks. COS, CHO eller gjær, er foretrukket for å fremstille de hele anti-EGFR-antistoffer ifølge oppfinnelsen.

15 Teknikkene som er av avgjørende betydning ifølge oppfinnelsen, er beskrevet nærmere i beskrivelsen. Andre teknikker som ikke er beskrevet nærmere, tilsvarer kjente standardmetoder som er velkjente for fagfolk innen teknikken, eller 20 som er beskrevet nærmere i de angitte litteraturhenvisninger og patentsøknader, og i standardlitteraturen.

Kort beskrivelse av figurene:

25 Figur 1. Aminosyresekvenser til scFv-er isolert fra fagantistoffbiblioteker. (A) scFv-er fra lymfeknutebiblioteket. (B) scFv-er fra miltbiblioteket. Komplementaritetsbestemmende områder (CDR-er) og rammeområder (FR-er) er angitt.

30 Figur 2. Binding av scFv-er til EGFR. Konsentrasjonene av scFv-er i bakteriesupernatanter ble beregnet, og scFv-ene ble testet ved hjelp av ELISA med hensyn på binding på rensset EGFR. (A) scFv-er fra lymfeknutebiblioteket. (B) scFv-er fra miltbiblioteket. P1 (positiv kontroll) er scFv-et avledet fra 35 MAb 425. L1 og S1 (negative kontroller) er ikke-bindende scFv-er fra de forutvalgte lymfeknute- og miltbiblioteker.

Figur 3. Intermediære vektorer brukt til å rekonstruere de variable områdene for ekspresjon i pattedyrceller. (A) V_H-vektor. (B) V_K-vektor.

5 Figur 4. Binding av kimære, hele antistoffer til EGFR. Konsentrasjonen av antistoffer i COS-cellesupernatanter ble bestemt ved hjelp av ELISA og antistoffene testet ved hjelp av ELISA med hensyn på binding til renset EGFR.

10 Figur 5. DNA- og aminosyresekvens til scFv nr. L2 11C.
(A): lett kjede; (B): tung kjede.

Aminosyreposisjoner:

	(A)	FR-1: 1- 23,	CDR-1: 24-34,
		FR-2: 35- 49,	CDR-2: 50-56,
15		FR-3: 57- 88,	CDR-3: 89-97,
		FR-4: 98-109.	
	(B)	FR-1: 1- 30,	CDR-1: 31- 35,
		FR-2: 36- 49,	CDR-2: 50- 66,
20		FR-3: 67- 98,	CDR-3: 99-108,
		FR-4: 109-119.	

Figur 6. DNA- og aminosyresekvens til scFv nr. L2 12B.

(A): lett kjede; (B): tung kjede.

25 Aminosyreposisjoner:

	(A)	FR-1: 1- 23,	CDR-1: 24-38,
		FR-2: 39- 49,	CDR-2: 50-56,
		FR-3: 57- 88,	CDR-3: 89-97,
		FR-4: 98-109.	
30	(B)	FR-1: 1- 30,	CDR-1: 31- 35,
		FR-2: 36- 49,	CDR-2: 50- 66,
		FR-3: 67- 98,	CDR-3: 99-108,
		FR-4: 109-119.	

35

Figur 7. DNA- og aminosyresekvens til scFv nr. L3 11D.

(A): lett kjede; (B): tung kjede.

Aminosyreposisjonene til FR-ene og CDR-ene tilsvarer posi-

sjonene angitt i figur 6.

Figur 8. DNA- og aminosyresekvens til scFv nr. S4 2D.

(A): lett kjede; (B): tung kjede.

5 Aminosyreposisjoner:

(A) FR-1: 1- 23, CDR-1: 24- 35,
FR-2: 36- 50, CDR-2: 51- 57,
FR-3: 58- 89, CDR-3: 90- 98,
FR-4: 99-110.

10

(B) FR-1: 1- 30, CDR-1: 31- 35,
FR-2: 36- 49, CDR-2: 50- 66,
FR-3: 67- 98, CDR-3: 99-107,
FR-4: 108-118.

15

Sekvensene til figurene 5-8 er også angitt i den vedlagte sekvensliste som er en del av beskrivelsen av denne oppfinnelsen.

20 Nærmere beskrivelse av oppfinnelsen

(1) Konstruksjon og screening av fagantistoffbiblioteker

Tre fagantistoffbiblioteker ble konstruert, ett fra milten til en mus immunisert med human karsinomcellelinje A431 (8,8 x 10⁵ medlemmer), ett fra knehaselymfeknuten til en mus immunisert i fotputen med rensset EGFR (6,5 x 10⁶ medlemmer) og ett fra muselymfocytter immunisert *in vitro* med A431-vesikler (1,1 x 10⁵ medlemmer), (detaljer vedrørende konstruksjon av A431-vesikler og *in vitro* immunisering er angitt i eksemplene 1 og 2). Før utvelgelse ble minst 46 kloner fra hvert bibliotek analysert ved hjelp av BstNI-"fingeravtrykk" (Clackson et al., Nature 1991, 352:642) for å bestemme diversiteten i repertoarene. Et bredt område av fordøyelsesmønstre ble observert. Også før utvelgelse ble scFv-er fra 96 kloner fra hvert bibliotek testet ved hjelp av ELISA med hensyn på binding til EGFR. Ingen av scFv-ene fra milt- og lymfeknutebiblioteket ble bundet til EGFR. Ett av scFv-ene fra det *in vitro* immuniserte bibliotek ble bundet til EGFR. Etter én runde med utvelgelse

under anvendelse av EGFR-belagte immunorør ble det observert en klar anrikning med hensyn på EGFR-bindende scFv-er med lymfeknutebiblioteket, og med det *in vitro* immuniserte bibliotek. En andre runde med utvelgelse var nødvendig før det ble påvist
 5 noen EGFR-bindende scFv-er fra miltbiblioteket. Ved den tredje utvelgelsesrunden var hoveddelen av scFv-ene fra lymfeknutebiblioteket og det *in vitro* immuniserte bibliotek positive med hensyn på binding til EGFR. Etter en fjerde utvelgelsesrunde med miltbiblioteket var hoveddelen av scFv-ene positive med
 10 hensyn på binding til EGFR (tabell 1).

Tabell 1

Prosent EGFR-bindende kloner etter hver runde med utvelgelse

	Lymfeknutebibliotek	Miltbibliotek	Bibliotek med <i>in vitro</i> immuniserte celler
Før utvelgelse	0	0	1
Første runde	77	0	84
Andre runde	86	26	100
Tredje runde	90	77	100
Fjerde runde	ikke testet	97	ikke testet

15

(2) Sekvensanalyse av EGFR-bindende kloner

Etter hver utvelgelsesrunde ble scFv-innføyelser fra EGFR-bindende kloner analysert ved hjelp av BstNI-"fingeravtrykk" (Clackson et al., Nature 1991, 352:624). Det ble
 20 klart at det var en anrikning med hensyn på visse fordøyelsesmønstre. Kloner med forskjellige BstNI-"fingeravtrykk" ble valgt fra den andre og den tredje runden med utvelgelse av lymfeknutebiblioteket og fra den tredje og fjerde runde av
 25 miltbiblioteket for DNA-sekvensering av V_H -ene og V_L -ene. Kloner fra senere utvelgelsesrunder ble analysert ettersom

antistoffer med høyere affinitet var forventet å være i de senere rundene (Clackson et al., Nature 1991, 352:624).

Seksten kloner fra lymfeknutebiblioteket ble sekvensert, og seks forskjellige scFv-er ble erholdt (figur 1). Fem av disse var paringer av unike V_H-er og V_K-er. Den sjette var en variasjon av et tidligere fremkommet V_H med seks aminosyreendringer, hvorav fem var i rammeområdet (FR) 1. To av disse endringene kan tilskrives brukes av den degenererte VH1BACKSFI-primer (Hoogenboom et al., Nucl. Acids Res. 1991, 19:4133). De øvrige kan være et resultat av PCR-feil. V_H-ene ble klassifisert i to undergrupper, V_H2b og V_H3d, mens V_K-ene falt innenfor fire undergrupper, V_K3, V_K4, V_K5 og V_K6 (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5. utg., U.S. Dept. of Health and Human Services, Bethesda 1991). Ti individuelle kloner fra miltbiblioteket ble sekvensert, og fire forskjellige scFv-er ble funnet. Tre av disse var paringer av unike V_H-er og V_K-er, mens den fjerde var lik en av de tidligere paringene med bare to aminosyreforskjeller i V_H, hvorav én inntreide i komplementaritetensbestemmende område (CDR) 2, og to aminosyreforskjeller i V_K. Klassifisering i undergrupper avslørte V_H-er fra undergruppene V_H2a, V_H2c og V_H3d, og V_K-er fra undergruppene V_K3 og V_K4. Sammenligning av scFv-ene erholdt fra lymfeknute- og miltbibliotekene, avslørte bare én scFv som var felles for begge bibliotekene, scFv L3 10A/scFv S4 10H (figur 1). Denne klonen syntes å bindes sterkt til EGFR når den ble testet ved hjelp av ELISA. Selv om man var nøye med å fjerne enhver kryssforurensning mellom biblioteker, er det vanskelig å utelukke mindre forurensning med en sterktbindende EGFR-klon. Når man tar i betraktning den innavlede natur til Balb/c-mus, er det imidlertid mulig at den samme scFv oppsto uavhengig fra to forskjellige biblioteker.

(3) Analyse av affiniteten og spesifisiteten ved binding til EGFR

Basert på god binding til antigen og diversitet i DNA-sekvenser, ble flere scFv-er avledet fra lymfeknute- og miltbibliotekene, valgt for videre analyse. Disse scFv-er ble analysert ved hjelp av ELISA med hensyn på binding til rensset

EGFR, binding til irrelevante antigener og binding til tumor-cellelinjer som uttrykker eller ikke uttrykker EGFR. Som en positiv kontroll ble scFv-er fremstilt fra muse-425-Mab (P1). Som negative kontroller ble scFv-er fremstilt fra fagantistof-fer isolert fra lymfeknute- og miltbibliotekene før utvelgelse (henholdsvis L1 og S1). Konsentrasjonen av scFv-er ble bestemt ved å sammenligne fortynninger av scFv-ene som skulle testes, med fortynninger av et rensset scFv med kjent konsentrasjon i en Western-blot.

10 scFv-ene ble testet ved hjelp av ELISA med hensyn på binding til rensset EGFR og resultatene plottet (figur 2). Det var mulig å rangere scFv-ene med hensyn til deres binding til EGFR. Disse rangeringene var reproducerbare mellom forsøkene. scFv-ene som ble bundet sterkest til EGFR, var L2 1C og L3 10A fra lymfeknutebiblioteket og S4 10H fra miltbiblioteket. Som tidligere beskrevet, har scFv-er L3 10A og S4 10H de samme DNA-sekvensene. Et scFv (S4 5A) som var svært likt scFv S4 10H, med to aminosyreendringer i V_H og to i V_K , ga hele tiden en lavere rangering enn S4 10H. I motsetning til dette syntes ikke forskjellene i sekvens som ble observert mellom L2 12B og L3 11D, å ha en uttalt effekt på bindingen. Av de isolerte scFv-er syntes bare to, L2 8C og L2 11C, å bindes mindre godt enn scFv 425.

25 scFv-ene ble testet ved hjelp av ELISA med hensyn på binding til plast og til et panel av ubeslektede proteiner (ovalbumin, hønseegglysozym, cytokrom c, glyseraldehyd-3-fosfat-dehydrogenase, CBA-albumin og BSA). Ingen av scFv-ene ga et signal over bakgrunnssignalet.

30 scFv-ene ble testet ved hjelp av ELISA med hensyn på binding til tre tumorcellelinjer. Cellelinjene A431 og MDA MB 468 er EGFR-bærende tumorceller isolert fra henholdsvis vulva og bryst. Cellelinje SK-MEL-23 er en gangliosidbærende melanomcellelinje og ble tatt med som en negativ kontroll. Av de ti testede scFv-er bandt bare fire seg til både rensset EGFR og EGFR-bærende tumorceller (L2 12B, L3 11D, L2 11C og S4 2D, figurene 5-8). Ingen binding til SK-MEL-23-celler ble påvist. Det er flere mulige forklaringer på dette overraskende resultat. Ett kan være at EGFR som ble brukt for immunisering, ut-

velgelse og ELISA, var utskilt EGFR-beslektet protein (Weber et al., Science 1984, 224:294). Dette proteinet har ytterligere 17 aminosyrer i C-enden (Günther et al., J. Biol. Chem. 1990, 265:22082). scFv-ene ble testet ved hjelp av ELISA med
 5 hensyn på binding til dette 17 aminosyrers peptid, og ingen binding ble observert. Det er mulig at det utskilte, EGFR-beslektede protein og EGFR på tumorcelleoverflaten har forskjeller i konformasjon eller glykosylering.

For ytterligere å undersøke binding til tumorceller
 10 ble tre scFv-er (L2 11A, L3 11D og S4 2D) rensert og analysert med hensyn på binding til A431-tumorceller ved hjelp av flytcytometri. 425 scFv ble brukt som en positiv kontroll. Av de tre testede scFv-er ble bare L3 11D og S4 2D bundet til A431-celler. Disse to scFv-er hadde like bindingsprofiler med scFv
 15 425.

Rensede scFv-er fremstilt fra to av isolatene som ble bundet til både EGFR og EGFR-bærende tumorceller (L3 11D og S4 2D), ble testet i konkurransebindingsanalyser med muse-425-MAb. Mens rensert scFv 425 var i stand til å inhibere muse-425-
 20 MAb fra binding til EGFR over et bestemt konsentrasjonsområde, inhiberte ikke scFv-er L3 11D og S4 2D muse-425-MAb fra binding til EGFR ved disse konsentrasjonene. Disse to scFv-er syntes å gjenkjenne en epitop på EGFR som er forskjellig fra den som gjenkjennes av muse-425-MAb.

25

(4) Kimære, hele antistoffer avledet fra scFv-er

To scFv-er (L3 11D og S4 2D) ble valgt ut for omdannelse til hele antistoffmolekyler. DNA-er som koder for muse- V_H -ene og $-V_K$ -ene, ble klonet inn i intermediære vektorer
 30 inneholdende DNA-sekvenser som koder for immunoglobulinledersekvenser og spleisedonorsignaler (fig. 3). Plasseringen av kloningssetene i den V_H -intermediære vektor betydde at den første resten i V_H ble endret fra asparaginsyre til glutaminsyre. Fra de intermediære vektorer ble DNA-fragmenter inneholdende V_H -ene og V_K -ene, nå knyttet til leder- og spleisedonor-
 35 sekvenser, klonet inn i pattedyrcelleekspresjonsvektorer inneholdende DNA-er som koder for enten humant gamma-1 konstant område eller humant kappa konstant område (Maeda et al., Hum.

Antibod. Hybridomas 1991, 2:124). For hvert kimært antistoff ble tungkjede- og lettkjedeekspresjonsvektorene samtransfektet inn i COS-celler. Som en positiv kontroll ble celler også samtransfektet med tung- og lettkjedeekspresjonsvektorer som koder for kimært 425-antistoff (Kettleborough et al., Protein Eng. 1991, 4:773). Medium ble samlet opp fra cellene og analysert ved hjelp av ELISA for å bestemme konsentrasjonen av antistoff som er til stede, og evnen til antistoffet når det gjelder å bindes til EGFR (fig. 4). Når den antistoffkonsentrasjon som er påkrevet for å oppnå halvparten av maksimal binding til antigen ble sammenlignet, bandt kimært S4 2D-antistoff til EGFR like godt som kimært 425-antistoff. Kimært L3 11D-antistoff bandt seg imidlertid til EGFR omtrent fire ganger mindre godt enn kimært 425-antistoff. Affiniteten til kimært 425-antistoff (Kettleborough et al., Protein Eng. 1991, 4:773) er blitt bestemt ved hjelp av konkurransebindingsanalyse til å være $1,9 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Disse resultatene var overraskende ettersom tidligere data som analyserte scFv-ene, hadde indikert at scFv-er S4 2D og L3 11D begge bandt seg bedre til EGFR enn scFv 425 (fig. 2). Protein A-rensede prøver av kimære L3 11D- og S4 2D-antistoffer ble analysert ved hjelp av SDS-PAGE under reduserende og ikke-reduserende betingelser. Kimære L3 11D og S4 2D-antistoffer ble også testet ved hjelp av flytcyometri med hensyn på binding til A431- og SK-MEL-23-celler. Begge kimære antistoffer bandt seg godt til de EGFR-uttrykkende A431-celler og bandt seg ikke til de EGFR-negative SK-MEL-23-celler.

(5) Terapeutisk og diagnostisk anvendelse

Antistofffragmentene og de hele antistoffene ifølge oppfinnelsen kan administreres til menneskepasienter for terapi. Det er derfor et formål ved oppfinnelsen å tilveiebringe et farmasøytisk preparat som omfatter som aktiv bestanddel minst ett antistoff eller et antistofffragment som definert ovenfor og i kravene, sammen med én eller flere farmasøytisk akseptable bærere, eksipienser eller fortynningsmidler for det.

Vanligvis vil antistoffet ifølge denne oppfinnelsen

bli injisert intravenøst eller parenteralt. Generelt er doseringsområdene for administreringen av antistofffragmentene tilstrekkelig store til å gi den ønskede tumorundertrykkende og tumorlyserende effekt. Doseringen vil avhenge av alder, tilstand, kjønn og omfang av sykdommen hos pasienten og kan variere fra 0,1 mg/kg til 200 mg/kg, fortrinnsvis fra 0,1 mg/kg til 100 mg/kg/dose i én eller flere doser administrert daglig, i én eller flere dager.

Preparater for parenteral administrering omfatter sterile, vandige eller ikke-vandige oppløsninger, suspensjoner og emulsjoner. Eksempler på ikke-vandige oppløsningsmidler er propylenglykol, polyetylglykol, vegetabiliske oljer, slik som olivenoljer, og injiserbare, organiske estere, slik som etyl-oleat, og andre oppløsningsmidler som er kjent innenfor teknikken, og som er egnet for disse formålene. Antistoffene ifølge denne oppfinnelsen, kan anvendes i et preparat som omfatter en fysiologisk akseptabel bærer. Eksempler på slike egnede bærere er saltoppløsning, PBS, Ringers oppløsning eller laktert Ringers oppløsning. Preserveringsmidler og andre additiver, slik som antibiotika, antioksidanter og chelateringsmidler, kan også være til stede i de farmasøytiske preparatene.

Antistoffet (fragmentet) kan også konjugeres i henhold til kjente metoder til cytokiner, slik som IL-2, for å understøtte deres cytotoxicitet.

De farmasøytiske preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse er egnet for behandlingen av alle slags tumorer, inkludert melanomer, gliomer og karsinomer, samt tumorer i blodomløpet og faste tumorer.

For diagnostiske formål kan antistoffet konjugeres f.eks. til et radioopakt fargestoff eller kan merkes radioaktivt. En foretrukket merkingsmetode er jodogenmetoden. Fortrinnsvis vil antistoffet bli administrert som $F(ab')_2$ - eller scFv-fragmenter for diagnostiske formål. Dette gir utmerkede resultater slik at fratrekking av bakgrunnsverdier er unødvendig.

Eksempel 1:A431-vesikler

Det ble erholdt preparater av avgitt membranvesikkel som tidligere beskrevet av (Cohen et al., J. Biol. Chem. 1982, 257:1523; Yeaton et al., J. Biol. Chem. 1983, 258:9254) med
5 noen modifikasjoner. Kolber med sammenflytning inneholdende A431-celler, ble vasket med PBS inneholdende kalsium og magnesium. Hypoton PBS ble tilsatt, og kolbene ble ristet i 15 minutter. Celler ble så vasket med blæredannelsesbuffer (100 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, 5 mM KCl, 0,5 mM MgSO₂, pH 8,5).
10 Blæredannelsesbuffer ble tilsatt, og kolbene ble holdt i ristning ved romtemperatur og ved 37°C. Så ble buffer dekantert gjennom metallsikt over i 50 ml rør i is og sentrifugert i 5 minutter ved 150 x g ved 4°C. Pelleten ble kastet, og supernatanten ble ultrasentrifugert ved 39 000 rpm i 90 minutter.
15 Sluttpelletene ble på nytt oppslemmet i 10 mM HEPES-buffer (pH 7,4). For å analysere EGFR fra vesikler ble prøver utfelt med 9 volumdeler etanol, på nytt oppslemmet med 0,08 M Tris, pH 6,8, og så ble SDS-PAGE utført med MAb 425 som standard.

Proteininnholdet i preparatene ble kvantifisert ved
20 hjelp av en modifisert Coomassie Plus-metode under anvendelse av BSA som en standard og avlest ved 595 nm. For å analysere EGFR fra vesikler ble prøver utfelt med 9 volumdeler etanol (over natten ved 4°C). Pelleten ble på nytt oppslemmet med Tris (0,08 M, pH 6,8), og så ble det kjørt en SDS-PAGE (5%
25 stablegel, 1 time, 35 mA, 10% løpegel, 2,5 timer, 40 mA). Prøver og standard var in duplo. Én av dem ble farget med Coomassie Blue, og den andre ble blottet over på nitrocelluloseark (12 V, 16 timer ved 4°C) og behandlet med muse-mAb-425 (anti-EGFR) og anti-muse-IgG-antistoff konjugert til alkalisk
30 fosfatase.

Tre medier ble brukt i immuniseringene *in vitro*. Medium-1 (M1), medium-2 (M2) og blandet thymocyttdyrkningsmedium (MTC). M1 besto av HL1 (Ventrex Laboratories, USA) supplert med 50 mM 2-merkaptoetanol og 2 mM L-glutamin (Gibco).
35 M2 besto av HL1 supplert med 50 mM 2-merkaptoetanol, 40 U/ml IL-2 (Genzyme), 20 mg/ml adjuvanspeptid (Sigma), 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin (Gibco), 100 mg/ml streptomycin (Gibco). 4% eller 20% FCS (Biological Industries) ble tilsatt

til M2. MTC ble fremstilt som beskrevet av Vaux (1). I korte trekk ble enkeltcellesuspensjoner av thymuser fra 3 uker gamle Balb/c- og C57/BL-1-mus fremstilt ved å presse thymuskjertlene gjennom en steril 50 mesh sikt. Cellesuspensjonen ble samlet opp, vasket to ganger i HBSS, og antallet levedyktige celler ble bestemt ved hjelp av trypanblåttutelukking. Thymocytter ble så dyrket ved en tetthet på $2,5 \times 10^6$ thymocytter av hver stamme pr. ml i HL1-medium inneholdende 4% FCS, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin og 100 mg/ml streptomycin. Etter 48 timer ble supernatanten utvunnet, filtrert gjennom et 0,22 mm filter og lagret ved -70°C .

En suspensjon av splenocytter fra ikke-immuniserte, 8 uker gamle BALB/c-mus ble erholdt som beskrevet for thymocytter. Levedyktighet ble bestemt ved hjelp av trypanblåttutelukking.

Eksempel 2: Immunisering in vitro og screening

Tre medier ble brukt i immuniseringene in vitro. Medium-1 (M1), medium-2 (M2) og blandet thymocyttdyrkningsmedium (MTC). M1 besto av HL1 (Ventrex Laboratories, USA) supplert med 50 mM 2-merkaptoetanol og 2 mM L-glutamin (Gibco). M2 besto av HL1 supplert med 50 mM 2-merkaptoetanol, 40 U/ml IL-2 (Genzyme), 20 mg/ml adjuvanspeptid (Sigma), 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin (Gibco), 100 mg/ml streptomycin (Gibco). 4% eller 20% FCS (Biological Industries) ble tilsatt til M2. MTC ble fremstilt som beskrevet av Vaux (1). I korte trekk ble enkeltcellesuspensjoner av thymuser av 3 uker gamle Balb/c- og C57/BL-1-mus fremstilt ved å presse thymuskjertlene gjennom en steril 50-mesh sikt. Cellesuspensjonen ble samlet opp, vasket to ganger i HBSS, og antallet levedyktige celler ble bestemt ved hjelp av trypanblåttutelukking. Thymocytter ble så dyrket ved en tetthet på $2,5 \times 10^6$ thymocytter for hver stamme pr. ml i HL1-medium inneholdende 4% FCS, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin og 100 mg/ml streptomycin. Etter 48 timer ble supernatanten utvunnet, filtrert gjennom et 0,22 mm filter og lagret ved -70°C .

En suspensjon av splenocytter fra ikke-immuniserte, 8 uker gamle BALB/c-mus ble erholdt som beskrevet for thymo-

cytter. Levedyktighet ble bestemt ved hjelp av trypanblåttutelukking.

Enkeltcellesuspensjoner fra thymuser av 3 uker gamle Balb/c- og C57/BL-1-mus ble erholdt ved å presse thymuskjertlene gjennom en steril 50 mesh sikt. Cellesuspensjonen ble samlet opp, vasket med HBSS, og antallet levedyktige celler ble bestemt ved hjelp av trypanblåttutelukking. Thymocytter ble så dyrket ved en tetthet på $2,5 \times 10^6$ thymocytter for hver stamme pr. ml i HL1-medium inneholdende 4% FCS, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin og 100 µg/ml streptomycin. Etter 48 timer ble supernatanten utvunnet, filtrert og lagret. En suspensjon av splenocytter fra ikke-immuniserte, 8 uker gamle BALB/c-mus ble erholdt som beskrevet for thymocytter. Levedyktighet ble bestemt ved hjelp av trypanblåttutelukking.

Immuniseringer *in vitro* ble utført i 6-brønners plater (Costar). Brønner inneholdende 10^7 splenocytter i 3,5 ml M1-medium (bestående av HL-1-medium, Ventrex Laboratories, USA, supplert med 50 µM 2-merkaptoetanol og 2 mM L-glutamin (Gibco)), ble inkubert (37°C, 5% CO₂) med vesikler bærende EGFR ved den ønskede konsentrasjon. Vesikler fra celler som ikke uttrykker EGFR eller PBS, ble tilsatt i kontrollbrønner. Etter noen timer ble 3,5 ml M2-medium (bestående av HL1 supplert med 50 µM 2-merkaptoetanol, 40 U/ml IL-2 (Genzyme), 20 µg/ml adjuvanspeptid (Sigma), 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin (Gibco), 100 µg/ml streptomycin (Gibco)) inneholdende 4% eller 10% FCS (Biological Industries) tilsatt til hver brønn. I noen forsøk ble M2 erstattet med MTC-medium (blandet thymocyttdyrkningsmedium (Vaux et al., Nature 1988, 336:36) supplert med adjuvanspeptid (20 µg/ml) og IL-2 (40 U/ml). (Legg merke til at sluttkonsentrasjonen av FCS, IL2 og adjuvanspeptid i kultur er 50% redusert). Celler ble inkubert ved 72, 96, 120 eller 144 timer ved de samme betingelser, og til sist ble cellene testet med hensyn på tilstedeværelsen av spesifikk immunglobulin eller bearbeidet for RNA-isolering.

Screening ble utført med rensede antigener eller A431-fikserte celler. Fremgangsmåten var hovedsakelig som tidligere beskrevet (Carroll et al., Hybridoma 1990, 9:81) med noen modifikasjoner. I korte trekk ble sterile 96-brønners

plater (Nunc, Maxisorb) belagt over natten med rensset EGFR (2,5 µg/ml), GD₃-gangliosid (2 µg/ml) eller RNase (10 µg/ml) i PBS. Når A431-celler ble brukt som antigen, ble celler dyrket i 96-brønners plater inntil sammenflytning og fiksert med 0,1% glutaraldehyd. Lymfocytter immunisert *in vitro*, ble vasket og på nytt oppslemmet i HLI-medium supplert med 2% FCS og 2 mM L-glutamin ved 5x10⁵ celler/ml, og 1x10⁵ celler ble tilsatt til hver brønn, og det ble inkubert (37°C, 5% CO₂) i 48 timer. 16 duplikater av hver gruppe ble gjort. Lymfocytter ble så fjernet ved å vaske 5 ganger i PBS inneholdende 0,1% "Tween-20". Det ble påvist spesifikke immunglobuliner ved å bruke peroksidasermerket kanin-anti-muse-immunglobulin (Dako) (1 time, 37°C). 2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre)diammoniumsalt (ABTS) (Sigma) i sitratfosfatbuffer (0,55 mg/ml) ble brukt som substrat.

Eksempel 3: Bibliotekskonstruksjon

Tre biblioteker ble konstruert fra RNA fremstilt fra milten til en mus immunisert intraperitonealt med A431-celler (Murthy et al., Arch. Biochem. Biophys. 1987, 252:549) fra knehaselymfeknuten til en mus immunisert i fotputen med rensset EGFR, og fra museceller immunisert *in vitro* med A431-vesikler. Førstetråds-cDNA ble syntetisert. V_H- og V_K-genene ble PCR-amplifisert og satt sammen (Clackson et al., Nature 1991, 352:624). Ved å bruke PCR ble NotI- og SfiI-restriksjonssteder tilføyet, og scFv-ene ble klonet inn i fagmidvektoren pHEN1 (Hoogenboom et al., Nucl. Acids Res. 1991, 19:4133). Ligeringsblandningene ble elektroporert inn i *E. coli*-celler og de resulterende kolonier skrapet inn i medium for å frembringe biblioteksforråd (Marks et al., J. Mol. Biol. 1991, 222:581).

Eksempel 4: Biblioteksscreening

Fagantistoffer ble hentet ut fra bibliotekene ved å bruke M13K07-hjelperfag (Promega, Madison, WI) (Marks et al., J. Mol. Biol. 1991, 222:581). Immunorør (Nunc, Life Sciences, Paisley, Storbritannia) ble belagt med 4 ml 2,5 µg/ml EGFR i PBS over natten. Etter tre vaskinger med PBS ble rørene inkubert ved 37°C i minst 1 time i PBS inneholdende 2% melkepulver

(PBSM). Fagen (10^{12} til 10^{13}) ble på nytt oppslemmet i 4 ml PBSM og inkubert i det EGFR-belagte rør i 1 time ved romtemperatur. Røret ble vasket 20 ganger med PBS, 0,1% "Tween" og 20 ganger med PBS. Bundet fag ble eluert etter en
5 10-minutters inkubasjon i 1 ml 0,1 M trietylamin med ende-over-ende-blanding. Den eluerte fag ble nøytralisert ved tilsetning av 0,5 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5, og brukt til å infisere *E. coli* TGI-celler i logfase. Infiserte celler ble
10 platet ut og individuelle kolonier plukket ut for småskalainduksjon av scFv-er. De gjenværende kolonier ble skrapet ut i medium og en aliquot brukt til å fremstille fag for den neste runde med screening.

Eksempel 5: Produksjon og analyse av scFv-er

15 Oppløselige scFv-er ble produsert i *E. coli* HB2151 som tidligere beskrevet (f.eks. Kettleborough et al., I. c.). scFv-konsentrasjonene i bakteriesupernatantene ble beregnet ved å bruke et rensed scFv-preparat med kjent konsentrasjon som en standard. Supernatanter ble filtrert og natriumazid
20 tilsatt inntil 0,1%. Seriefortynninger av supernatantene og av standarden ble flekket over på "Immobilon-PVDF"-filtre (Millipore, Watford, Storbritannia) under anvendelse av en 96-brønners "manifold". Filtrene ble behandlet som en Western-blot (Towbin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1979,
25 76:4350). scFv-ene ble påvist ved å bruke et antistoff (9E10) rettet mot den C-terminale ende (Munro og Pelham, Cell 1986, 46:291) etterfulgt av et peroksidasekonjugert geite-anti-muse-IgG- og -IgM-antistoff (Jackson ImmunoResearch Lab Inc., West Grove, PA). Reaksjonsblandingen ble fremkalt ved å bruke ECL-systemet (Amersham, Aylesbury, UK). Foropplyste autoradio-
30 grafier ble skannet ved å bruke et densitometer. En standardkurve ble fremstilt og brukt til å beregne scFv-konsentrasjonene i supernatantene.

Antigenbindende ELISA-er ble utført med EGFR-belagte
35 plater (2,5 µg/ml). Supernatanter inneholdende scFv-er, ble fortynnet i PBSM og tilsatt til platene. Bundne scFv-er ble påvist ved å bruke 9E10-antistoff som beskrevet ovenfor. Supernatanter ble også testet med hensyn på binding til et

panel av ubeslektede proteiner og plast. ELISA-plater ble belagt over natten ved 100 µg/ml med ovalbumin, hønseegglysozym, cytokrom c, glyseraldehyd 3-fosfatdehydrogenase, murint albumin (CBA-stamme) og BSA. Ufortynnede supernatanter inneholdende 2% melkepulver, ble tilsatt in duplo til de belagte plater og bundne scFv-er påvist som beskrevet ovenfor.

Cellebindende ELISA-er ble utført ved å bruke tumor-cellelinjer, A431 (ATCC CRL 1555), MDA MB 468 (ATCC HTB 132) og SK-MEL-23 (negativ kontroll). Celler ble dyrket inntil sammenflytning i poly-D-lysin-behandlede 96-brønners vevskulturbrett (Nunc). Celler ble vasket med DMEM og blokkert ved 37°C i 2 timer med PBS inneholdende 2,5% BSA. Etter aspirasjon ble supernatanter tilsatt til hver brønn sammen med et likt volum 2xYT-medium inneholdende 4% melkepulver og inkubert ved 4°C i 1 time. Bundne scFv-er ble påvist som beskrevet ovenfor.

En konkurransebasert ELISA ble utført ved hjelp av forinkubering av EGFR-belagte ELISA-plater med 50 µl rensset scFv (100 µg/ml) i 10 minutter. Muse-MAb 425 (50 µl) ble så tilsatt, hvorved man fikk konsentrasjoner på 3,13 til 200 ng/ml. Etter inkubasjon og vasking ble bundet muse-MAb 425 påvist ved å bruke peroksidasekonjugert geite-anti-muse-IgG- og IgM-antistoff.

Eksempel 6: DNA-analyse

For BstNI-"fingeravtrykk" ble scFv-innføyersene fra individuelle kloner amplifisert ved hjelp av PCR og produktene fordøyd med BstNI (Clackson et al., Nature 1991, 352:624). DNA ble sekvensert ved å bruke et "Sequenase"-sett (United States Biochemical, Cleveland, OH).

Eksempel 7: Rensing av scFv-er

Bakteriesupernatanter ble klaret ved sentrifugering og filtrering gjennom 0,2 µm filtere før påfylling på en 1 ml kolonne med rensset EGFR (5 mg) koblet til cyanbromidaktivert "Sephrose 4B" (Pharmacia, Uppsala, Sverige). Kolonnen ble vasket med 30 ml PBS etterfulgt av 5 ml 0,2 M glysin, pH 5,0. scFv-ene ble eluert med 0,2 M glysin/HCl, pH 2,8. Eluatet ble nøytralisert med 10xPBS. Proteininneholdende fraksjoner ble

slått sammen og bufferen skiftet ved ultrafiltrering (Amicon, Stonehouse, Storbritannia) til PBS inneholdende 1% BSA og 0,05% natriumazid.

5 Eksempel 8: FACS-analyse av rensede scFv-er

A431-celler ble trypsinert og inkubert i DMEM inneholdende 10% FCS. Cellene ble vasket to ganger med kald DMEM og filtrert gjennom en 45 µm sikt. Celler (10^6) ble inkubert på is i 30 minutter i 50 µl PBS, 1% BSA, med rensede
 10 scFv-er. Etter to vaskinger med kald PBS ble bundne scFv-er påvist ved å bruke 50 µl FITC-konjugert 9E10-antistoff (100 µg/ml). Etter 30 minutter på is ble cellene vasket én gang med PBS, fiksert i PBS inneholdende 1% formaldehyd og analysert ved å bruke en "FACSCAN" (Becton-Dickinson, Cowley,
 15 Storbritannia).

Eksempel 9: Konstruksjon, analyse og ekspresjon av hele, kimære antistoffer

Ved å bruke PstI- og BstEII-seter ble DNA-er som
 20 koder for V_H -ene fra de utvalgte scFv-er, underklonet inn i en intermediær V_H -vektor inneholdende en eukaryot ledersekvens avledet fra humant antistoff HG3 CL (Rechavi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1983, 80:855) og et spleisedonorsete (figur 3). DNA-ene som koder for V_K -ene, ble tilpasset for
 25 innføyelse i en intermediær V_K -vektor under anvendelse av PCR-primere for å inkorporere XhoI- og SstI-seter i 5'- og 3'-endene
 (VkFor: 5'-CCG TTT CAG **CTC GAG** CTT GGT CCC-3',
 VkBack: 5'-GAC ATT **GAG CTC** ACC CAG TCT CCA-3').
 30 SstI-XhoI-fragmentene ble klonet inn i den intermediære V_K -vektor inneholdende en eukaryot ledersekvens avledet fra om-dannet, human CAMPATH-1 lett kjede (Riechmann et al., Nature 1988, 332:21) og et spleisedonorsete (fig. 3). De DNA-er som koder for de variable områdene, pluss eukaryote, flankerende
 35 områder ble klonet som HindIII-BamHI-fragmenter i pattedyr cell-lekspresjonsvektorer som inneholder genom-DNA-er som koder for humant gamma-1 konstant område eller humant kappa konstant område (Maeda et al., Hum. Antibod. Hybridomas 1991, 2:124).

Tung- og lettkjedeekspresjonsvektorene ble elektroporert inn i COS-celler. Etter 72 timer ble medium samlet opp og de kimære anti-EGFR-antistoffer analysert ved hjelp av ELISA (Kettleborough et al., Protein Eng. 1991, 4:773).

5

Eksempel 10:Fremstilling av scFv-er avledet fra celler immunisert *in vitro*

Fremgangsmåtene beskrevet nedenunder, er mindre modifikasjoner av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor. Immunisering, bibliotekskonstruksjon og screening er angitt i eksemplene 1-4. De følgende trinn er beskrevet nærmere nedenunder:

Etter screening av det primære bibliotek og klonene avledet fra de tre rundene med "panning", ble det valgt ut noen enkeltkolonier med ampicillinresistens. Fagmid-DNA ble fremstilt ved hjelp av alkalisk lyse og brukt til å transfektere *E. coli* HB2151, en ikke-suppressorstamme, ved hjelp av varmesjokk. Kolonier ble inokulert i 2xTY-Amp-Glu og dyrket over natten ved 30°C. En 5 ml aliquot ble brukt til å inokulere 50 ml 2xTY-dyrkningsvæske inneholdende 100 mg ampicillin/ml og 0,1% glukose, og det ble dyrket med risting ved 30°C i 1 time (inntil logfase). Celler ble innhøstet, og ekspresjon av oppløselig scFv ble induisert ved tilsetning av isopropyl- β -D-tiogalaktopyranosid (IPTG) inntil en sluttkonsentrasjon på 1 mM (De Bellis, D. og Schwartz, I.; Nucleic Acids Res.; 1990, 18:1311). Kulturer ble dyrket over natten ved 30°C med risting. Supernatanter inneholdende scFv, ble tatt ut, klaret ved sentrifugering og filtrering gjennom 0,22 μ m filtre og testet. Bakteriesupernatanter ble testet med hensyn på binding til EGFR ved hjelp av ELISA, som beskrevet (Kettleborough et al., EP 94104160 og Eur. J. Immunol. 1994, 24:952). Spesifisiteten til utvalgte scFv-fragmenter ble sjekket ved hjelp av ELISA under anvendelse av plater belagt med forskjellige proteiner som var beslektet og ikke-beslektet med EGFR, samt andre antigener og plast. Antigenene som ble brukt, var: RNase, BSA, OVA, GD₃-gangliosid, vitronektinreseptor (VNR), blodplateglykoprotein IIbIIIa (GPIIbIIIa) og disialyl-lakto-N-tetraose (DSLNT). Belegning ble gjort over natten ved den optimale konsentrasjon for hvert antigen. Belagte ELISA-

plater ble blokkert i 1 time ved 37°C med 1,5% skummet melk i PBS (vekt/volum). Etter vasking ble 100 ml scFv-supernatanter tilsatt til mikrotiterbrønnene, og det ble inkubert i 2 timer ved 37°C. Bundet scFv ble påvist ved å bruke anti-c-myc-antistoffet 9E10 (brukt dyrkningsmedium fra Myc 1-9E10.2-hybrid) og et alkalisk fosfatasekonjugert kanin-anti-muse-antistoff (Dako).

Tre EGFR-bærende tumorcellelinjer, A431, MDA MB 231 humant brystadenokarsinom (ATCC, HTB 26) og HT29 humant tykktarmsadenokarsinom (ATCC, HTB 38), og en ikke-uttrykkende EGFR-cellelinje, WM 164, ble brukt til å teste evnen til scFv når det gjelder å binde til EGFR på celler ved hjelp av FACS-analyse og immunfluorescens med ufikserte celler. For den indirekte immunfluorescensanalyse ble celler platet ut på Terasaki-plater (2×10^4 celler/brønn) og dyrket i 24 timer. Celler ble så inkubert med 20 ml urensset bakteriesupernatant inneholdende scFv-fragmentene i 90 minutter ved romtemperatur. Inkubasjoner med primært antistoff (anti-c-myc) og sekundært antistoff ble utført i 60 minutter ved romtemperatur. Det sekundære antistoff, FICT-konjugert kanin-anti-muse-antistoff (Dako) ble fortynnet i forholdet 1:20.

For FACS-analyse ble 5×10^5 celler vasket med PBS med 1% BSA og 0,1% natriumazid (PBS-BSA) og inkubert ved 4°C i 20 minutter med 50 ml urensset bakteriesupernatant. Etter to vaskinger med kald PBS-BSA ble bundet scFv påvist ved å bruke anti-c-myc-antistoff og FITC-konjugert geite-anti-muse-antistoff (Becton-Dickinson) fortynnet i forholdet 1:25 i PBS-BSA. Propidiumjodid (PI) ble tilsatt ved en sluttkonsentrasjon på 5 mg/ml. Flytcytometrianalyse ble utført i en EPICS Profile II utstyrt med en luftavkjølt argonlaser. 488 nm-linjen (15 mV) ble brukt for eksitasjonen. Et 530 nm båndpasseringsfilter ble brukt til å samle opp FITC-emisjon, og et 625 nm båndpasseringsfilter ble brukt til å samle opp PI-emisjon. Levende celler ble valgt ut ved å innstille en punktmatrixe på fremover- og sidespredning, og ved utelukkelse av PI-fargede celler.

Diversiteten til de primære og utvalgte biblioteker ble bestemt ved hjelp av PCR-amplifikasjon av klonede frag-

menter (Güssow, D., Clackson, T.; *Nucleic Acids Res.* 1989, 17:4000) og analyse av BstNI-fordøyelsesmønsteret (8). Noen kloner ble sekvensert ved å bruke et "Sequenase"-sett (USB) ved hjelp av dideooksykjedetermineringsmetoden (Sanger, F. et al.; *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 1977, 74:5463).

Urensede bakteriesupernatanter (10 ml) ble underkastet SDS-PAGE under anvendelse av en 12,5% gel. Western-blotting ble utført hovedsakelig som beskrevet av Towbin (Towbin et al., *J. Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 1979, 76:4350). Proteiner ble overført ved hjelp av elektroblotting til "Immobilon-P" (Millipore) eller nitrocellulose (Bio-Rad). Blottingen ble blokkert med PBS inneholdende 2% skummet melk (vekt/volum). scFv-fragmenter ble påvist ved å bruke anti-c-myc-antistoff (9E10), peroksidasekonjugert anti-muse-antistoff (Jackson) og et forsterket kjemiluminescenssystem (ECL, Amersham).

Den kvantitative analyse av vesiklene fra avgitt membran avslørte en total proteinkonsentrasjon på 2,5 mg/ml, hvorav bare 10-14% tilsvarte EGFR (Sato et al.; *J. Natl. Cancer Inst.* 1989, 21:1601; Yeaton, R. et al., *J. Biol. Chem.*, 1983, 258:9254), 250-350 ng/ml. Elektroforetisk analyse under anvendelse av PAGE-SDS etterfulgt av Coomassie-blåfarging, viste at vesiklene inneholdt en ganske kompleks blanding av proteiner. Ingen proteinnedbrytning ble påvist. Western-blot-analyse avslørte at fullstendige molekyler av EGF-reseptor var til stede i membranvesikkelpreparatet under våre forsøksbetingelser.

For å bestemme kravene til FCS og lymfokiner ble MTC og M2 inneholdende 20% eller 4% FCS, sammenlignet. Vesikler som bar EGFR og PBS, ble brukt som henholdsvis antigen og kontroll. Splenocytter ble inkubert i 6-brønners plater med eller uten antigen i 3 timer i M1 (serumfritt). MTC eller M2 ble så tilsatt, og screening ble utført etter 72, 96, 120 eller 144 timer ved å bruke fikserte A431-celler. I alle forsøkene var antallet av levedyktige celler som ble utvunnet, mellom 20 og 40% i overensstemmelse med publiserte resultater (Gavilondo-Cowley, J. et al.; *In Vitro Immunization in Hybridoma Technology*, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam 1988,

s. 131). Den maksimale, spesifikke respons ble oppnådd på dag 4 med MTC; mens M2 ved 4% eller 20% FCS (2% eller 10% slutt-konsentrasjon) forsinket den maksimale respons inntil dag 6 (tabell 2). MTC og 10% FCS utløste imidlertid en ikke-spesifikk respons, sannsynligvis ved hjelp av polyklonal aktivering, som kunne ses når resultatene ble uttrykt som forholdet mellom spesifikk og ikke-spesifikk respons. For videre analyser bestemte vi oss for å bruke M2 supplert med 4% FCS og 6 dagers dyrkning.

10 Tilstedeværelsen av EGFR i overflaten til vesikler forsterket responsen til dette antigenet sterkt. I lignende fremgangsmåter som beskrevet ovenfor, ble vesikler fra uttrykkende og ikke-uttrykkende EGFR-cellelinjer sammenlignet. Lymfocytter ble dyrket med vesikler i M1 i 3 timer. Senere ble M2 15 inneholdende 4% FCS, tilsatt. Etter 6 dager ble lymfocytter fra hver gruppe dyrket i 48 timer i 96-brønners plater belagt med EGFR, fikserte A431-celler, RNase eller GD3. Som forventet, viste resultatene av disse analysene et flerspesifikt responsmønster (tabell 3). Reaktiviteten mot EGFR ble klart 20 økt når det gjelder optisk tetthet når EGFR-uttrykkende vesikler ble brukt som antigen.

Alt i alt tyder disse resultatene på at selv om den var ikke fullt utviklet, var det en målbar, antigenavhengig respons etter immunisering *in vitro* som frembrakte flere blandinger av immuniserte lymfocytter mot EGFR egnet for PCR-kloning av variable områder.

Et bibliotek med $1,1 \times 10^5$ kloner ble erholdt etter kloning av scFv-fragmenter avledet fra immunisering *in vitro* i pHEN1-fagmidet. Dette biblioteket ble frembrakt parallelt med 30 to ytterligere biblioteker tilveiebrakt ved hjelp av immunisering *in vivo*. Konstruksjonen av disse fagbibliotekene er blitt beskrevet tidligere (Kettleborough et al., EP 94104160 og Eur. J. Immunol. 1994, 24:952).

For å velge ut scFv-fragmentene som bindes til EGFR, 35 ble fag vasket ut ved å bruke EGFR-belagte immunorør. Eluert fag ble brukt til å reinfisere en *SupE*-stamme av *E. coli*. Totalt ble det utført tre runder med utvelgelse. I hver runde ble et rør uten antigen testet parallelt for å beregne bak-

grunnsverdien. Ved den første utvasking ble $1,5 \times 10^{10}$ fagpartikler tilført immunorøret, og $6,6 \times 10^4$ ble eluert fra det belagte immunorør; mens bare 200 kolonier ble erholdt fra bakgrunnspopulasjonen. Etter den tredje utvasking ble 1×10^{11} fager tilført, og $5,6 \times 10^{10}$ ble eluert.

For ytterligere å karakterisere scFv-fragmentene valgte vi ut 22 kloner fra fagpopulasjonene før utvelgelse og etter hver runde med utvelgelse.

Diversiteten til biblioteket ble analysert ved hjelp av BstNI-fordøyelsesmønstrene til de klonede fragmenter. Før utvelgelse syntes biblioteket å være ekstremt forskjellig. Fingeravtrykk av bindende kloner avledet etter den første runde med utvelgelse, indikerte tilstedeværelsen av flere grupper med det samme restriksjonsmønster.

Kloner ble valgt ut fra forskjellige runder med utvelgelse basert på deres fordøyelsesmønstre. DNA-sekvensering avslørte tilstedeværelsen av forskjellige sekvenser i de fleste av de utvalgte kloner. Lengden og sammensetningen av komplementaritetsbestemmende områder (CDR-er) til klonene 10D2, 5D3, 10E2, 1B3, 4B3 og 5E2 var forskjellige. Den største variasjon ble observert i CDR3-ene i V_H - og V_L -sekvenser. Klonene 5D3 og 1E3 ble avledet fra den tredje runden av utvelgelse. De bandt seg sterkt til EGFR som analysert ved hjelp av ELISA og flytctyometri, og hadde den samme sekvens.

Oppløselige scFv-fragmenter ble erholdt ved dyrking av ikke-suppressor-*E. coli*-stammen HB 2151 i nærvær av IPTG.

For å verifisere scFv-produksjon ble bakteriemedium fra individuelle kloner analysert ved hjelp av gelelektroforese. Western-blot-analyse avslørte et klart bånd rundt 35 000 kD.

Kloner med bindingsaktiviteter til EGFR ble identifisert ved hjelp av ELISA. For å undersøke kryssreaktiviteten til utvalgte kloner ble det utført ELISA-analyser under anvendelse av forskjellige antigener. Antigenene (EGFR, RNase, BSA, KLH, OVA, GD₃-gangliosid, vitronektinreseptor, blodplateglykoprotein IIbIIIa og disialyl-lakto-N-tetraose) ble belagt i ELISA-plater ved den optimale konsentrasjon (tabell 4). Ingen binding til ikke-EGFR-antigener ble påvist. scFv-ene ble også

testet med hensyn på binding til tre EGFR-bærende tumorcellelinjer (humant epidermoidkarsinom A431, humant brystadenokarsinom MDA MB 231 og humant tykktarmsadenokarsinom HT 29). WM 164, EGFR som ikke uttrykker humant melanom, ble brukt som en negativ kontroll. De som ble bundet til tumorcellelinjer, ble testet ved hjelp av indirekte immunfluorescens under anvendelse av ikke-fikserte celler og kvantifisert ved hjelp av FACS-analyse. Bruken av ufikserte celler sikrer den naturlige konformasjon til membranreseptorene. Positive kloner oppviste en klar fluorescens under anvendelse av A431-celler. Fluorescens med de øvrige EGFR-bærende tumorcellelinjer var svak. Ingen binding til den negative cellelinje ble påvist. Resultatene ble bekreftet ved hjelp av flytcytometri. 17 positive kloner og 3 negative kloner ble analysert med hensyn på binding til A431-, MDA MB 231- og HT 29-celler ved hjelp av flytcytometri. WM 164 ble brukt som den negative cellelinje. 425-scFv (P1-klonen) ble brukt som en positiv kontroll, og kloningsvektoren (HEN) som en negativ kontroll. Resultatene er oppsummert i tabell 5. To kloner, 4B2 og 5E2, var positive med hensyn på binding til EGFR, som analysert ved hjelp av ELISA, men negative med hensyn på binding til EGFR-uttrykkende tumorcellelinjer.

Tabell 2

Effekt av forskjellige medier på immunisering in vitro ^{a)}

		Dag for screening mot A431							
		3. dag		4. dag		5. dag		6. dag	
Ana-lyse	Antigen	O.D. ^{c)}	For- ^{d)} hold	O.D.	For- ^{d)} hold	O.D.	For- ^{d)} hold	O.D.	For- ^{d)} hold
1	Vesikler	0,393	2,11	0,801	3,76	0,784	3,90	0,951	10,3
	PBS	0,186		0,213		0,201		0,092	
2	Vesikler	0,527	2,50	0,852	1,76	0,863	2,75	1,168	3,94
	PBS	0,210		0,482		0,313		0,296	
3	Vesikler	0,763	1,48	1,169	2,01	1,089	2,07	1,115	1,91
	PBS	0,513		0,581		0,525		0,581	

Analyse 1: M1 pluss M2, 4% FCS (slutt-FCS: 2%)

20 Analyse 2: M1 pluss M2, 20% FCS (slutt-FCS: 10%)

Analyse 3: A-medium pluss MTC, 4% FCS (slutt-FCS: 2%)

a) BALB/c-musemiltceller (10^7) ble inkubert i 3,5 ml M1 med vesikler fra A431-celler eller PBS i 3 timer i brønner i 6-brønners plater. Senere ble 3,5 ml MTC eller M2 inneholdende 4% eller 20% FCS, tilsatt, og platene ble inkubert. Etter 3, 4, 5 eller 6 dager ble lymfocytter immunisert in vitro, fjernet fra dyrkningsmedium, vasket i HBSS for å fjerne vesikler og inokulert i 96-brønners plater belagt med fikserte A431-celler og inkubert i 48 timer (se Metoder).

b) Sluttkonsentrasjon av FCS i dyrkningsmedium.

c) O.D. Optisk tetthet avlest ved 405 nm. Den utgjør gjennomsnittet for 16 brønner.

d) Forhold mellom spesifikk respons (vesikler som antigen) og uspesifikk respons (PBS som antigen).

Tabell 3

Responsens flerspesifisitet etter immunisering in vitro ^(a)

		Screening mot			
	Antigen- gruppe	A431-celler	EGFR	GD3	RNase
Analyse 1	EGFR +	0,512 ^(b)	0,326	0,140	0,249
	EGFR -	0,427	0,070	0,123	0,304
Analyse 2	EGFR +	1,430	0,730	0,233	0,670
	EGFR -	0,789	0,195	0,118	0,561

a) Lymfocytter ble immunisert *in vitro* ved å bruke enten EGFR-uttrykkende vesikler (EGFR+) eller ikke-EGFR-uttrykkende vesikler (EGFR-). Etter 6 dagers inkubasjon ble celler fjernet fra kulturen og screenet mot de ovenfor nevnte antigener.

b) Respons er uttrykt som optisk tetthet (405 nm).

Tabell 4
Kryssreaktivitet av utvalgte scFv-fragmenter
mot flere antigener ^(a)

5

ANTIGEN ^(b)	Belegning [mg/ml]	RESULTAT
EGFR	2,5	+
RNase	10	-
BSA	10	-
KLH	10	-
OVA	10	-
GD ₃ -gangliosid	2	-
VNR	1	-
GPIIbIIIa	1	-
DSLNT	5	-

10

15

20

- a) ELISA-analyser ble utført som beskrevet.
 b) Vitronektinreseptor (VNR); blodplateglykoprotein IIbIIIa (GPIIbIIIa); disialyl-lakto-N-tetraose (DSLNT).

25

30

35

Tabell 5

Reaktivitet av scFv-kloner mot EGFR. Sammenligningsresultater mellom en ELISA-metode med rensset, oppløselig antigen og cytometrisk analyse av cellelinjer

5

10

15

20

25

30

35

KLONER	CYTOMETRISK ANALYSE AV TUMORCELLELINJER ^(a)				ELISA
	(gjennomsnitt av vilkårlige fluorescensenheter)(O.D.)				
Positiv	WM164	A431	MDAAMB231	HT29	EGFR
7H1	1,5	112,9	16,4	2,6	1,2
4B2	1,2	5,3	4,2	0,6	2
10D2	1,5	145,3	36,3	4,8	2
12D2	1,8	129,5	29,3	5,7	2
5E2	1,4	2,5	7,1	0,5	1,8
8E2	1,5	134,5	47,7	5,1	1,9
5F2	1,3	146,3	40,6	5,7	1,9
11H2	1,9	152,2	25,3	2	1,9
1B3	0,6	105,1	36,4	5,2	>2
4B3	0,5	78	15,8	2,3	2
3D3	1,2	94,3	25,1	4,8	1,9
5D3	0,5	112	22,2	5,5	>2
4F3	0,4	110,3	32,3	6,2	>2
4G3	0,4	76,5	20,4	2	>2
1E3	0,4	118,3	33,8	5,1	2
3H3	0,6	76,5	33,7	4,2	>2
Negativ					
5F1	2,4	2,3	3,6	1,8	0,2
7G1	1,4	10,2	4	2,8	0,2
1H1	0,5	5	4	0,75	0,2

Tabell 5 (forts.)

Kontroller (b)					
HEN	0,4	4,1	3,7	1	0,2
P1	0,6	85,5	21,3	2,5	1,9

- 5
- 10 a) Tre EGFR-bærende cellelinjer (A431, MDAAMB231 og HT29) og én ikke-uttrykkende cellelinje (WM164) ble brukt til å analysere evnen til scFv når det gjelder å binde seg til tumorcellelinjer ved hjelp av cytometrisk analyse som beskrevet.
- 15 b) Vektor uten fragment (HEN) og scFv-fragment fra 425 mAb (P1) ble brukt som henholdsvis negative og positive kontroller.
- 20
- 25
- 30
- 35

Sekvensliste

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 1:

(i) Sekvenskarakteristika:

- (A) Lengde: 327 basepar
 (B) Type: nukleinsyre
 (C) Tråd: enkel
 (D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: cDNA

(iii) Hypotetisk: ingen

(iv) Antisense: ingen

(v) Fragmenttype: N-terminal

(vi) Opprinnelig kilde:

- (A) Organisme: mus
 (B) Stamme: Balb/c
 (D) Utviklingsmessig stadium: voksen
 (F) Vevstype: lymfeknute

(vii) Direkte kilde:

- (B) Klon: L2 11C (lett kjede)

(ix) Særtrekk:

- (A) Navn/nøkkel: CDS
 (B) Lokalisering: 1..327

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 1:

	GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA GCC TCC CTG GCT GCA TCT GTG GGA	48
25	Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Ala Ser Val Gly	
	1 5 10 15	
	GAA ACT GTC ACC ATC ACA TGT CGA GCA AGT GAG AAC ATT TAC TAT AGT	96
	Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Tyr Ser	
	20 25 30	
	TTA GCA TGG TAT CAG CAG AAG CAA GGG AAA TCT CCT CAG CTC CTG ATC	144
30	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile	
	35 40 45	
	TAT AGT GCA AGC GCC TTG GAA GAT GGT GTC CCA TCG AGG TTC AGT GGC	192
	Tyr Ser Ala Ser Ala Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
	50 55 60	
	AGT GGA TCT GGG ACA CAG TAT TCT TTA AAG ATC AAC AAC ATG CAG CCT	240
	Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Asn Met Gln Pro	
	65 70 75 80	
35	GAA GAT ACC GCT ACT TAC TTC TGT AAA CAG ACT TAT GAC GTT CCG TGG	288
	Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Lys Gln Thr Tyr Asp Val Pro Trp	
	85 90 95	
	ACG TTC GGT GGA GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCG	327
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala	
	100 105	

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 2:

- (i) Sekvenskarakteristika:
 (A) Lengde: 109 aminosyrer
 (B) Type: aminosyre
 (D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: protein

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 2:

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 10 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Tyr Ser
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Ala Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 15 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Asn Met Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Lys Gln Thr Tyr Asp Val Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
 100 105

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 3:

- (i) Sekvenskarakteristika:
 (A) Lengde: 357 basepar
 (B) Type: nukleinsyre
 (C) Tråd: enkel
 (D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: cDNA

(iii) Hypotetisk: ingen

(iv) Antisense: ingen

(v) Fragmenttype: N-terminal

- (vi) Opprinnelig kilde:
 (A) Organisme: mus
 (B) Stamme: Balb/c
 (D) Utviklingsmessig stadium: voksen
 (F) Vevstype: Lymfeknute

(vii) Direkte kilde:
 (B) Klon: L2 11C (tung kjede)

- (ix) Trekk:
 (A) Navn/nøkkel: CDS
 (B) Lokalisering: 1..357

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 3:

	CAG GTG CAA CTG CAG GAG TCA GGG CCT GAG CTG GTG AGG CCT GGG GCT	48
	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala	
	110 115 120 125	
5	TCA GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCA GGC TAT ACC TTC ACT ACC TAC	96
	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr	
	130 135 140	
	TGG ATA CAC TGG ATG AAA CAG AGG CCT GGA CAA GGC CTT CAG TGG ATT	144
	Trp Ile His Trp Met Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile	
	145 150 155	
10	GGC ATG ATT GAT CCT TCC AAT AGT GAA ACT AGG TTA AAT CAG AAT TTC	192
	Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Asn Phe	
	160 165 170	
	AGG GAC AAG GCC ACA TTG AGT GTA GAC AAA TCC TCC AAT AAA GCC TAC	240
	Arg Asp Lys Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ser Asn Lys Ala Tyr	
	175 180 185	
15	ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA ATC TAT TAC TGT	288
	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys	
	190 195 200 205	
	GCA AGA TGG GAC TAC GGT AGT GGC CAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGG	336
	Ala Arg Trp Asp Tyr Gly Ser Gly His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	
	210 215 220	
	ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA	357
	Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
	225	

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 4:

(i) Sekvenskarakteristika:

- (A) Lengde: 119 aminosyrer
- (B) Type: aminosyre
- (D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: protein

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 4:

	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala	
	1 5 10 15	
30	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr	
	20 25 30	
	Trp Ile His Trp Met Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile	
	35 40 45	
	Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Asn Phe	
	50 55 60	
35	Arg Asp Lys Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ser Asn Lys Ala Tyr	
	65 70 75 80	
	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys	
	85 90 95	
	Ala Arg Trp Asp Tyr Gly Ser Gly His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	
	100 105 110	
	Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
	115	

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 5:

(i) Sekvenskarakteristika:

- (A) Lengde: 339 basepar
- (B) Type: nukleinsyre
- (C) Tråd: enkel
- (D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: cDNA

(iii) Hypotetisk: ingen

(iv) Antisense: ingen

(v) Fragmenttype: N-terminal

(vi) Opprinnelig kilde:

- (A) Organisme: mus
- (B) Stamme: Balb/c
- (D) Utviklingsmessig stadium: voksen
- (F) Vevstype: lymfeknute

(vii) Direkte kilde:

- (B) Klon: L2 12B (lett kjede)

(ix) Særtrekk:

- (A) Navn/nøkkel: CDS
- (B) Lokalisering: 1..339

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 5:

	GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG	48
	Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly	
	120 125 130 135	
	CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC AGA GCC AGC GAA AGT GTT GAT AAT TTT	96
25	Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Phe	
	140 145 150	
	GGC ATT AGT TTT ATG AAC TGG TTC CAA CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC	144
	Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro	
	155 160 165	
	AAA CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AAC CAA GGA TCC GGG GTC CCT GCC	192
	Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala	
30	170 175 180	
	AGG TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC AGC CTC AAC ATC CAT	240
	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His	
	185 190 195	
	CCT CTG GAG GAG GAT GAT ACT GCA ATG TAT TTC TGT CAG CAA AGT AAG	288
	Pro Leu Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys	
	200 205 210 215	
35	GAG GTT CCG CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG	336
	Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg	
	220 225 230	
	GCG	339
	Ala	

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 6:

(i) Sekvenskarakteristika:

- (A) Lengde: 113 aminosyrer
- (B) Type: aminosyre
- (D) Topologi: lineær

5

(ii) Molekyltype: protein

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 6:

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Phe
 20 25 30
 Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Leu Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95
 Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Ala

15

20

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 7:

25

(i) Sekvenskarakteristika:

- (A) Lengde: 357 basepar
- (B) Type: nukleinsyre
- (C) Tråd: enkel
- (D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: cDNA

30

(iii) Hypotetisk: ingen

(iv) Antisense: ingen

(v) Fragmenttype: N-terminal

35

(vi) Opprinnelig kilde:

- (A) Organisme: mus
- (B) Stamme: Balb/c
- (D) Utviklingsmessig stadium: voksen
- (F) Vevstype: lymfeknute

(vii) Direkte kilde:
(B) Klon: L2 12B (lett kjede)

(ix) Særtrekk:
(A) Navn/nøkkel: CDS
(B) Lokalisering: 1..357

5

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 7:

	CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TCT	GGA	CCT	GAG	CTG	GTG	AAG	CCT	GGG	GCT	48
	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	
		115					120					125					
10	TTA	GTG	AAG	ATA	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGT	TAC	ACC	TTC	ACC	AGC	TAC	96
	Leu	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	
	130					135					140					145	
	TGG	ATG	CAC	TGG	GTG	AAG	CAG	AGG	CCT	GGA	CAA	GGC	CTT	GAG	TGG	ATC	144
	Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
					150					155					160		
15	GGA	GAG	ATT	GAT	CCT	TCT	GAT	AGT	TAT	ACT	AAC	TAC	AAT	CAA	AAG	TTC	192
	Gly	Glu	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp	Ser	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	
				165					170					175			
	AAG	GGC	AAG	GCC	ACA	TTG	ACT	GTA	GAC	AAA	TCC	TCC	AAC	ACA	GCC	TAC	240
	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr	
			180					185					190				
20	ATG	CAG	CTC	AGC	AGC	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	TCT	GCG	GTC	TAT	TAC	TGT	288
	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
		195					200					205					
	GCA	AGA	TCG	GAC	TAC	GGT	AGT	AGC	CAC	TTT	GAC	TAC	TGG	GGC	CAA	GGG	336
	Ala	Arg	Ser	Asp	Tyr	Gly	Ser	Ser	His	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
	210					215					220					225	
25	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA										357
	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
					230												

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 8:

30

(i) Sekvenskarakteristika:
(A) Lengde: 119 aminosyrer
(B) Type: aminosyre
(D) Topologi: linear

(ii) Molekyltype: protein

35

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 11:

(i) Sekvenskarakteristika:

- (A) Lengde: 357 basepar
 (B) Type: nukleinsyre
 (C) Tråd: enkel
 (D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: cDNA

(iii) Hypotetisk: ingen

(iv) Antisense: ingen

(v) Fragmenttype: N-terminal

(vi) Opprinnelig kilde:

- (A) Organisme: mus
 (B) Stamme: Balb/c
 (D) Utviklingsmessig stadium: voksen
 (F) Vevstype: lymfeknute

(vii) Direkte kilde:

- (B) Klon: L3 11D (tung kjede)

(ix) Særtrekk:

- (A) Navn/nøkkel: CDS
 (B) Lokalisering: 1..357

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 11:

	GAG GTG CAG CTG CAG CAG TCA GGG GCT GAG CTT GTG AAG CCT GGG GCT	48
	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
	115 120 125	
	TCA GTG AAG CTG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACC AGC TAC	96
25	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
	130 135 140 145	
	TGG ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT GGA CAA GGC CTT GAG TGG ATC	144
	Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
	150 155 160	
	GGA GAG ATT GAT CCT TCT GAT AGT TAT ACT AAC TAC AAT CAA AAG TTC	192
30	Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe	
	165 170 175	
	AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC	240
	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
	180 185 190	
	ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT	288
	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
	195 200 205	
35	GCA AGA TCG GAC TAC GGT AGT AGC CAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGG	336
	Ala Arg Ser Asp Tyr Gly Ser Ser His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	
	210 215 220 225	
	ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA	357
	Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
	230	

(vii) Direkte kilde:
(B) Klon: S4 2D (lett kjede)

(ix) Særtrekk:
(A) Navn/nøkkel: CDS
(B) Lokalisering: 1..327

5

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 13:

	GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA ACC ACC ATG GCT GCA TCT CCC GGG	48
	Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr Met Ala Ala Ser Pro Gly	
	120 125 130 135	
10	GAG AAG ATC ACT ATC ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT ATA AGT TCC AAT	96
	Glu Lys Ile Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn	
	140 145 150	
	TAC TTG CAT TGG TAT CAG CAG AAG CCA GGA TTC TCC CCT AAA CTC TTG	144
	Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Phe Ser Pro Lys Leu Leu	
	155 160 165	
	ATT TAT AGG ACA TCC AAT CTG GCT TCT GGA GTC CCA GCT CGC TTC AGT	192
15	Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser	
	170 175 180	
	GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATT GGC ACC ATG GAG	240
	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Gly Thr Met Glu	
	185 190 195	
	GCT GAA GAT GTT GCC ACT TAC TAC TGC CAG CAG GGT AGT AGT ATA CCA	288
20	Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ser Ile Pro	
	200 205 210 215	
	CGC ACG TTC GGA GGG GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG	327
	Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg	
	220 225	

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 14:

25

(i) Sekvenskarakteristika:
(A) Lengde: 109 aminosyrer
(B) Type: aminosyre
(D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: protein

30

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 14:

	Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr Met Ala Ala Ser Pro Gly	
	1 5 10 15	
	Glu Lys Ile Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn	
	20 25 30	
35	Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Phe Ser Pro Lys Leu Leu	
	35 40 45	
	Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser	
	50 55 60	

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Gly Thr Met Glu
 65 70 75 80
 Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ser Ile Pro
 85 90 95
 5 Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 15:

- 10 (i) Sekvenskarakteristika:
 (A) Lengde: 354 basepar
 (B) Type: nukleinsyre
 (C) Tråd: enkel
 (D) Topologi: lineær
- (ii) Molekyltype: cDNA
- 15 (iii) Hypotetisk: ingen
- (iv) Antisense: ingen
- (v) Fragmenttype: N-terminal
- 20 (vi) Opprinnelig kilde:
 (A) Organisme: mus
 (B) Stamme: Balb/c
 (D) Utviklingsmessig stadium: voksen
 (F) Vevstype: lymfeknute
- (vii) Direkte kilde:
 (B) Klon: S4 2D (lett kjede)
- 25 (ix) Særtrekk:
 (A) Navn/nøkkel: CDS
 (B) Lokalisering: 1..354
- (xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 15:

30 GAG GTC AAG CTG CAG CAG TCA GGA CCT GAG CTG GTA AAG CCT GGG GCT 48
 Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 110 115 120 125

TCA GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC GCA TTC ATA AGT TTT 96
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ile Ser Phe
 130 135 140

GTT ATG CAC TGG GTG AAG CAG AAG CCT GGG CAG GGC CTT GAG TGG ATT 144
 35 Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 145 150 155

GGA TTT ATT AAT CCT TAC AAT GAT GGT ACT AAG TAC AAT GAG AAG TTC 192
 Gly Phe Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 160 165 170

AAA GAC AAG GCC ACA CTG ACT TCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC 240
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 175 180 185

5 ATG GAG CTC AGC AGC CTG ACC TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT 288
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 190 195 200 205

GCA AGT GGG GAT TAC GAC AGG GCT ATG GAC TAC TGG GCG CAA GGG ACC 336
 Ala Ser Gly Asp Tyr Asp Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 210 215 220

10 ACG GTC ACC GTC TCC TCA 354
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 225

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 16:

15 (i) Sekvenskarakteristika:
 (A) Lengde: 118 aminosyrer
 (B) Type: aminosyre
 (D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: protein

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 16:

20 Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ile Ser Phe
 20 25 30
 25 Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Phe Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 30 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Gly Asp Tyr Asp Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

35

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 17:

(i) Sekvenskarakteristika:
 (A) Lengde: 717 basepar
 (B) Type: nukleinsyre
 (C) Tråd: enkel

(D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: cDNA

(iii) Hypotetisk: ingen

5 (iv) Antisense: ingen

(v) Fragmenttype: N-terminal

(vi) Opprinnelig kilde:

(A) Organisme: mus

(B) Stamme: Balb/c

10 (D) Utviklingsmessig stadium: voksen

(F) Vevstype: splenocytter

(vii) Direkte kilde:

(B) Klon: 4 B 2

(ix) Særtrekk:

15 (A) Navn/nøkkel: CDS

(B) Lokalisering: 1..717

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 17:

	GAG GTG AAG CTG CAG GAG TCT GGG GGA GAC TTA GTG AAG CCT GGA GGG	48
	Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly	
	120 125 130	
20	TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT AGC TAT	96
	Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
	135 140 145 150	
	GGC ATG TCT TGG GTT CGG CAG ACT CCA GAC AAG AGG CTG GAG TCT GTC	144
	Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Ser Val	
	155 160 165	
25	GCA ACC ATT AGT AGT GGT GGT GCT TAC ATC TAC TAT CCA GAC AGT GTG	192
	Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ala Tyr Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val	
	170 175 180	
	AAG GGG CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTG TAC	240
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr	
	185 190 195	
30	CTG CAA ATG AGC AGT CTG AAG TCT GAG GAC ACA GCC ATG TAT TAC TGT	288
	Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys	
	200 205 210	
	GCA AGA CTT GAA ACC GGG GAC TAT GCT TTG GAC TAC TGG GGC CAA GGG	336
	Ala Arg Leu Glu Thr Gly Asp Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	
	215 220 225 230	
35	ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGC GGT GGC TCG GGC GGT GGT GGG	384
	Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly	
	235 240 245	
	TCG GGT GGC GGC GGA TCT GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA GCT TCT	432
	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser	
	250 255 260	
	TTG GCT GTC TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC ATA TTC TGC AAG GAC AGC	480
	Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Phe Cys Lys Asp Ser	
	265 270 275	

	CAA	AGT	GTT	GAT	TAT	GAT	GGT	GAT	AGT	TAT	ATG	AAC	TGG	TAC	CAA	CAG	528
	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Asp	Gly	Asp	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	
			280				285					290					
	AAA	CCA	GGA	CAG	CCA	CCC	AAA	CTC	CTC	ATC	TAT	GCT	CGA	TCC	AAT	CTA	576
5	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Arg	Ser	Asn	Leu	
	295				300					305						310	
	GAA	TCT	GGG	GTC	CCT	GCC	AGG	TTT	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACA	GAC	624
	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	
					315					320					325		
	TTC	AGC	CTC	AAC	ATC	CAT	CCT	GTG	GAG	GAG	GAT	GAT	ATT	GCA	ATG	TAT	672
10	Phe	Ser	Leu	Asn	Ile	His	Pro	Val	Glu	Glu	Asp	Asp	Ile	Ala	Met	Tyr	
				330					335					340			
	TTC	TGT	CAG	CAA	AGT	AGG	AAG	GTT	CCG	TGG	TCG	TTC	GGT	GGA	GGG		717
	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Pro	Trp	Ser	Phe	Gly	Gly	Gly		
			345				350						355				

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 18:

15

- (i) Sekvenskarakteristika:
 (A) Lengde: 239 aminosyrer
 (B) Type: aminosyre
 (D) Topologi: linear

(ii) Molekyltype: protein

20

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 18:

	Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Gly	Asp	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	
	1				5					10					15		
	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
				20					25					30			
25	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Asp	Lys	Arg	Leu	Glu	Ser	Val	
			35					40					45				
	Ala	Thr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Ala	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	
		50				55						60					
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
30	65				70					75					80		
	Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90						95		
	Ala	Arg	Leu	Glu	Thr	Gly	Asp	Tyr	Ala	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
			100					105						110			
	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	
35			115					120					125				
	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	
		130					135					140					
	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Phe	Cys	Lys	Asp	Ser	
	145					150					155					160	

Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln
 165 170 175
 Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Arg Ser Asn Leu
 180 185 190
 5 Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 195 200 205
 Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr
 210 215 220
 Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Trp Ser Phe Gly Gly Gly
 225 230 235

10

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 19:

- (i) Sekvenskarakteristika:
 (A) Lengde: 732 basepar
 (B) Type: nukleinsyre
 15 (C) Tråd: enkel
 (D) Topologi: lineær
- (ii) Molekyltype: cDNA
- (iii) Hypotetisk: ingen
- 20 (iv) Antisense: ingen
- (vi) Opprinnelig kilde:
 (A) Organisme: mus
 (B) Stamme: Balb/c
 (F) Vevstype: splenocytter
- 25 (vii) Direkte kilde:
 (B) Klon: 10 D 2 (enkeltkjede-Fv, tung og lett kjede
 pluss linker)
- (ix) Særtrekk:
 (A) Navn/nøkkel: CDS
 (B) Lokalisering: 1..732
- 30 (xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 19:

GAG GTG CAG CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAA CTG GTG AAG CCT GGG GCT 48
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 240 245 250 255

TCA GTG AAG TTG TCC TGC AAG GCT TCC GGC TAC ACC TTC ACC AGC CAC 96
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His
 260 265 270

35 TGG ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG GCT GGA CAA GGC CTT GAG TGG ATC 144
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Ala Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 275 280 285

GGA GAG TTT AAT CCC AGC AAC GGC CGT ACT AAC TAC AAT GAG AAA TTC 192
 Gly Glu Phe Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 290 295 300

	AAG AGC AAG GCC ACA CTG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC	240
	Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
	305 310 315	
5	ATG CAA CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT	288
	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
	320 325 330 335	
	GCC AGT CGG GAC TAT GAT TAC GAC GGA CGG TAC TTT GAC TAC TGG GGC	336
	Ala Ser Arg Asp Tyr Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly	
	340 345 350	
10	CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGC GGT GGC TCG GGC GGT	384
	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
	355 360 365	
	GGT GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCT GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA	432
	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro	
	370 375 380	
	GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT	480
	Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser	
	385 390 395	
15	GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATG TAC TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGA	528
	Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly	
	400 405 410 415	
	TCC TCC CCC AGA CTC CTG ATT TAT GAC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA	576
	Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly	
	420 425 430	
20	GTC CCT GTT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC	624
	Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu	
	435 440 445	
	ACA ATC AGC CGA ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG	672
	Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln	
	450 455 460	
25	CAG TGG AGT AGT TAC CCA CCC ATG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG	720
	Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Met Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys	
	465 470 475	
	CTG GAA ATA AAA	732
	Leu Glu Ile Lys	
	480	
30		

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 20:

- 35 (i) Sekvenskarakteristika:
- (A) Lengde: 244 aminosyrer
 - (B) Type: aminosyre
 - (D) Topologi: lineær
- (ii) Molekyltype: protein

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 20:

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 5 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Ala Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Phe Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 10 Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Arg Asp Tyr Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 15 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro
 130 135 140
 Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser
 145 150 155 160
 20 Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 165 170 175
 Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly
 180 185 190
 Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
 195 200 205
 25 Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Met Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 225 230 235 240
 Leu Glu Ile Lys

30 (2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 21:

- (i) Sekvenskarakteristika:
- (A) Lengde: 732 basepar
 - (B) Type: nukleinsyre
 - (C) Tråd: enkel
 - (D) Topologi: lineær

35

- (ii) Molekyltype: cDNA
- (iii) Hypotetisk: ingen
- (iv) Antisense: ingen

(v) Fragmenttype: N-terminal

(vi) Opprinnelig kilde:

(A) Organisme: mus

(B) Stamme: Balb/c

(F) Vevstype: splenocytter

(vii) Direkte kilde:

(B) Klon: 3 D 3 (enkeltkjede-Fv, tung og lett kjede
pluss linker)

(ix) Særtrekk:

(A) Navn/nøkkel: CDS

(B) Lokalisering: 1..732

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 21:

	GAG GTC CAA CTG CAG CAG TCA GGG GCT GAA CTG GTG AAG CCT GGG GCT	48
	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
	245 250 255 260	
15	TCA GTG AAG TTG TCC TGC AAG GCT TCC GGC TAC ACC TTC ACC AGC CAC	96
	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His	
	265 270 275	
	TGG ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG GCT GGA CAA GGC CTT GAG TGG ATC	144
	Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Ala Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
	280 285 290	
20	GGA GAG TTT AAT CCC AGC AAC GGC CGT ACT AAC TAC AAT GAG AAA ATC	192
	Gly Glu Phe Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Ile	
	295 300 305	
	AAG AGC AAG GCC ACA CTG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC	240
	Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
	310 315 320	
25	ATG CAA CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT	288
	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
	325 330 335 340	
	GCC AGT CGG GAC TAT GAT TAC GAC GGA CGG TAC TTT GAC TAC TGG GGC	336
	Ala Ser Arg Asp Tyr Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly	
	345 350 355	
30	CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGC GGT GGC TCG GGC GGT	384
	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
	360 365 370	
	GGT GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCT GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA	432
	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro	
	375 380 385	
	ACA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT	480
	Thr Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser	
	390 395 400	
35	GAC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATG TAC TGG TAC CAG CAG AAG ACA GGA	528
	Asp Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly	
	405 410 415 420	
	TCC TCC CCC AGA CTC CTG ATT TAT GAC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA	576
	Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly	
	425 430 435	

	GTC	CCT	GTT	CGC	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACC	TCT	TAC	TCT	CTC	624
	Val	Pro	Val	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	
				440					445					450			
	ACA	ATC	AGC	CGA	ATG	GAG	GCT	GAA	GAT	GCT	GCC	ACT	TAT	TAC	TGC	CAG	672
	Thr	Ile	Ser	Arg	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	
5			455				460						465				
	CAG	TGG	AGT	AGT	TAC	CCA	CCC	ATG	TAC	ACG	TTC	GGA	GGG	GGG	ACC	AAG	720
	Gln	Trp	Ser	Ser	Tyr	Pro	Pro	Met	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	
		470					475					480					
	CTG	GAA	ATA	AAA													732
	Leu	Glu	Ile	Lys													
10	485																

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 22:

(i) Sekvenskarakteristika:

- (A) Lengde: 244 aminosyrer
 (B) Type: aminosyre
 (D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: protein

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 22:

20	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	
	1				5					10					15		
	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	His	
			20						25						30		
	Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Ala	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
			35					40					45				
25	Gly	Glu	Phe	Asn	Pro	Ser	Asn	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Ile	
		50					55					60					
	Lys	Ser	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
		65				70					75					80	
	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
30	Ala	Ser	Arg	Asp	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Gly	Arg	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	
				100					105					110			
	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
			115					120					125				
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	
		130					135					140					
35	Thr	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	
		145				150					155					160	
	Asp	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Thr	Gly	
					165					170					175		

Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly
 180 185 190
 Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
 195 200 205
 5 Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Met Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 225 230 235 240
 Leu Glu Ile Lys

10

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 23:

- (i) Sekvenskarakteristika:
 (A) Lengde: 738 basepar
 (B) Type: nukleinsyre
 15 (C) Tråd: enkel
 (D) Topologi: lineær
- (ii) Molekyltype: cDNA
- (iii) Hypotetisk: ingen
- (iv) Antisense: ingen
 20 (v) Fragmenttype: N-terminal
- (vi) Opprinnelig kilde:
 (A) Organisme: mus
 (B) Stamme: Balb/c
 (F) Vevstype: splenocytter
 25 (vii) Direkte kilde:
 (B) Klon: 1 E 3 (enkeltkjede-Fv, tung og lett kjede
 pluss linker)
- (ix) Særtrekk:
 (A) Navn/nøkkel: CDS
 30 (B) Lokalisering: 1..738
- (xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 23:

GAG GTG CAG CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAA CTG GTG AAG CCT GGG GCT 48
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 245 250 255 260

35 TCA GTG AAG TTG TCC TGC AAG GCT TCC GGC TAC ACC TTC ACC AGC CAC 96
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His
 265 270 275

TGG ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG GCT GGA CAA GGC CTT GAG TGG ATC 144
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Ala Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 280 285 290

	GGA GAG TTT AAT CCC AGC AAC GGC CGT ACT AAC TAC AAT GAG AAA TTC	192
	Gly Glu Phe Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe	
	295 300 305	
5	AAG AGC AAG GCC ACA CTG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCT TAC	240
	Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
	310 315 320	
	ATG CAA CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT	288
	Met Gln Leu Ser Ser Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
	325 330 335 340	
10	GCC AGT CGG GAC TAT GAT TAC GAC GGA CGG TAC TTT GAC TAC TGG GGC	336
	Ala Ser Arg Asp Tyr Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly	
	345 350 355	
	CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGC GGT GGC TCG GGC GGT	384
	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
	360 365 370	
	GGT GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCT GGA TCT GAC ATT GAG CTC ACC CAG	432
	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln	
	375 380 385	
15	TCT CCA ACA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC	480
	Ser Pro Thr Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr	
	390 395 400	
	TGC AGT GAC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATG TAC TGG TAC CAG CAG AAG	528
	Cys Ser Asp Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys	
	405 410 415 420	
20	CCA GGA TCC TCC CCC AGA CTC CTG ATT TAT GAC ACA TCC AAC CTG GCT	576
	Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala	
	425 430 435	
	TCT GGA GTC CCT GTT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC	624
	Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr	
	440 445 450	
25	TCT CTC ACA ATC AGC CGA ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC	672
	Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr	
	455 460 465	
	TGC CAG CAG TGG AGT AGT TAC CCA CCC ATG TAC ACG TTC GGA GGG GGG	720
	Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Met Tyr Thr Phe Gly Gly Gly	
	470 475 480	
30	ACC AAG CTG GAA ATA AAA	738
	Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
	485 490	

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 24:

- 35 (i) Sekvenskarakteristika:
- (A) Lengde: 246 aminosyrer
 - (B) Type: aminosyre
 - (D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: protein

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 24:

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 5 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Ala Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Phe Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 10 Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Arg Asp Tyr Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 15 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln
 130 135 140
 Ser Pro Thr Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr
 145 150 155 160
 20 Cys Ser Asp Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys
 165 170 175
 Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala
 180 185 190
 Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr
 195 200 205
 25 Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr
 210 215 220
 Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Met Tyr Thr Phe Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 245

30

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 25:

- (i) Sekvenskarakteristika:
 (A) Lengde: 726 basepar
 (B) Type: nukleinsyre
 (C) Tråd: enkel
 (D) Topologi: lineær

35

(ii) Molekyltype: cDNA

(iii) Hypotetisk: ingen

(iv) Antisense: ingen

(v) Fragmenttype: N-terminal

(vi) Opprinnelig kilde:

(A) Organisme: mus

(B) Stamme: Balb/c

(F) Vevstype: splenocytter

(vii) Direkte kilde:

(B) Klon: 5 F 1 (enkeltkjede-Fv, tung, lett kjede, linker)

(ix) Særtrekk:

(A) Navn/nøkkel: CDS

(B) Lokalisering: 1..726

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 25:

15	CAG GTG AAA CTG CAG GAG TCT GGG GCT GAA CTG GTG AAG CCT GGG GCT	48
	Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
	250 255 260	
	TCA GTG AAG TTG TCC TGC AAG GCT TCC GGC TAC ACC TTC ACC AGC CAC	96
	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His	
	265 270 275	
20	TGG ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG GCT GGA CAA GGC CTT GAG TGG ATC	144
	Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Ala Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
	280 285 290	
	GGA GAG ATT AAT CCC AGA ACG GCG CCT ACT AAC TAC AAT GAG AAA TTC	192
	Gly Glu Ile Asn Pro Arg Thr Ala Pro Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe	
	295 300 305 310	
	AAG AGC AAG GCC ACA CTG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC	240
	Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
	315 320 325	
25	ATG CAA CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT	288
	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
	330 335 340	
	GCC AGT CGG GAC TAT GAT TAC GAC GGA CGG TAC TTT GAC TAC TGG GGC	336
	Ala Ser Arg Asp Tyr Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly	
	345 350 355	
30	CAA GGG ACA ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGC GGT GGC TCG GGC GGT	384
	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
	360 365 370	
	GGT GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCT GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA	432
	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro	
	375 380 385 390	
35	ACA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT	480
	Thr Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser	
	395 400 405	
	GAC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ACG TAC TGG TAC CAG CAG AAG ACA GGA	528
	Asp Ser Ser Ser Val Ser Tyr Thr Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly	
	410 415 420	

	TCC	TCC	CCC	AGA	CTC	CTG	ATT	TAT	GAC	ACA	TCC	AAC	CTG	GCT	TCT	GGA	576
	Ser	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	
			425					430					435				
	GTC	CCT	GTT	CGC	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACC	TCT	TAC	TCT	CTC	624
	Val	Pro	Val	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	
			440				445					450					
5	ACA	ATC	AGC	CGA	ATG	GAG	GCT	GAA	GAT	GCT	GCC	ACT	TAT	TAC	TGC	CAG	672
	Thr	Ile	Ser	Arg	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	
						460					465					470	
	CAG	TGG	AGT	AGT	TAC	CCG	CTC	ACG	TTC	GGT	GCT	GGG	ACC	AAG	CTG	GAA	720
	Gln	Trp	Ser	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	
					475					480					485		
10	ATA	AAA															726
	Ile	Lys															

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 26:

(i) Sekvenskarakteristika:

- 15 (A) Lengde: 242 aminosyrer
 (B) Type: aminosyre
 (D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: protein

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 26:

20	Gln	Val	Lys	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	
	1				5					10					15		
	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	His	
				20					25						30		
	Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Ala	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
			35					40					45				
25	Gly	Glu	Ile	Asn	Pro	Arg	Thr	Ala	Pro	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	
		50					55					60					
	Lys	Ser	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
		65				70					75					80	
	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
30	Ala	Ser	Arg	Asp	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Gly	Arg	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	
				100					105					110			
	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
			115					120						125			
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	
		130					135					140					
35	Thr	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	
		145				150					155					160	
	Asp	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Thr	Gly	
					165					170					175		
	Ser	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	
					180				185						190		

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

Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 210 215 220

5 Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu
 225 230 235 240

Ile Lys

10 (2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 27:

(i) Sekvenskarakteristika:

- (A) Lengde: 726 basepar
- (B) Type: nukleinsyre
- (C) Tråd: enkel
- (D) Topologi: lineær

15 (ii) Molekyltype: cDNA

(iii) Hypotetisk: ingen

(iv) Antisense: ingen

(v) Fragmenttype: N-terminal

20 (vi) Opprinnelig kilde:

- (A) Organisme: mus
- (B) Stamme: Balb/c
- (F) Vevstype: splenocytter

(vii) Direkte kilde:

- 25 (A) Bibliotek: 7 G 1 (enkeltkjede-Fv, tung, lett
 kjede, linker)

(ix) Særtrekk:

- (A) Navn/nøkkel: CDS
- (B) Lokalisering: 1..726

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 27:

30 GAG GTC AAG CTG CAG CAG TCA GGG GCT GAA CTG GTG AAG CCT GGG GCT 48
 Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 245 250 255

TCA GTG AAG TTG TCC TGC AAG GCT TCC GGC TAC ACC TTC ACC AGC CAC 96
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His
 260 265 270

35 TTG GAT CAC TGG GTG AAG CAG AGG GGC TGG CAA GGC CTT GAG TGG ATC 144
 Leu Asp His Trp Val Lys Gln Arg Gly Trp Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 275 280 285 290

GGA CAG TTT AAT CCC AGC AAC GGC CGT ACT AAC TAC AAT GAG AAA TTC 192
 Gly Gln Phe Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 295 300 305

	AAG	AGC	AAG	GCC	ACA	CTG	ACT	GTA	GAC	AAA	TCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	240
	Lys	Ser	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
				310					315					320			
5	ATC	GAA	CTC	AGC	AGC	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	TGC	TCG	GTC	TAT	TAC	TGT	288
	Ile	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Cys	Ser	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			325					330					335				
	GCC	AGT	CGG	GAC	TAT	GAT	TAC	GAC	GGA	CGG	TAC	TTT	GAC	TAC	TGG	GGC	336
	Ala	Ser	Arg	Asp	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Gly	Arg	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	
		340				345						350					
10	CAA	GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GGT	GGC	GGT	GGC	TCG	GGC	GGT	384
	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
	355				360						365					370	
	GGT	GGG	TCG	GGT	GGC	GGC	GGA	TCT	GAC	ATT	GAG	CTC	ACC	CAG	TCT	CCA	432
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	
				375					380					385			
	ACA	ATC	ATG	TCT	GCA	TCT	CCA	GGG	GAG	AAG	GTC	ACC	ATG	ACC	TGC	AGT	480
	Thr	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	
			390					395					400				
15	GAC	AGC	TCA	AGT	GTA	AGT	TAC	ATG	TAC	TGG	TAC	CAG	CAG	AAG	ACA	GGA	528
	Asp	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Thr	Gly	
			405				410					415					
	TCC	TCC	CCC	AGA	CTT	CTG	ATT	TAT	GAC	ACA	TCC	AAC	CTG	GCT	TCT	GGA	576
	Ser	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	
			420				425					430					
20	GTC	CCT	GTT	CGC	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACC	TCT	TAC	TCT	CTC	624
	Val	Pro	Val	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	
	435				440				445							450	
	ACA	ATC	AGC	CGA	ATG	GAG	GCT	GAA	GAT	GCT	GCC	ACT	TAT	TAC	TGC	CAG	672
	Thr	Ile	Ser	Arg	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	
				455				460							465		
25	CAG	TGG	AGT	AGT	TAC	CCG	CTC	ACG	TTC	GGT	GCT	GGG	ACC	AAG	CTG	GAA	720
	Gln	Trp	Ser	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	
			470					475					480				
	ATA	AAA															726
	Ile	Lys															

30 (2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 28:

- (i) Sekvenskarakteristika:
 - (A) Lengde: 242 aminosyrer
 - (B) Type: aminosyre
 - (D) Topologi: lineær

35 (ii) Molekyltype: protein

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 28:

Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His
 5 20 25 30
 Leu Asp His Trp Val Lys Gln Arg Gly Trp Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gln Phe Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 10 65 70 75 80
 Ile Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Cys Ser Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Arg Asp Tyr Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro
 130 135 140
 Thr Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser
 145 150 155 160
 Asp Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly
 165 170 175
 Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly
 180 185 190
 Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
 195 200 205
 Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu
 225 230 235 240
 Ile Lys

30

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 29:

- (i) Sekvenskarakteristika:
- (A) Lengde: 726 basepar
 - (B) Type: nukleinsyre
 - (C) Tråd: enkel
 - (D) Topologi: lineær

35

(ii) Molekyltype: cDNA

(iii) Hypotetisk: ingen

(iv) Antisense: ingen

(v) Fragmenttype: N-terminal

(vi) Opprinnelig kilde:

(A) Organisme: mus

(B) Stamme: Balb/c

(D) Utviklingsmessig stadium: voksen

(F) Vevstype: splenocytter

(vii) Direkte kilde:

(B) Klon: 11 H 1 (enkeltkjede-Fv, tung og lett kjede
pluss linker)

(ix) Særtrekk:

(A) Navn/nøkkel: CDS

(B) Lokalisering: 1..726

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 29:

	GAG	GTC	AAG	CTG	CAG	CAG	TCA	GGG	GCT	GAA	CTG	GTG	AAG	CCT	GGG	GCT	48
	Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	
			245					250					255				
15	TCA	GTG	AAG	TTG	TCC	TGC	AAG	GCT	TCC	GGC	TAC	ACC	TTC	ACC	AGC	CAC	96
	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	His	
		260				265					270						
	TGG	ATG	CAC	TGG	GTG	AAG	CAG	AGG	GCT	GGA	CAA	GGC	TTG	GAG	TGG	ATC	144
	Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Ala	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
		275			280					285					290		
20	GGA	GAG	TTT	AAT	CCC	AGC	AAC	GGC	CGT	ACT	AAC	TAC	AAT	GAG	AAA	TTC	192
	Gly	Glu	Phe	Asn	Pro	Ser	Asn	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	
				295				300						305			
	AAG	AGC	AAG	GCC	ACA	CTG	ACT	GTA	GAC	AAA	TCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	240
	Lys	Ser	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
			310					315						320			
25	ATG	CAA	CTC	AGC	AGC	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	TCT	GCG	GTC	TAT	TAC	TGT	288
	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			325					330					335				
	GCC	AGT	CGG	GAC	TAT	GAT	TAC	GAC	GGA	CGG	TAC	TTT	GAC	TAC	TGG	GGC	336
	Ala	Ser	Arg	Asp	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Gly	Arg	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	
		340				345						350					
30	CAA	GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GGT	GGC	GGT	GGC	TCG	GGC	GGT	384
	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
		355			360					365					370		
	GGT	GGG	TCG	GGT	GGC	GGC	GGA	TCT	GAC	ATT	GAG	CTC	ACC	CAG	TCT	CCA	432
	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	
				375				380						385			
35	TCA	ATC	ATG	TCT	GCA	TCT	CCA	GGG	GAG	AAG	GTC	ACC	ATG	ACC	TGC	AGT	480
	Ser	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	
				390				395					400				
	GAC	AGC	TCA	AGT	GTA	AGT	TAC	ATG	TAC	TGG	TAC	CAG	CAG	AAG	ACA	GGA	528
	Asp	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Thr	Gly	
			405				410						415				

	TCC	TCC	CCC	AGA	CTC	CTG	ATT	TAT	GAC	ACA	TCC	AAC	CTG	GCT	TCT	GGA	576
	Ser	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	
		420					425					430					
	GTC	CCT	GTT	CGC	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACC	TCT	TAC	TCT	CTC	624
	Val	Pro	Val	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	
5	435					440					445					450	
	ACA	ATC	AGC	CGA	ATG	GAG	GCT	GAA	GAT	GCT	GCC	ACT	TAT	TAC	TGC	CAG	672
	Thr	Ile	Ser	Arg	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	
					455					460						465	
	CAG	TGG	AGT	AGT	TAC	CCA	CAC	ACG	TTC	GGT	GCT	GGG	ACC	AAG	CTG	GAA	720
	Gln	Trp	Ser	Ser	Tyr	Pro	His	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	
					470					475						480	
10	ATA	AAA															726
	Ile	Lys															

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 30:

	(i) Sekvenskarakteristika:																
15	(A) Lengde: 242 aminosyrer																
	(B) Type: aminosyre																
	(D) Topologi: lineær																
	(ii) Molekyltype: protein																
	(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 30:																
20	Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	
	1				5					10					15		
	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	His	
				20					25					30			
25	Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Ala	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
			35					40					45				
	Gly	Glu	Phe	Asn	Pro	Ser	Asn	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	
		50					55					60					
	Lys	Ser	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
30	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
	Ala	Ser	Arg	Asp	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Gly	Arg	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	
				100					105					110			
	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
			115					120						125			
35	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	
		130					135					140					
	Ser	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	
	145					150					155					160	
	Asp	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Thr	Gly	
					165					170						175	

Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly
 180 185 190
 Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
 195 200 205
 5 Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Tyr Pro His Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu
 225 230 235 240
 Ile Lys

10

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 31:

(i) Sekvenskarakteristika:

- (A) Lengde: 732 basepar
 (B) Type: nukleinsyre
 (C) Tråd: enkel
 15 (D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: cDNA

(iii) Hypotetisk: ingen

(iv) Antisense: ingen

20

(v) Fragmenttype: N-terminal

(vi) Opprinnelig kilde:

- (A) Organisme: mus
 (B) Stamme: Balb/c
 (F) Vevstype: splenocytter

25

(vii) Direkte kilde:

- (A) Klon: 1 A 1 (enkeltkjede-Fv, tung og lett
 kjede pluss linker)

(ix) Særtrekk:

- (A) Navn/nøkkel: CDS
 (B) Lokalisering: 1..732

30

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 31:

GAG GTG CAG CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAA CTG GTG AAG CCT GGG GCT 48
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 245 250 255
 TCA GTG AAG TTG TCC TGC AAG GCT TCC GGC TAC ACC TTC ACC AGC CAC 96
 35 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His
 260 265 270
 TGG ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG GCT GGA CAA GGC CTT GAG TGG ATC 144
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Ala Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 275 280 285 290

	GGA GAG TTT AAT CCC AGC AAC GGC CGT ACT AAC TAC AAT GAG AAA TTC	192
	Gly Glu Phe Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe	
	295 300 305	
5	AAG AGC AAG GCC ACA CTG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCT TAC	240
	Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
	310 315 320	
	ATG CAA CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT	288
	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
	325 330 335	
	GCC AGT CGG GAC TAT GAT TAC GAC GGA CGG TAC TTT GAC TAC TGG GGC	336
	Ala Ser Arg Asp Tyr Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly	
	340 345 350	
10	CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGC GGT GGC TCG GGC GGT	384
	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
	355 360 365 370	
	GGT GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCT GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA	432
	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro	
	375 380 385	
15	ACA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT	480
	Thr Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser	
	390 395 400	
	GAC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATG TAC TGG TAC CAG CAG AAG ACA GGA	528
	Asp Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly	
	405 410 415	
20	TCC TCC CCC AGA CTC CTG ATT TAT GAC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA	576
	Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly	
	420 425 430	
	GTC CCT GTT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC	624
	Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Ser Leu	
	435 440 445 450	
	ACA ATC AGC CGA ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG	672
	Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln	
	455 460 465	
25	CAG TGG AGT AGT TAC CCA CCC ATG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACA AAG	720
	Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Met Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys	
	470 475 480	
	TTG GAA ATA AAA	732
	Leu Glu Ile Lys	
	485	
30		

(2) Informasjon for sekvensidentitet nr. 32:

(i) Sekvenskarakteristika:

- 35 (A) Lengde: 244 aminosyrer
 (B) Type: aminosyre
 (D) Topologi: lineær

(ii) Molekyltype: protein

(xi) Sekvensbeskrivelse: sekvensidentitet nr. 32:

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His
 5 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Ala Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Phe Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 10 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Arg Asp Tyr Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 15 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro
 130 135 140
 Thr Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser
 145 150 155 160
 Asp Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly
 20 165 170 175
 Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly
 180 185 190
 Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
 195 200 205
 Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 25 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Met Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 225 230 235 240
 Leu Glu Ile Lys

30

35

P a t e n t k r a v

1. Anti-EGFR-enkeltkjede-Fv,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at den er mulig å fremskaffe
fra et bakteriofagantistoffbibliotek som er fremstilt fra
lymfeknuten til en immunisert mus (i), milten til en
immunisert mus (ii) eller in vitro-immuniserte museceller
(iii), der den variable regionen til enkeltkjede-Fv omfatter
10 en tungkjede- og en lettkjedesevens som er valgt fra gruppene
som består av
- (i) L2 12B som er gitt ved lettkjeden med sekvensidentitet
nr.6 og tungkjeden med sekvensidentitet nr.8,
L3 11D som er gitt ved lettkjeden med sekvensidentitet
15 nr.10 og tungkjeden med sekvensidentitet nr.12,
L3 10A som er gitt med lettkjede og tungkjede i figur
1(A),
L2 1C som er gitt med lettkjede og tungkjede i figur
1(A),
- 20 (ii) S4 2D som er gitt ved lettkjeden med sekvensidentitet
nr.14 og tungkjeden med sekvensidentitet nr.16,
S4 10H som er gitt med lettkjede og tungkjede i figur
1(B),
S4 5A som er gitt med lettkjede og tungkjede i figur
25 1(B),
- (iii) 4B2 som er gitt ved lettkjede og tungkjede i
sekvensidentitet nr.18,
10D2 som er gitt ved lettkjede og tungkjede i
sekvensidentitet nr.20,
30 3D3 som er gitt ved lettkjede og tungkjede i
sekvensidentitet nr.22,
IE3 som er gitt ved lettkjede og tungkjede i
sekvensidentitet nr.24.
- 35 2. DNA-molekyl,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det koder for anti-EGFR-
enkeltkjede-Fv-molekylet ifølge krav 1.

3. Kimert anti-EGFR-antistoff,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er kodet for av et
DNA-molekyl som omfatter sekvenser ifølge krav 2 og sekvenser
som koder for tungkjede- og lettkjedekonstantområder i humane
5 immunoglobuliner.
4. Antistoff ifølge krav 3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at tungkjedekonstantområdet
omfatter aminosyresekvensen til en human gamma-1-kjede og
10 lettkjedekonstantområdet omfatter aminosyresekvensen til en
human kappa-kjede.
5. Fremgangsmåte for fremstilling av et anti-EGFR-
enkeltkjede-Fv ifølge krav 1,
15 k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter følgende
trinn:
- (i) isolering av RNA fra immuniserte museceller som er
fremskaffet ved
immunisering med A431-celler, løsrevne membranvesikler
20 fra A431-celler eller
renset humant EGFR,
 - (ii) syntetisering av førstetråds-cDNA,
 - (iii) amplifisering av V_H - og V_K -genene i cDNA fra de
immuniserte cellene,
 - 25 (iv) kloning av nevnte gener sammen med egnede
restriksjonssteder inn i en
fagemidvektor,
 - (v) transformering av prokaryote celler med
ligeringsblandinger,
 - 30 (vi) screening av fagbibliotekene for fagantistoffer rettet
mot EGFR ved å benytte
renset EGFR og
 - (vii) fremstille nevnte enkeltkjede-Fv i prokaryote
vertsceller, fortrinnsvis E.coli.
- 35
6. Fremgangsmåte for fremstilling av et helt kimert anti-
EGFR-antistoff,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det foregår ved å klone

DNA ifølge krav 2 som koder for tungkjede- og
lettkjedevariabelområdene til anti-EGFR-antistoffragmenter som
er mulig å fremskaffe ved hjelp av fremgangsmåten ifølge krav
5, inn i minst én eukaryot ekspresjonsvektor som inneholder

5 genomisk DNA som koder for tungkjede- og
lettkjedekonstantområdene til humane immunoglobuliner,
transformere eukaryote celler med nevnte vektor(er) og
uttrykke og isolere antistoffet.

10 7. Farmasøytisk preparat,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det i en farmasøytisk
effektiv mengde omfatter et anti-EGFR-enkeltkjede-Fv ifølge
krav 1 eller et helt kimert anti-EGFR-antistoff ifølge kravene
3 eller 4, eventuelt sammen med en bærer, et fortynningsmiddel
15 eller en eksipiens.

8. Anvendelse av et anti-EGFR-enkeltkjede-Fv ifølge krav 1
eller et helt anti-EGFR-antistoff ifølge ett av kravene 3
eller 4, for fremstilling av et legemiddel som er rettet mot
20 tumorer.

FIGUR 1 (A)

VH:

scFv	FR 1	CDR 1	FR 2
L3 11D	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT	SYWMH	WVKQRPGQGLEWIG
L2 12B	QVQLQESGPELVKPGALVKISCKASGYTFT	SYWMH	WVKQRPGQGLEWIG
L3 10A	QVKLQESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFS	SYGMS	WVRQTPDKRLESVA
L2 1C	EVKLQQSGAELVRPEASVKLSCKTSGYIFT	NYWIH	WVKQRSGQGLEWIA
L2 8C	QVQLQESGAELVRPGASVKLSCKTSGYIFT	NYWIH	WVKQRSGQGLEWIA
L2 11C	QVQLQESGPELVVRPGASVKMSCKASGYTFT	TYWIH	WMKQRPGQGLQWIG
scFv	CDR 2	FR 3	
L3 11D	EIDPDSYTNYNQKFKG	KATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR	
L2 12B	EIDPDSYTNYNQKFKG	KATLTVDKSCNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR	
L3 10A	TISSGGAYIYYPDSVKG	RFTISRDNANTLYLQMSSSLKSEDTAMYICAR	
L2 1C	RIYPGNGSTYYNEKFKG	KATLTADKSSSTAYMQLSSLKSEDSAVYFCAR	
L2 8C	KDLSWNGSYNEKFKG	KATLTADKSSSTAYMQLSSLKSEDSAVYFCAR	
L2 11C	MIDPSNSETRLNQNFRD	KATLSVDKSSNKAYMQLSSLTSEDSAYIICAR	
scFv	CDR 3	FR 4	
L3 11D	SDYGSSHFDY	WGQGTTVTVSS	
L2 12B	SDYGSSHFDY	WGQGTTVTVSS	
L3 10A	LETGDYALDY	WGQGTTVTVSS	
L2 1C	STSDSSLPYWFYFDV	WGQGTTVTVSS	
L2 8C	STSDSSLPYWFYFDV	WGQGTTVTVSS	
L2 11C	WDYGSGHFDY	WGQGTTVTVSS	

VK:

scFv	FR 1	CDR 1	FR 2
L3 11D	DIELTQSPASLAVSLGQRATISC	RASESDNFGISFMN	WFQQKPGQPPKLLIY
L2 12B	DIELTQSPASLAVSLGQRATISC	RASESDNFGISFMN	WFQQKPGQPPKLLIY
L3 10A	DIELTQSPASLAVSLGQRATISC	RASESVEYYGTSLMQ	WFQQKPGQPPKLLIY
L2 1C	DIELTQSPTILSTSPGEKVTVTC	RATLGVSYMH	WYQQKPGSSPKPWIY
L2 8C	DIELTQSPAIMSASPGEKVTITC	SASSSVSYMH	WFQQKPGTSPKLWIY
L2 11C	DIELTQSPASLAASVGETVTITC	RASENIYSLA	WYQQKQKSPQLLIY
scFv	CDR 2	FR 3	
L3 11D	GASNQGS	GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPLEEDDTAMYFC	
L2 12B	GASNQGS	GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPLEEDDTAMYFC	
L3 10A	AASNVES	GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFC	
L2 1C	ATSNLAS	GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYC	
L2 8C	STSNLAS	GVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYC	
L2 11C	SASALED	GVPARFSGSGSGTQYSLKINMQPEDTATYFC	
scFv	CDR 3	FR 4	
L3 11D	QQSKEVPLT	FGAGTKLELKRA	
L2 12B	QQSKEVPLT	FGAGTKLEIKRA	
L3 10A	QQSRKVPWT	FGGGTKLEIKRA	
L2 1C	QQWISNPPT	FGGGTKLEIKRA	
L2 8C	QQRNSYPHT	FGAGTKLELKRA	
L2 11C	KQTYDVPWT	FGGGTKLEIKRA	

FIGUR 1 (B)

VH:

scFv	FR 1	CDR 1	FR 2
S4 2D	EVKLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYAFI	SFVMH	WVKQKPGQGLEWIG
S4 10H	EVKLQESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFS	SYGMS	WVRQTPDKRLESVA
S4 5A	EVKLQESGGDSVKPGGSLKLSCAASGFTFS	SYGMS	WVRQTPDKRLESVA
S3 12D	EVKLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIK	DTYMH	WVKQRPEQGLEWIG

scFv	CDR 2	FR 3
S4 2D	FINPYNDGTYNEKFKD	KATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCAS
S4 10H	TISSGGAYIYYPDSVKG	RFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYCAR
S4 5A	TISSGGAYIYYPDSVKG	RFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYCAR
S3 12D	RIDPANGNTKYDPKFQD	RASITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCAS

scFv	CDR 3	FR 4
S4 2D	GDYDRAMDY	WGQGTTTVTVSS
S4 10H	LETGDYALDY	WGQGTTTVTVSS
S4 5A	LETGDYAMDY	WGQGTTTVTVSS
S3 12D	DYYGYEAWFAY	WGQGTTTVTVSS

VK:

scFv	FR 1	CDR 1	FR 2
S4 2D	DIELTQSPPTMAASPGKITTIC	SASSSISSNYLH	WYQQKPGFSPKLLIY
S4 10H	DIELTQSPASLAVSLGQRATISC	RASESVEYYGTSLMQ	WYQQKPGQAPKLLIY
S4 5A	DIELTQSPASLAVSLGQRATISC	RASESVEYYGTSLMQ	WYQQKPGQPPKLLIY
S3 12D	DIELTQSPASLAVSLGQRATISC	RASESVDNYGISFMN	WYQQKPGQPPKLLIY

scFv	CDR 2	FR 3
S4 2D	RTSNLAS	GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFC
S4 10H	AASNVES	EVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFC
S4 5A	AASNVES	GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFC
S3 12D	AASNQGS	GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFC

scFv	CDR 3	FR 4
S4 2D	QQGSSIPRT	FGGGTKLEIKRA
S4 10H	QQSRKVPWT	FGGGTKLEIKRA
S4 5A	QQSRKVPWT	FGGGTKLEIKRA
S3 12D	QQSKEVPWT	FGGGTKLEIKRA

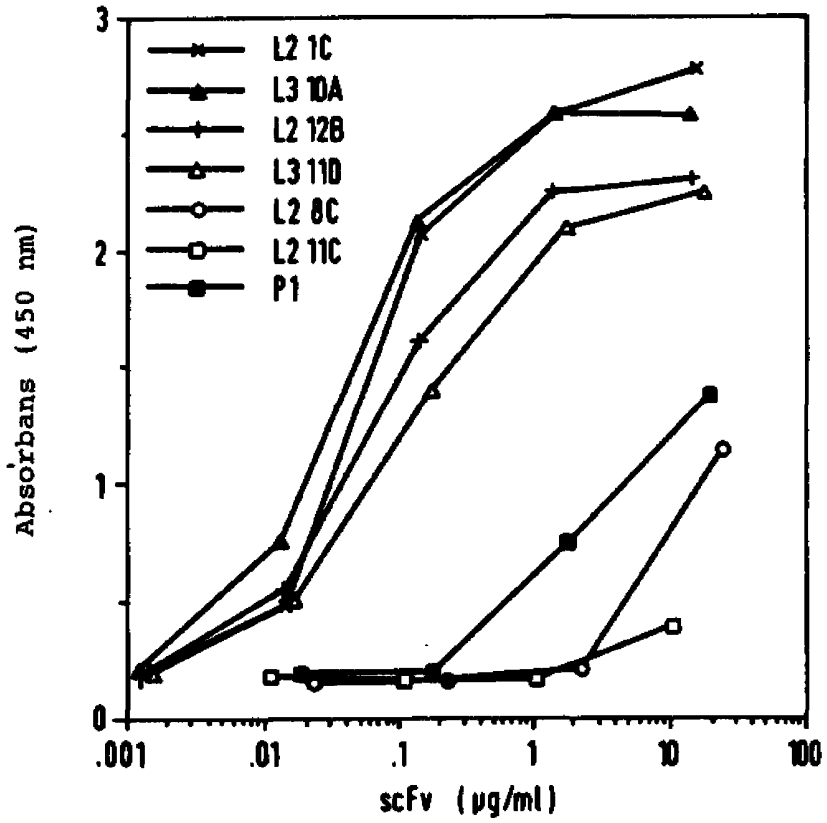
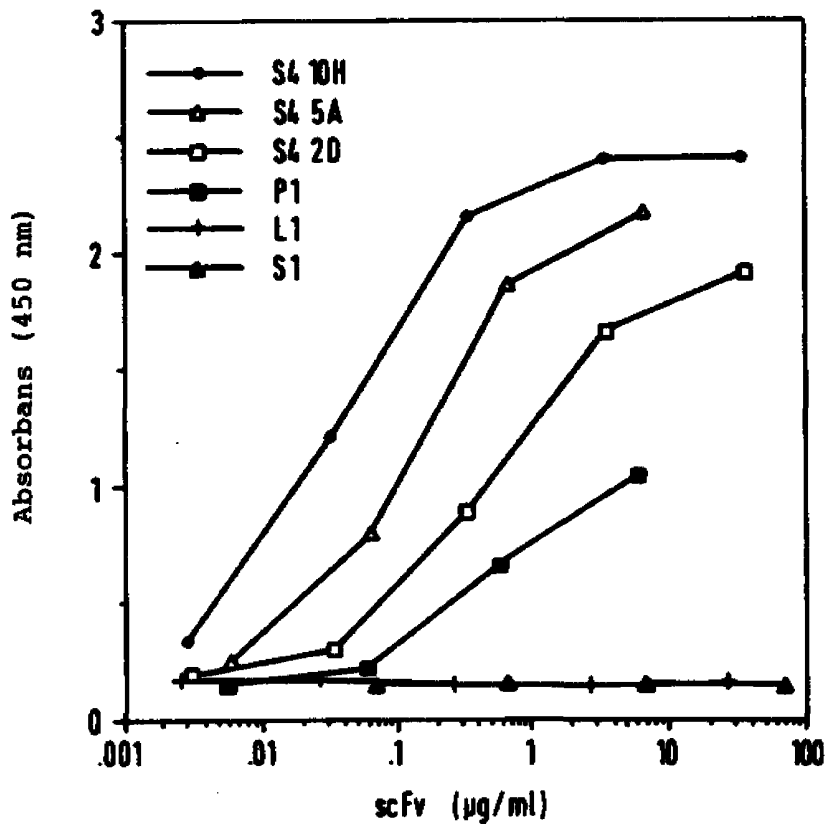


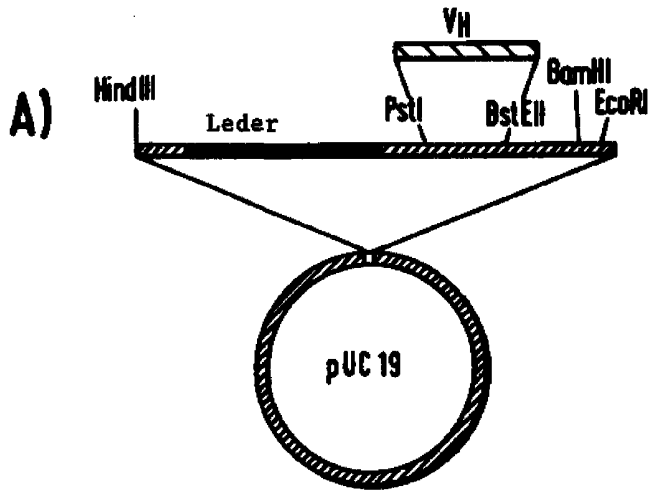
Fig.2

A)

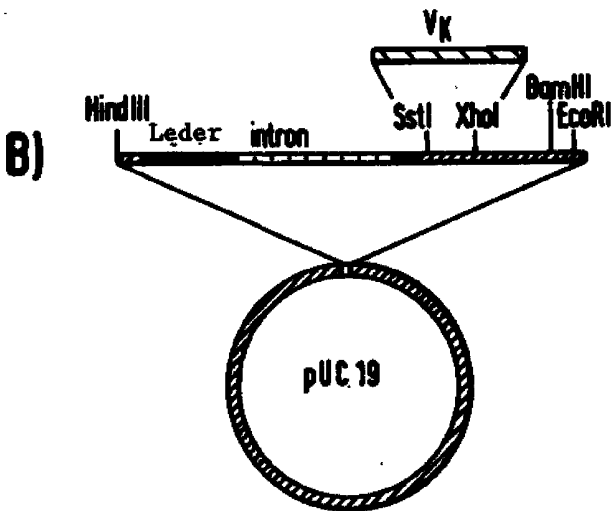


B)

Fig.3

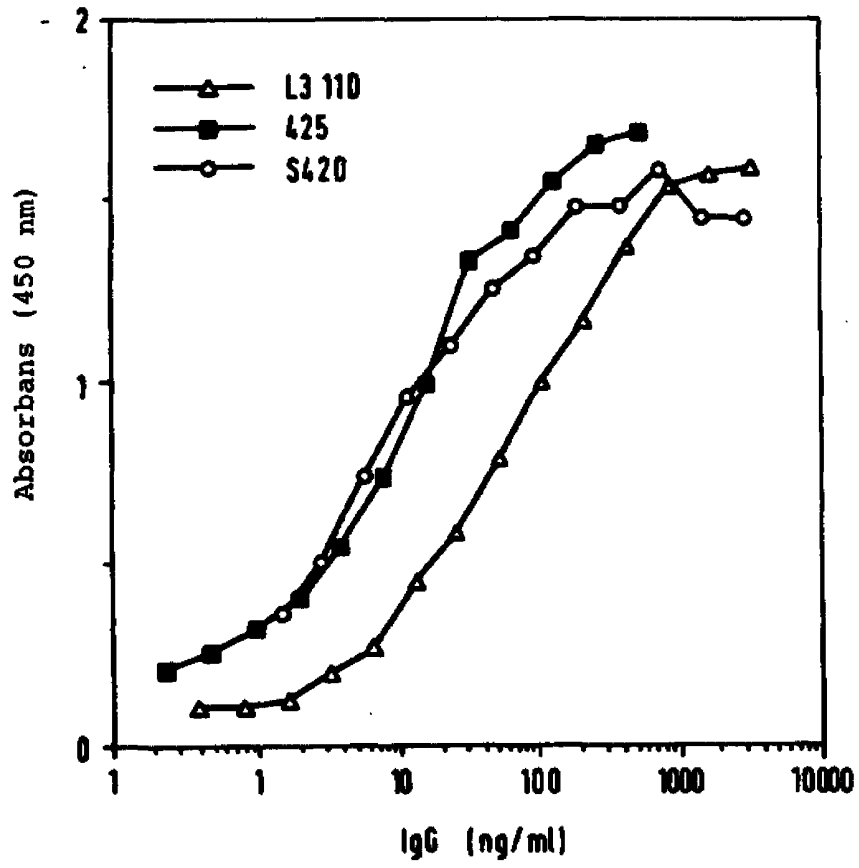


HindIII Leder
 AAGCTTGGCCG C CACCATGGACTGGACCTGGCGCGTGT T T T G C C T G C T G C C C G T G G C T C C T G
 M D W T W R V F C L L A V A F
 PstI BstEII
 G G C C C A C A G C C A G G T G C A A C T G C A G C A G T C C G G T G C C A A G G A C C A C G G T C A C C G T C T C C
 G A H S Q V Q L Q V T V S
 BamHI EcoRI
 T C A G G T G A G T G G A T C C G A A T T C
 S



HindIII Leder intron
 AAGCTTCGCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTA
 M G W S C I I L F L V A T A T
 AGGGGCTCA CAGTAGCAGGCTTGAGCTCTGGACATATATATGGGTGACAATGACATCCACTT
 Leder SstI XhoI
 T G C C T T T C T C C A C A G G T G T C C A C T C G G A C A T T G A G C T C A C C C A G T C T C C A G A C A A A G C T C
 G V H S D I E L L
 BamHI EcoRI
 G A G C T G A A A C G T G A G T A G A A T T A A A C T T T G C T T C C T C A A T T G G A T C C G A A T T C
 E L K

Fig. 4



Figur 7: (A)

GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG	48
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly	
1 5 10 15	
CAG AGG GCC ACC ATC TCC TGC CGA GCC AGC GAA AGT GTT GAT AAT TTT	96
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Phe	
20 25 30	
GGC ATT AGT TTT ATG AAC TGG TTC CAA CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC	144
Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro	
35 40 45	
AAA CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AAC CAA GGA TCC GGG GTC CCT GCC	192
Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala	
50 55 60	
AGG TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC AGC CTC AAC ATC CAT	240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His	
65 70 75 80	
CCT TTG GAG GAG GAT GAT ACT GCA ATG TAT TTC TGT CAG CAA AGT AAG	288
Pro Leu Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys	
85 90 95	
GAG GTT CCG CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA CGG	336
Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg	
100 105 110	
GCG	339
Ala	
(B)	
GAG GTG CAG CTG CAG CAG TCA GGG GCT GAG CTT GTG AAG CCT GGG GCT	48
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
TCA GTG AAG CTG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACC AGC TAC	96
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
20 25 30	
TGG ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT GGA CAA GGC CTT GAG TGG ATC	144
Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
GGA GAG ATT GAT CCT TCT GAT AGT TAT ACT AAC TAC AAT CAA AAG TTC	192
Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe	
50 55 60	
AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC	240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT	288
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
GCA AGA TCG GAC TAC GGT AGT AGC CAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGG	336
Ala Arg Ser Asp Tyr Gly Ser Ser His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	
100 105 110	
ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA	357
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
115	

