



(12) SØKNAD

(19) NO

(21) 20171287

(13) A1

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20171287	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2005.09.02 PCT/US2005/031401
(22)	Inng.dag	2017.08.02	(85)	Videreføringsdag	2017.08.02
(24)	Løpedag	2005.09.02	(30)	Prioritet	2004.09.03, US, 60/607,377
(41)	Alm.tilgj	2007.06.01			
(62)	Avdelt fra	20071740, med inndato 2007.04.02			
(71)	Innehaver	Genentech Inc., 1 DNA Way, US-CA94080-4990 SOUTH SAN FRANCISCO, USA			
(72)	Oppfinner	Mark S Dennis, 120 Plymouth, US-CA94070 SAN CARLOS, USA Sherman Fong, 19 Basinside Way, US-CA94502 ALAMEDA, USA			
(74)	Fullmektig	Tandberg Innovation AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge			

(54) Benevnelse **Humaniserte anti-beta7-antagonister og anvendelser av disse**
(57) Sammendrag

Oppfinnelsen tilveiebringer terapeutiske anti-beta7-antistoffer, preparater som omfatter, og fremgangsmåter som benytter disse antistoffene.

P29513NO01-VN

Oppfinnelsens område

Foreliggende oppfinnelse relaterer seg generelt til området for molekylærbiologi og vekstfaktorregulering. Mer spesifikt vedrører oppfinnelsen modulatorer av den biologiske aktiviteten til integriner som inneholder beta7-subenheten og anvendelser av nevnte modulatorer.

Bakgrunn for oppfinnelsen

Integrinene er α/β -heterodimere celleoverflatereseptorer som er involvert i utallige, cellulære prosesser fra celleadhesjon til genregulering (Hynes, R. O., *Cell*, 1992, 69:11-25; og Hemler, M.E., *Annu. Rev. Immunol.*, 1990, 8:365-368). Flere integriner er funnet å være delaktige i sykdomsprosesser og har en generert utbredt interesse som potensielle mål for legemiddeloppdagelse (Sharar, S.R. et al., *Springer Semin. Immunopathol.*, 1995, 16:359-378). I immunsystemet er integriner involvert i leukocytraffikking, adhesjon og infiltrering i løpet av inflammatoriske prosesser (Nakajima, H. et al., *J. Exp. Med.*, 1994, 179:1145-1154). Differensiell uttrykking av integriner regulerer de adderende egenskapene til celler og forskjellige integriner er involvert i ulike inflammatoriske responser. (Butcher, E.C. et al., *Science*, 1996, 272:60-66). Beta7-integrinene (dvs. alfa4beta7 ($\alpha4\beta7$) og alfaEbeta7 ($\alpha E\beta7$)) blir primært uttrykt på monocytter, lymfocytter, eosinofiler, basofiler og makrofager, men ikke på nøytrofiler. Elices, M.J. et al., *Cell*, 1990, 60:577-574). De primære ligandene for $\alpha4\beta7$ -integrin er endotel-overflateproteinenes slimhinneaddressin celleadhesjonsmolekyl (MAdCAM) og vaskulært celleadhesjonsmolekyl (VCAM-1) (Makarem, R. et al., *J. Biol. Chem.*, 1994, 269:4005-4011). Bindingen av $\alpha4\beta7$ til MAdCAM og/eller VCAM som er uttrykt på postkapillære venyler (HEV'er) på steder med inflammasjon fører til kraftig adhesjon av leukocytene til endotelet etterfulgt av inntrengning inn i det betente vevet (Chuluyan, H.E. et al., *Springer Semin. Immunopathol.*, 1995, 16:391-404). En primær ligand for $\alpha4\beta7$ -integrin er intraepitellymfocyt (IEL)-overflateproteinet E-kadherein, som fremmer addering av den $\alpha4\beta7$ -bærende cellen til epitellymfocytter. Monoklonale antistoffer som er rettet mot $\alpha4\beta7$, MAdCAM eller VCAM har blitt vist å være effektive modulatorer i dyremodeller med kronisk inflammatoriske sykdommer slik som astma (Laberge, S. et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1995, 151:822-829), revmatoid artritt (RA; Barbadillo, C. et al., *Springer Semin. Immunopathol.*, 1995, 16:375-379), kolitt (Viney et al., *J. Immunol.*, 1996, 157:2488-2497) og inflammatoriske tarmsykdommer (IBD; Podalski, D.K., *N. Eng. J. Med.*, 1991, 325:928-937; Powrie, F. et al., *Ther. Immunol.*, 1995, 2:115-123). Monoklonale antistoffer som er rettet mot beta7-subenhet har blitt vist å binde integrin-subenheten (Tidswell, M. et al. (1997) *J. Immunol.* 159:1497-1505), men som ikke-humane eller ikke-humaniserte antistoffer mangler de klinisk anvendbarhet.

Det eksisterer et behov for svært spesifikke forbindelser, slik som humaniserte antistoffer eller bindingsfragmenter derav som inhiberer interaksjonen mellom alfa4beta7-integrinet og dens ligander MAdCAM og/eller VCAM i tillegg til interaksjonen mellom alfaEbeta7-integrinet og dens ligand E-kadherin. Disse forbindelsene er nyttige til behandling av kroniske inflammatoriske sykdommer slik som astma, Crohns sykdom, ulcerøs kolitt, diabetes, komplikasjoner ved organtransplantasjon og allograftrelaterte forbindelser.

Beskrivelse av oppfinnelsen

Oppfinnelsen er delvis basert på identifiseringen av en mengde antagonistiske biologiske reaksjonsveier som involverer beta7-inneholdende integriner, som vanligvis er biologiske/cellulære prosesser som viser seg som et viktig og fordelaktig terapeutisk mål. Slike biologiske reaksjonsveier inkluderer inflammasjon, spesielt kroniske inflammatoriske lidelser slik som astma, allergi, IBD, diabetes, transplantasjon og transplantat-mot-vert-forstyrrelser. Oppfinnelsen tilveiebringer sammensetninger og fremgangs-måter som er basert på å forstyrre beta7-integrinmediert, cellulær adhesjon og/eller rekruttering, inkludert å forstyrre MAdCAM og VCAM-1-binding til den ekstracellulære delen av alfa4beta7-integrin og E-kadherininteraksjon med alfaEbeta7-integrininteraksjon. Antagonister ifølge oppfinnelsen, som beskrevet her, tilveiebringer viktige terapeutiske og diagnostiske midler til anvendelse i målsøking av patologiske tilstander som er assosiert med unormal eller uønsket signalisering via et beta7-integrin. Følgelig tilveiebringer oppfinnelsen fremgangsmåter, preparater, sett og fremstilte artikler som vedrører modulering av beta7-integrinmedierte reaksjonsveier, inkludert modulering av MAdCAM-alfa4beta7-binding og leukocyttrekruttering til gastrointestinalepitel, binding og allergi, astma, IBD (slik som Crohns sykdom og ulcerøs kolitt), diabetes, inflammasjon assosiert med transplantasjon, transplantat-mot-vert-forstyrrelser og/eller allograftforstyrrelser og andre biologiske/fysiologiske aktiviteter som er medierte av beta7-integrin.

I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen terapeutiske anti-beta7-midler som er egnede til terapeutisk anvendelse og som er i stand til å utføre varierende grader av forstyrrelse av en beta7-integrinmediert reaksjonsvei. I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen for eksempel et humanisert anti-beta7-antistoff hvor antistoffet som et Fab-fragment i det vesentlige har den samme bindingsaffiniteten til humant beta7 som et murint Fab-fragment som omfatter, består av eller hovedsakelig består av en lett-kjede og tungkjede variabelt domene sekvens som avbildet i fig. 1A og 1B eller fig. 9A og 9B. I en annen utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen et humanisert anti-beta7-antistoff der antistoffet som et Fab-fragment har en bindingsaffinitet til humant beta7 som er lavere, for eksempel minst 3, minst 5, minst 7 eller minst 10 ganger lavere enn dem for et murint Fab-fragment eller rotte-Fab-fragment som omfatter, består av eller hovedsakelig består av en lett-kjede og tungkjede variabelt domene sekvens som er avbildet i fig. 1A og 1B eller variabelt domene sekvensene som er avbildet i fig. 9A og 9B. Alternativt oppviser et

humanisert anti-beta7-antistoff, eller beta7-bindingsfragment derav, ifølge oppfinnelsen monovalent affinitet mot humant beta7, der affiniteten er vesentlig den samme som eller større enn monovalent affinitet mot humant beta7 for et antistoff som omfatter lettjede og tungkjede variable sekvenser som avbildet i fig. 1A (SEKV. ID nr. 10) og/eller fig. 1B (SEKV. ID nr. 11), eller fig. 9A (SEKV. ID nr. 12) og/eller fig. 9B (SEKV. ID nr. 13). Antistoffet eller bindings-fragmentet derav som har stor affinitet mot humant beta7 oppviser en affinitet som er minst 2 ganger, minst 5 ganger, minst 10 ganger, minst 50 ganger, minst 100 ganger, minst 500 ganger, minst 1000 ganger, minst 500 ganger eller minst 10000 ganger høyere enn et antistoff som omfatter lettjede- og tungkjedesekvensene som er avbildet i fig. 1A (SEKV. ID nr. 10) og/eller fig. 1B (SEKV. ID nr. 11) eller fig. 9A (SEKV. ID nr. 12) og/eller fig. 9B (SEKV. ID nr. 13).

I en annen utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen et humanisert anti-beta7-antistoff der antistoffet som et Fab-fragment har en bindingsaffinitet til human beta7 som er større, for eksempel minst 3, minst 5, minst 7, minst 9, minst 10, minst 15, minst 20 eller minst 100 ganger større enn den for et gnager-(slik som rotte eller murint)-Fab-fragment som omfatter, består av eller hovedsakelig består av en lettjede og tungkjede variabel sekvens som avbildet i fig. 1A og fig. 1B. I én utførelsesform har nevnte gnager-Fab-fragment bindingsaffiniteten til et Fab-fragment som omfatter variabelt domenesekvenser fra et rotteantistoff som er betegnet FIB504.64 produsert av hybridomcellelinjen som er deponert hos the American Type Culture Collection med aksjesjonsnr. ATCC HB.293. I en ytterligere utførelsesform har et humanisert Fab-fragment ifølge oppfinnelsen bindingsaffiniteten til et Fab-fragment som omfatter variabel domenesekvenser for et antistoff som er produsert av et hvilket som helst av de humaniserte anti-beta7-antistoffene ifølge oppfinnelsen. Slik som det er veietablert på fagområdet kan bindingsaffinitet for en ligand til sin reseptor bestemmes ved å anvende en hvilken som helst av en rekke av analyser, og bli uttrykt i form av en rekke kvantitative verdier. I én utførelsesform blir følgelig bindingsaffiniteten uttrykt som K_d-verdier og reflekterer iboende bindingsaffinitet (f.eks. med minimerte aviditetseffekter). Vanligvis og foretrukket blir bindingsaffinitet målt *in vitro*, enten i en cellefri eller celleassosiert setting. Som beskrevet i større detalj her kan forskjeller i bindingsaffinitet bli kvantifisert i form av forholdet av bindingsaffinitetsverdien for et humanisert antistoff i Fab-form og bindingsaffinitetsverdien for et referanse/sammenlignings-Fab-antistoff (f.eks. et murint antistoff som har donor hypervariabel region sekvenser), der bindingsaffinitetsverdiene er bestemt under lignende analysebetingelser. I én utførelsesform blir slik forskjell i bindingsaffinitet bestemt som forholdet mellom K_d-verdiene for det humaniserte antistoffet i Fab-form og nevnte referanse/sammenlignings-Fab-antistoff. En hvilket som helst av et antall analyser som er kjent på fagområdet, inkludert de som er beskrevet her, kan bli benyttet for å fremskaffe bindingsaffinitetsmålinger, inkludert for eksempel «Biacore» (Biacore International Ab, Uppsala, Sverige) og ELISA.

I sine ulike aspekter og utførelsesformer er beta7-antagonistantistoffet ifølge oppfinnelsen rettet mot det følgende settet av potensielle krav for denne søknaden: Antistoff som omfatter et anti-beta7-antistoff eller beta7-bindingsfragment derav som omfatter:

- (a) minst én, to, tre, fire eller fem hypervariabel region (HVR)-sekvenser som er valgt fra gruppen som består av:
- (i) HVR-L1 som omfatter sekvens A1-A11, der A1-A11 er RASESVDTYLH (SEKV. ID nr. 1)
 - (ii) HVR-L2 som omfatter sekvens B1-B8, der B1-B8 er KYASQSIG (SEKV. ID nr. 2)
 - (iii) HVR-L3 som omfatter sekvens C1-C9, der C1-C9 er QQGNSLPNT (SEKV. ID nr. 3)
 - (iv) HVR-H1 som omfatter sekvens D1-D10, der D1-D10 er GFFITNNYWG (SEKV. ID nr. 4)
 - (v) HVR-H2 som omfatter sekvens E1-E17, der E1-D17 er GYISYSGSTSYNPSLKS (SEKV. ID nr. 5) og
 - (vi) HVR-H3 som omfatter sekvens F2-F11, der F2-F11 er MTGSSGYFDF (SEKV. ID nr. 6).

I en utførelsesform av polypeptidet eller antistoffet ifølge krav 1 omfatter polypeptidet eller antistoffet minst én variant-HVR, der variant-HVR-sekvensen omfatter modifiseringer i minst én rest med minst én av sekvensene som er avbildet i SEKV. ID nr. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 og 9.

I en annen utførelsesform av krav 1 eller krav 2, omfatter oppfinnelsen et anti-beta7-antistoff eller beta7-bindingsfragment derav som omfatter én, to, tre, fire, fem eller seks hypervariable regioner (HVR'er) som er valgt fra gruppen som består av HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, der:

- (i) HVR-L1 omfatter aminosyresekvens RASESVDTYLH (SEKV. ID nr. 1), RASESVDLHH (SEKV. ID nr. 7), RASESVDLLH (SEKV. ID nr. 8) eller RASESVDLLH (SEKV. ID nr. 9),
- (ii) HVR-L2 som omfatter aminosyresekvens KYASQSIG (SEKV. ID nr. 2), RYASQSIG (SEKV. ID nr. 67 eller XYASQSIG (SEKV. ID nr. 68), der X representerer en hvilken som helst aminosyre),
- (iii) HVR-L3 omfatter QQGNSLPNT (SEKV. ID nr. 3),
- (iv) HVR-H1 omfatter aminosyresekvens GFFITNNYWG (SEKV. ID nr. 4),
- (v) HVR-H2 omfatter aminosyresekvens GYISYSGSTSYNPSLKS (SEKV. ID nr. 5), og
- (vi) HVR-H3 omfatter aminosyresekvens MTGSSGYFDF (SEKV. ID nr. 6) eller RTGSSGYFDF (SEKV. ID nr. 66) for relative posisjoner F2-F11, eller omfatter aminosyresekvens F1-F11, der F1-F11 er AMTGSSGYFDF (SEKV. ID nr. 63), ARTGSSGYFDF (SEKV. ID nr. 64) eller AQTGSSGYFDF (SEKV. ID nr. 65).

I nok en annen utførelsesform av krav 1 eller enhver av utførelsesformene omfatter oppfinnelsen et anti-beta7-antistoff eller beta7-bindingsfragment derav, som omfatter én, to, tre, fire, fem eller seks hypervariable regioner (HVR'er) som er valgt fra gruppen som består av HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, der:

- 5 (i) HVR-L1 omfatter aminosyresekvens A1-A11, der A1-A11 er RASESVDTYLH (SEKV. ID nr. 1), RASESVDLLH (SEKV. ID nr. 7), RASESVDTLH (SEKV. ID nr. 8) eller RASESVDLLH (SEKV. ID nr. 9) eller en variant av SEKV. ID nr. 1, 7, 8 eller 9 der aminosyre A2 er valgt fra gruppen som består av A, G, S, T og V og/eller aminosyre A3 er valgt fra gruppen som består av S, G, I, K, N, P, Q, R og T, og/eller A4 er valgt fra gruppen
10 som består av E, V, Q, A, D, G, H, I, K, L, N og R og/eller aminosyre A5 er valgt fra gruppen som består av V, R, I, A, G, K, L, M og Q) og/eller aminosyre A6 er valgt fra gruppen som består av V, R, I, A, G, K, L, M og Q) og/eller aminosyre A7 er valgt fra gruppen som består av D, V, S, A, E, G, H, I, K, L, N, P, S og T og/eller aminosyre A8 er valgt fra gruppen som består av D, G, N, E, T, P og S og/eller aminosyre A9 er valgt fra gruppen som består av L,
15 Y, I og M og/eller aminosyre A10 er valgt fra gruppen som består av L, A, I, M og V og/eller aminosyre A11 er valgt fra gruppen som består av H, Y, F og S,
- (ii) HVR-L2 omfatter aminosyresekvens B1-B8, der B1-B8 er KYASQSIG (SEKV. ID nr. 2), RYASQSIG (SEKV. ID nr. 67 eller XYASQSIG (SEKV. ID nr. 68) der X representerer en hvilken som helst aminosyre) eller en variant av SEKV. ID nr. 2, 67 eller 68 der aminosyre
20 B1 er valgt fra gruppen som består av K, R, N, V, A, F, Q, H, P, I, L, Y og X (der X representerer en hvilken som helst aminosyre) og/eller aminosyre B4 er valgt fra gruppen som består av S og D og/eller aminosyre B5 er valgt fra gruppen som består av Q og S og/eller aminosyre B6 er valgt fra gruppen som består av S, D, L og R og/eller aminosyre B7 er valgt fra gruppen som består av I, V, E og K,
- 25 (iii) HVR-L3 omfatter aminosyresekvens C1-C9, der C1-C9 er QQGNLPLNT (SEKV. ID nr. 3) eller en variant av SEKV. ID nr. 3 der aminosyre C8 er valgt fra gruppen som består av N, V, W, Y, R, S, T, A, F, H, I, L, M og Y,
- (iv) HVR-H1 omfatter aminosyresekvens D1-D10 der D1-D10 er GFFITNNYWG (SEKV. ID nr. 4),
- 30 (v) HVR-H2 omfatter aminosyresekvens E1-E17 der E1-E17 er GYISYSGSTSYNPSLKS (SEKV. ID nr. 5) eller en variant av SEKV. ID nr. 5 der aminosyre E2 er valgt fra gruppen som består av Y, F, V og D og/eller aminosyre E6 er valgt fra gruppen som består av S og G og/eller aminosyre E10 er valgt fra gruppen som består av S og Y og/eller aminosyre E12 er valgt fra gruppen som består av N, T, A og D og/eller aminosyre
35 13 er valgt fra gruppen som består av P, H, D og A og/eller aminosyre E15 er valgt fra gruppen som består av L og V og/eller aminosyre E17 er valgt fra gruppen som består av S og G, og
- (vi) HVR-H3 omfatter aminosyresekvens F2-F11 der F2-F11 er MTGSSGYFDF (SEKV. ID nr. 6) eller RTGSSGYFDF (SEKV. ID nr. 66) eller omfatter aminosyresekvens F1-F11, der

F1-F11 er AMTGSSGYFDF (SEKV. ID nr. 63), ARTGSSGYFDF (SEKV. ID nr. 64) eller AQTGSSGYFDF (SEKV. ID nr. 65), eller en variant av SEKV. ID nr. 6, 63, 64, 65 eller 66 der aminosyre F2 er R, M, A, E, G, Q, S og/eller aminosyre F11 er valgt fra gruppen som består av F og Y.

5 I én utførelsesform av krav 1 eller ethvert av antistoffene ifølge oppfinnelsen blir aminosyren på tungkjede rammeverksposisjon 71 (ifølge Kabat-nummererings-systemet) kan velges fra gruppen som består av R, A og T og/eller aminosyren på tungkjede rammeverksposisjon 73 (Kabat-nummereringssystem) kan velges fra gruppen som består av N og T og/eller aminosyren på tungkjede rammeverksposisjon 78 (Kabat-nummererings system) kan velkes fra gruppen som består av F, A og L.

I én utførelsesform av krav 1 eller et hvilket som helst av antistoffene ifølge oppfinnelsen omfatter HVR-L1 til et antistoff ifølge oppfinnelsen sekvensen ifølge SEKV. ID nr. 1. I én utførelsesform omfatter HVR-L2 til et antistoff ifølge oppfinnelsen sekvensen ifølge SEKV. ID nr. 2. I én utførelsesform omfatter HVR-L3 til et antistoff ifølge oppfinnelsen sekvensen ifølge SEKV. ID nr. 3. I én utførelsesform omfatter HVR-H1 for et antistoff ifølge oppfinnelsen sekvensen ifølge SEKV. ID nr. 4. I én utførelsesform omfatter HVR-H2 til et antistoff ifølge oppfinnelsen sekvensen ifølge SEKV. ID nr. 5. I én utførelsesform omfatter HVR-H3 til et antistoff ifølge oppfinnelsen sekvensen ifølge SEKV. ID nr. 6 eller 66 for relative posisjoner F2-F11 eller SEKV. ID nr. 63, 64 eller 65, for relative posisjoner F1-F11. I 20 én utførelsesform omfatter HVR-L1 RASESVDSLH (SEKV. ID nr. 7). I én utførelsesform omfatter HVR-L1 RASESVDTLH (SEKV. ID nr. 8). I én utførelsesform omfatter HVR-L1 RASESVDDLH (SEKV. ID nr. 9). I én utførelsesform er et antistoff ifølge oppfinnelsen som omfatter disse sekvensene (i kombinasjoner som beskrevet her) humanisert eller humant.

I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et antistoff som omfatter én, to, tre, fire, 25 fem eller seks HVR'er, der hver HVR omfatter, består av eller hovedsakelig består av en sekvens som er valgt fra gruppen som består av SEKV. ID nr. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 og 9, og der SEKV. ID nr. 1, 7, 8 eller 9 tilsvarer en HVR-L1, SEKV. ID nr. 2 tilsvarer en HVR-L2, SEKV. ID nr. 3 tilsvarer en HVR-L3, SEKV. ID nr. 4 tilsvarer en HVR-H1, SEKV. ID nr. 5 tilsvarer en HVR-H2 og SEKV. ID nr. 6 tilsvarer en HVR-H3. I én utførelsesform omfatter et 30 antistoff ifølge oppfinnelsen HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, der hver i rekkefølge omfatter SEKV. ID nr. 1, 2, 3, 4, 5 og 6. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3), der hver i rekkefølge omfatter SEKV. ID nr. 7, 2, 3, 4, 5 og 6. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3), der 35 hver i rekkefølge omfatter SEKV. ID nr. 8, 2, 3, 4, 5 og 6. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, der hver i rekkefølge omfatter SEKV. ID nr. 9, 2, 3, 4, 5 og 6. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, der hver i rekkefølge omfatter SEKV. ID nr. 9, 2, 3, 4, 5 og 66, eller SEKV. ID nr. 9, 2, 3, 4, 5,

63 eller SEKV. ID nr. 9, 2, 3, 4, 5, 64 eller SEKV. ID nr. 9, 2, 3, 4, 5 og 65 eller SEKV. ID nr. 9, 67, 3, 4, 5, 64 eller SEKV. ID nr. 9, 68, 3, 4, 5, 64).

Variant-HVR'er i et antistoff ifølge oppfinnelsen kan ha modifiseringer på én eller flere rester i HVR'en og HVR'ene og/eller rammeverksregionene kan være humaniserte.

5 Utførelsesformer av oppfinnelsen der det er en HVR- og/eller rammeverksmodifisering inkluderer uten begrensning de følgende potensielle kravene for denne søknaden:

2. Antistoffet ifølge krav 1 eller en hvilket som helst av dens utførelsesformer der A8 i en variant-HVR-L1 er S, D eller T og A9 er L.

10 3. Antistoffet ifølge krav 1 eller en hvilket som helst av dets utførelsesformer der antistoffet er humanisert.

4. Antistoff ifølge krav 1 eller en hvilket som helst av dets utførelsesformer der minst en del av rammeverksekvensen er en human konsensusrammeverksekvens.

5. Antistoffet ifølge krav 1 eller en hvilket som helst av dets utførelsesformer der nevnte modifisering er substitusjon, insersjon eller delesjon.

15 6. Antistoffet ifølge krav 1 eller en hvilket som helst av dets utførelsesformer der en HVR-L1-variant omfatter 1-10 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 eller 10) substitusjoner i en hvilken som helst kombinasjon i de følgende posisjonene: A2 (G, S, T eller V), A3 (G, I, K, N, P, Q, R eller T), A4 (A, D, G, H, I, K, L, N, Q, R eller V), A5 (A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, V eller Y), A6 (A, G, I, K, L, M, Q eller R), A7 (A, E, G, H, I, K, L, N, P, S, T eller V), A8 (S, D, E, G, P

20 eller N) og A9 (L, I eller M), A10 (A, I, M eller V) og A11 (F, S eller Y).

7. Antistoffet ifølge krav 1 eller en hvilket som helst av dets utførelsesformer der en HVR-L2-variant omfatter 1-4 (1, 2, 3 eller 4) substitusjoner i en hvilken som helst kombinasjon på de følgende posisjonene: B1 (N), B5 (S), B6 (R eller L) og B7 (T, E, K eller V).

25 8. Antistoffet ifølge krav 1 eller en hvilket som helst av dets utførelsesformer der en HVR-L3-variant omfatter minst én substitusjon på posisjon C8 (W, Y, R, S, A, F, H, I, L, M, N, T eller V).

9. Antistoffet ifølge krav 1 eller en hvilket som helst av dets utførelsesformer der en HVR-H2-variant omfatter 1-7 (1, 2, 3, 4, 5, 6 eller 7) substitusjonene i en hvilken som helst

30 kombinasjon på de følgende posisjonene: E2 (V, D eller F), E6 (G), E10 (Y), E12 (A, D eller T), E13 (D, A eller H), E15 (V), E17 (G).

10. Antistoffet ifølge krav 1 eller en hvilket som helst av dets utførelsesformer der en HVR-H3-variant omfatter 1 eller 2 substitusjoner i en hvilken som helst kombinasjon på de følgende posisjonene: F2 (A, E, G, Q, R eller S) og F11 (Y).

35 11. Antistoffet ifølge krav 1 eller en hvilket som helst av dets utførelsesformer som omfatter en HVR-L1 som har sekvensen ifølge SEKV. ID nr. 7.

12. Antistoffet ifølge krav 1 eller en hvilket som helst av dets utførelsesformer som omfatter en HVR-L1 som har sekvensen ifølge SEKV. ID nr. 8.

13. Antistoffet ifølge krav 1 eller en hvilket som helst av dets utførelsesformer som omfatter en HVR-L1 som har sekvensen ifølge SEKV. ID nr. 9.

14. Antistoffet ifølge ethvert av kravene 11-13 som omfatter en human tungkjede undergruppe-III-tungkjede konsensus rammeverksekvens som omfatter en substitusjon på
5 posisjon 71, 73 og/eller 78.

15. Antistoffet ifølge krav 14 der substitusjonen er R71A, N73T og/eller N78A.

16. Antistoffet ifølge krav 1 eller en hvilket som helst av dets utførelsesformer som omfatter en HVR-L3 som har sekvensen ifølge SEKV. ID nr. 3.

17. Antistoffet ifølge krav 1 eller en hvilket som helst av dets utførelsesformer der
10 A8 i en variant-HVR-L1 er S.

18. Antistoffet ifølge krav 1 eller en hvilket som helst av dets utførelsesformer der A8 i en variant-HVR-L1 er D.

19. Antistoffet ifølge krav 1 eller en hvilket som helst av dets utførelsesformer der A9 i en variant-HVR-L1 er L.

20. Antistoffet ifølge krav 1 eller en hvilket som helst av dets utførelsesformer der
15 en rammeverksekvens mellom sekvens E1-E17 og F1-F11 er HFR3-1-HFR3-31 og der HFR3-6 er A eller R, HFR3-8 er N eller T, og HFR3-13 er L eller A eller F.

21. Et humanisert anti-beta7-antistoff der monovalent affinitet for antistoffet mot
20 humant beta7 er vesentlig den samme som monovalent affinitet for et rotteantistoff som omfatter en lettkjede- og tungkjedevariabelsekvens som avbildet i fig. 9.

22. Et humanisert anti-beta7-antistoff der monovalent affinitet for antistoffet mot humant beta7 er minst tre ganger høyere enn monovalent affinitet for et rotteantistoff som omfatter en lettkjede- og tungkjede variabelsekvens som avbildet i fig. 9.

23. Det humaniserte antistoff ifølge krav 21 eller 22, der rotteantistoffet er
25 produsert av hybridomcellelinjen som er deponert hos the American Type Culture Collection under aksjonsnummer ATCC med betegnelse HB-293.

24. Antistoffet ifølge en hvilket som helst av kravene 21-23, der bindingsaffiniteten er uttrykt som en Kd-verdi.

25. Antistoffet ifølge en hvilket som helst av kravene 21-24, der bindingsaffiniteten
30 er målt ved hjelp av Biacore™ eller radioimmunanalyse.

26. Antistoffet ifølge krav 1, som omfatter human κ -undergruppe-lettkjede-konsensus-rammeverksekvens.

27. Antistoffet ifølge krav 1, som omfatter human tungkjede undergruppe-III-tungkjede konsensus-rammeverksekvens.

28. Antistoffet ifølge krav 27, der rammeverksekvensen omfatter en substitusjon på
35 posisjon 71, 73 og/eller 78.

29. Antistoffet ifølge krav 28, der nevnte substitusjon er R71A, N73T og/eller N78A eller der den substituerte aminosyren i posisjon 71 er R eller A, og/eller aminosyre-

substitusjonen på posisjon 78 er N eller T og/eller aminosyresubstitusjonen på posisjon 78 er L eller A eller F.

30. Antistoffet ifølge krav 28, der nevnte substitusjon er L78F eller A78F eller A78L eller L78A.

5 31. Fremgangsmåte for å inhibere interaksjonen av en human beta7-integrinsubenhhet med en andre integrinsubenhhet og/eller en ligand ved å kontakte antistoffet ifølge et av kravene 1-30 med den andre integrinsubenhheten og/eller liganden.

32. Fremgangsmåten ifølge krav 31, der den andre integrinsubenhheten er alfa4-integrinsubenhhet og der liganden er MAdCAM, VCAM eller fibronektin.

10 33. Fremgangsmåten ifølge krav 32, der alfa4-integrinsubenhheten er human.

34. Fremgangsmåten ifølge krav 33, der liganden er human.

35. Fremgangsmåten ifølge krav 33, der den andre integrinsubenhheten er alfaE-integrinsubenhhet og der liganden er E-kadherin.

36. Fremgangsmåten ifølge krav 35, der alfaE-integrinsubenhheten er human.

15 37. Fremgangsmåten ifølge krav 36, der liganden er human.

38. Fremgangsmåten ifølge krav 31, der inhiberingen reduserer eller lindrer symptomer på en forstyrrelse som er valgt fra inflammasjon, astma, inflammatorisk tarmsykdom, Crohns sykdom, ulcerøs kolitt, diabetes, inflammasjon som skyldes organtransplantasjon, transplantat versus vertssykdom og inflammasjon som er assosiert med allograftforstyrrelser.

Ytterligere utførelsesformer av oppfinnelsen inkluderer de følgende:

I én utførelsesform er en HVR-L1 SEKV. ID nr. 1, 7, 8 eller 9 eller en HVR-L1-variant av SEKV. ID nr. 1, 7, 8 eller 9 som omfatter 1-10 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 eller 10) substitusjoner på relative posisjoner A1-A11, i enhver kombinasjon av de følgende
 25 posisjonene: A2 (A, G, S, T eller V), A3 (S, G, I, K, N, P, Q, R eller T), A4 (E, A, D, G, H, I, K, L, N, Q, R eller V), A5 (S, A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, V eller Y), A6 (V, A, G, I, K, L, M, Q eller R), A7 (D, A, E, G, H, I, K, L, N, P, S, T eller V), A8 (T, S, D, E, G, T eller N) og A9 (Y, L, I eller M), A10 (L, A, I, M eller V) og A11 (H, F, S eller Y). I én utførelsesform er HVR-L2 SEKV. ID nr. 2, 67 eller 68 eller en HVR-L2-variant av SEKV. ID nr. 2, 67 eller 68 der HVR-
 30 L2-varianten omfatter 1-4 (1, 2, 3, 4 eller 5) substitusjoner på relative posisjoner B1-B8, i enhver kombinasjon av de følgende posisjonene: B1 (K, R, N, V, A, F, Q, H, P, I, L, Y eller X (der X representerer en hvilken som helst aminosyre), B4 (S), B5 (Q eller S), B6 (S, R eller L), og B7 (I, T, E, K eller V). I én utførelsesform er en HVR-L3 SEKV. ID nr. 3 eller en HVR-L3-variant av SEKV. ID nr. 3 som omfatter minst én substitusjon på relative posisjoner C1-
 35 C8 slik som på posisjon C8 (W, Y, R, S, A, F, H, I, L, M, N, T eller V). I én utførelsesform er en HVR-H1 SEKV. ID nr. 4. I én utførelsesform er HVR-H2 SEKV. ID nr. 5 eller en HVR-H2-variant av SEKV. ID nr. 5 der HVR-H2-varianten omfatter 1-7 (1, 2, 3, 4, 5, 6 eller 7) substitusjoner på relative posisjoner E1-E17 i enhver kombinasjon av de følgende posisjonene: E2 (Y, V, D eller F), E6 (S eller G), E10 (S eller Y), E12 (N, A, D eller T), E13

(P, D, A eller H), E15 (L eller V), E17 (S eller G). I én utførelsesform er en HVR-H3 SEKV. ID nr. 6, 63, 64, 65 eller 66 eller en HVR-H3-variant av SEKV. ID nr. 6, 63, 64, 65 eller 66 som på relative posisjoner F1-F11 omfatter for SEKV. ID nr. 63, 64 og 65 eller på relative posisjoner F2-F11 for SEKV. ID nr. 6 og 66, 1 eller 2 substitusjoner i enhver kombinasjon på de følgende posisjonene: F2 (M, A, E, G, Q, R eller S), og F11 (F eller Y). Bokstaver i parenteser etter hver posisjon indikerer en illustrerende substitusjonsamino syre (dvs. erstatning) for en konsensusamino syre eller annen amino syre slik det er åpenbart for fagfolk på området, og hensiktsmessighet for andre amino syrer som substitusjonsamino syrer i konteksten som er beskrevet her kan rutinemessig bli vurdert ved å benytte teknikker som er kjent på fagområdet og/eller som er beskrevet her.

I én utførelsesform omfatter en HVR-L1 sekvensen ifølge SEKV. ID nr. 1. I én utførelsesform er A8 i en variant-HVR-L1 D. I én utførelsesform er A8 i en variant-HVR-L1 S. I én utførelsesform er A9 i en variant-HVR-L1 L. I én utførelsesform er A8 i en variant-HVR-L1 D og A9 er i en variant-HVR-L1 L. I én utførelsesform er A8 i en variant-HVR-L1 S og A9 er i en variant-HVR-L1 L. I noen utførelsesformer av oppfinnelsen omfatter disse variasjonene i HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3 omfatter eller består av eller består hovedsakelig av, i rekkefølge, SEKV. ID nr. 2, 3, 4, 5 og 6. I noen utførelsesformer omfatter eller består eller består essensielt HVR-H3 av SEKV. ID nr. 6 eller 66 (for relativ posisjoner F2-F11) eller SEKV. ID nr. 63 eller 64 eller 65 (for relative posisjoner F1-F11).

I én utførelsesform er A8 i en variant-HVR-L1 I og A9 er L i en variant-HVR-L1, hvor varianten ytterligere omfatter HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, der hver HVR omfatter, består av eller hovedsakelig består av, i rekkefølge, SEKV. ID nr. 2, 3, 4, 5 og 6.

I én utførelsesform er A8, A9 og A10 i en variant-HVR-L1 henholdsvis D, L og V, der varianten ytterligere omfatter HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, der hver HVR omfatter, består av eller består essensielt av, i rekkefølge, SEKV. ID nr. 2, 3, 4, 5 og 6.

I én utførelsesform er A8 og A9 i en variant-HVR-L1 henholdsvis N og L, der varianten ytterligere omfatter HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, der hver HVR omfatter, består av eller består essensielt av, i rekkefølge, SEKV. ID nr. 2, 3, 4, 5 og 6.

I én utførelsesform er A8 og A9 i en variant-HVR-L1 henholdsvis P og L, og B6 og B7 er i en variant-HVR-L2 henholdsvis R og T, der varianten ytterligere omfatter HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, der hver HVR omfatter, består av eller hovedsakelig består av, i rekkefølge, SEKV. ID nr. 3, 4, 5 og 6.

I én utførelsesform er A2, A4, A8, A9 og A10 i en variant-HVR-L1 henholdsvis S, D, S, L og V, der varianten ytterligere omfatter HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, der hver HVR omfatter, består av eller hovedsakelig består av, i rekkefølge, SEKV. ID nr. 2, 3, 4, 5 og 6.

I én utførelsesform er A5 og A9 i en variant-HVR-L1 henholdsvis D og T, der varianten ytterligere omfatter HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, der hver HVR omfatter, består av eller hovedsakelig består av, i rekkefølge, SEKV. ID nr. 2, 3, 4, 5 og 6.

I én utførelsesform er A5 og A9 i en variant-HVR-1 henholdsvis N og L, der varianten ytterligere omfatter HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, der hver HVR omfatter, består av eller hovedsakelig består av, i rekkefølge, SEKV. ID nr. 2, 3, 4, 5 og 6.

I én utførelsesform er A9 i en variant-HVR-L1 L, der varianten ytterligere omfatter HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, der hver HVR omfatter, består av eller hovedsakelig består av, i rekkefølge, SEKV. ID nr. 2, 3, 4, 5 og 6.

I én utførelsesform omfatter antistoffet eller anti-beta7-bindende polypeptider ifølge oppfinnelsen omfatter en HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, der hver HVR omfatter, består av eller hovedsakelig består av, i rekkefølge, SEKV. ID nr. 9, 2, 3, 4, 5 og 64. I en annen utførelsesform omfatter, består av eller essensielt består hver HVR av, i rekkefølge, SEKV. ID nr. 9, 67, 3, 4, 5 og 64. I en annen utførelsesform omfatter, består eller essensielt består hver HVR av, i rekkefølge, SEKV. ID nr. 9, 68, 3, 4, 5 og 64. I en annen utførelsesform består, omfatter eller essensielt består hver HVR av, i rekkefølge, SEKV. ID nr. 9, 2 eller 67 eller 68, 3, 4, 5 og 66.

I noen utførelsesformer omfatter nevnte variant-HVR-L1-antistoffvariant ytterligere omfatter HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, der hver omfatter, i rekkefølge, sekvensen som er avbildet i SEKV. ID nr. 2, 3, 4, 5 og 6. Der antistoffvarianten omfatter HVR-L1, A8(P) og A9(L) og HVR-L2 B6(R) og B7(T), omfatter nevnte HVR-L1, HVR-L2-variant ytterligere HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, der hver i rekkefølge omfatter sekvensen som er avbildet i SEKV. ID nr. 3, 4, 5 og 6.

I noen utførelsesformer omfatter disse antistoffene ytterligere en human undergruppe-III-tungkjede rammeverk-konsensussekvens. I én utførelsesform av disse antistoffene omfatter rammeverk-konsensussekvensen substitusjon på posisjon 71, 73 og/eller 78. I noen utførelsesformer av disse antistoffene er posisjon 71 A, 73 er T og/eller 78 er A. I én utførelsesform av disse antistoffene omfatter disse antistoffene ytterligere en human κ I-lettkjede rammeverk-konsensussekvens.

I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en HVR-L1 som omfatter SEKV. ID nr. 1. I én utførelsesform omfatter et variantantistoff ifølge oppfinnelsen en variant-HVR-L1 der A10 er V. I én utførelsesform omfatter nevnte variantantistoff ytterligere HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, der hver i rekkefølge omfatter sekvensen som er avbildet i SEKV. ID nr. 2, 3, 4, 5 og 6. I noen utførelsesformer omfatter disse antistoffene ytterligere en human undergruppe-III-tungkjede rammeverk-konsensussekvens. I én utførelsesform av disse antistoffene omfatter rammeverk-konsensussekvensen substitusjon på posisjon 71, 73 og/eller 78. I noen utførelsesformer av disse antistoffene er posisjon 71 A, 73 er T og/eller 78 er A. I én utførelsesform av disse

antistoffene omfatter disse antistoffene ytterligere en human κ I-lettkjede-rammeverk-konsensussekvens.

I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en HVR-L3 som omfatter SEKV. ID nr. 3. I én utførelsesform omfatter et variantantistoff ifølge oppfinnelsen en variant-HVR-L3 der C8 er L. I én utførelsesform omfatter nevnte variantantistoff ytterligere HVR-L1, HVR-L2, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, der hver i rekkefølge omfatter sekvensen som er avbildet i SEKV. ID nr. 1, 2, 4, 5 og 6. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en variant-HVR-L3 der C8 er W. I én utførelsesform omfatter nevnte variantantistoff ytterligere HVR-L1, HVR-L2, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, der hver i rekkefølge omfatter sekvensen som er avbildet i SEKV. ID nr. 1, 2, 4, 5 og 6. I noen utførelsesformer omfatter HVR-L1 SEKV. ID nr. 7, 8 eller 9. I noen utførelsesformer omfatter disse antistoffene ytterligere en human undergruppe-III-tungkjede-rammeverk-konsensussekvens. I én utførelsesform av disse antistoffene omfatter konsensus-rammeverksekvensen substitusjon på posisjon 71, 73 og/eller 78. I noen utførelsesformer av disse antistoffene er posisjon 71 A, 73 er T og/eller 78 er A. I én utførelsesform av disse antistoffene omfatter disse antistoffene ytterligere en human κ I-lettkjede-rammeverk-konsensussekvens.

I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en HVR-H3 som omfatter SEKV. ID nr. 6. I én utførelsesform omfatter en variant av nevnte antistoff en variant-HVR-H3 der F1 er Q. I én utførelsesform omfatter nevnte variantantistoff ytterligere HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 og HVR-H2), der hver i rekkefølge omfatter sekvensen som er avbildet i SEKV. ID nr. 1, 2, 3, 4 og 5. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en variant-HVR-H3 der F1 er R. I én utførelsesform omfatter nevnte variantantistoff ytterligere HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 og HVR-H2, der hver rekkefølge omfatter sekvensen som er avbildet i SEKV. ID nr. 1, 2, 3, 4 og 5. I én utførelsesform omfatter HVR-L1 SEKV. ID nr. 7, 8 eller 9. I noen utførelsesformer omfatter disse antistoffene ytterligere en human undergruppe-III-tungkjede-rammeverk-konsensussekvens. I én utførelsesform av disse antistoffene omfatter ramme-verks-konsensussekvensen substitusjon på posisjon 71, 73 og/eller 78. I noen utførelsesformer av disse antistoffene er posisjon 71 A, 73 er T og/eller 78 er A. I én utførelsesform av disse antistoffene omfatter disse antistoffene ytterligere en human κ I-lettkjede-rammeverk-konsensussekvens.

I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en HVR-L1 som omfatter SEKV. ID nr. 1. I én utførelsesform omfatter antistoffet en variant-HVR-L1 der A4 er Q. I én utførelsesform omfatter nevnte variantantistoff ytterligere HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, der hver rekkefølge omfatter sekvensen som er avbildet i SEKV. ID nr. 2, 3, 4, 5 og 6. I én utførelsesform omfatter antistoffet ifølge oppfinnelsen en variant-HVR-L1 der A6 er I. I én utførelsesform omfatter nevnte variantantistoff ytterligere HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, der hver i rekkefølge omfatter sekvensen som er avbildet i

SEKV. ID nr. 2, 3, 4, 5 og 6. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en variant-HVR-L1 der A7 er S. I én utførelsesform omfatter nevnte variantantistoff ytterligere HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, der hver i rekkefølge omfatter sekvensen som er avbildet i SEKV. ID nr. 2, 3, 4, 5 og 6. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en variant-HVR-L1 der A8 er D eller N. I én utførelsesform omfatter nevnte variantantistoff ytterligere HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, der hver i rekkefølge omfatter sekvensen som er avbildet i SEKV. ID nr. 2, 3, 4, 5 og 6. I noen utførelsesformer omfatter disse antistoffene ytterligere en human undergruppe-III-tungkjede-rammeverk-konsensussekvens. I én utførelsesform av disse antistoffene omfatter rammeverk-konsensussekvensen substitusjon på posisjon 71, 73 og/eller 78. I noen utførelsesformer av disse antistoffene er posisjon 71 A, 73 er T og/eller 78 er A. I én utførelsesform av disse antistoffene omfatter disse antistoffene ytterligere en human κ I-lettkjede-rammeverk-konsensussekvens.

I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en HVR-L2 som omfatter SEKV. ID nr. 2. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en variant-HVR-L2 der B1 er N. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en variant-HVR-L2 der B5 er S. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en variant-HVR-L2 der B6 er L. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en variant-HVR-L2 der B7 er V. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en variant-HVR-L2 der B7 er E eller K. I noen utførelsesformer omfatter nevnte variantantistoff ytterligere HVR-L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, der hver i rekkefølge omfatter sekvensen som er avbildet i SEKV. ID nr. 1, 3, 4, 5 og 6. I noen utførelsesformer omfatter HVR-L1 SEKV. ID nr. 7, 8 eller 9. I noen utførelsesformer omfatter disse antistoffene ytterligere en human undergruppe-III-tungkjede-rammeverk-konsensussekvens. I én utførelsesform av disse antistoffene omfatter rammeverk-konsensussekvensen substitusjon på posisjon 71, 73 og/eller 78. I noen utførelsesformer av disse antistoffene er posisjon 71 A, 73 er T og/eller 78 er A. I én utførelsesform av disse antistoffene omfatter disse antistoffene ytterligere en human κ I-lettkjede-rammeverk-konsensussekvens.

I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en HVR-L3 som omfatter SEKV. ID nr. 3. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en variant-HVR-L3 der C8 er W, Y, R eller S. I noen utførelsesformer omfatter nevnte variantantistoff ytterligere HVR-L1, HVR-L2, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, der hver i rekkefølge omfatter sekvensen som er avbildet i SEKV. ID nr. 1, 2, 4, 5 og 6. I noen utførelsesformer omfatter HVR-L1 SEKV. ID nr. 7, 8 eller 9. I noen utførelsesformer omfatter disse antistoffene ytterligere en human undergruppe-III-tungkjede-rammeverk-konsensussekvens. I én utførelsesform av disse antistoffene omfatter rammeverk-konsensussekvensen substitusjon på posisjon 71, 73 og/eller 78. I noen utførelsesformer av disse antistoffene er posisjon 71 A, 73 er T og/eller 78 er A. I én utførelsesform av disse antistoffene omfatter disse antistoffene ytterligere en human κ I-lettkjede-rammeverk-konsensussekvens.

I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en HVR-H2 som omfatter SEKV. ID nr. 5. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en variant-HVR-H2 der E2 er F. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en variant-HVR-H2 der E2 er V eller D. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en variant-HVR-H2 der E6 er G. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en variant-HVR-H2 der E10 er Y. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en variant-HVR-H2 der E12 er A, D eller T. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en variant-HVR-H2 der E13 er D, A eller N. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en variant-HVR-H2 der E15 er V. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en variant-HVR-H2 der E17 er G. I noen utførelsesformer omfatter nevnte variantantistoff ytterligere HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 og HVR-H3, der hver i rekkefølge omfatter sekvensen som er avbildet i SEKV. ID nr. 1, 2, 3, 4 og 6. I noen utførelsesformer omfatter HVR-L1 SEKV. ID nr. 7, 8 eller 9. I noen utførelsesformer omfatter disse antistoffene ytterligere en human undergruppe-III-tungkjederammeverk-konsensussekvens. I én utførelsesform av disse antistoffene omfatter rammeverk-konsensussekvensen substitusjon på posisjon 71, 73 og/eller 78. I noen utførelsesformer av disse antistoffene er posisjon 71 A, 73 er T og/eller 78 er A. I én utførelsesform av disse antistoffene omfatter disse antistoffene ytterligere en human κ I-lettkjederammeverk-konsensussekvens.

I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en HVR-H3 som omfatter SEKV. ID nr. 6. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en variant-HVR-H3 der F11 er Y. I noen utførelsesformer omfatter nevnte variantantistoff ytterligere HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 og HVR-H3, der hver i rekkefølge omfatter sekvensen som er avbildet i SEKV. ID nr. 1, 2, 3, 4 og 6. I noen utførelsesformer omfatter HVR-L1 SEKV. ID nr. 7, 8 eller 9. I noen utførelsesformer omfatter disse antistoffene ytterligere en human undergruppe-III-tungkjederammeverkskonsensussekvens. I én utførelsesform av disse antistoffene omfatter rammeverkskonsensussekvensen substitusjon på posisjon 71, 73 og/eller 78. I noen utførelsesformer av disse antistoffene er posisjon 71 A, 73 er T og/eller 78 er A. I én utførelsesform av disse antistoffene omfatter disse antistoffene ytterligere en human κ I-lettkjederammeverkskonsensussekvens.

I noen utførelsesformer omfatter disse antistoffene ytterligere en human undergruppe-III-tungkjederammeverkskonsensussekvens. I én utførelsesform av disse antistoffene omfatter rammeverkskonsensussekvensen substitusjon på posisjon 71, 73 og/eller 78. I noen utførelsesformer av disse antistoffene er posisjon 71 A, 73 er T og/eller 78 er A. I én utførelsesform av disse antistoffene omfatter disse antistoffene ytterligere en human κ I-lettkjederammeverkskonsensussekvens.

Et terapeutisk middel til anvendelse i et vertsindivid utløser fortrinnsvis lite til ingen immunogen respons mot midlet i nevnte individ. I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen et slikt middel. I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen for eksempel et

humanisert antistoff som utløser og/eller er forventet å utløse en human anti-gnager-antistoffrespons (slik som anti-muse- eller anti-rotterrespons) eller en human anti-humanrespons ved et vesentlig redusert nivå sammenlignet med et antistoff som omfatter sekvensen som omfatter SEKV. ID nr. 10 og/eller 11 (fig. 1A og 1B) eller SEKV. ID nr. 12 og/eller 13 (fig. 9A og 9B som avbilder rotte-anti-muse-Fib504-aminosyresekvenser) hos et vertsindivid. I et annet eksempel tilveiebringer oppfinnelsen et humanisert antistoff som utløser og/eller som er forventet å utløse ingen human anti-gnager (slik som human anti-muse (HAMA) eller human anti-muse) eller human anti-human antistoffrespons (HAAH).

Et humanisert antistoff ifølge oppfinnelsen kan omfatte én eller flere humane og/eller humane konsensus-ikke-hypervariabel region (f.eks. rammeverk)-sekvenser på sitt tungkjede og/eller lett kjede variabelt domene. I noen utførelsesformer foreligger én eller flere ytterligere modifiseringer i de humane og/eller humane konsensus-ikke-hypervariabelregion sekvensene. I én utførelsesform omfatter tungkjede variabelt domene til et antistoff ifølge oppfinnelsen en human konsensus-rammeverksekvens, som i én utførelsesform er undergruppe-III-konsensus-rammeverkssekvensen. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en variant undergruppe-III-konsensus-rammeverkssekvens som er modifisert for minst én aminosyreposisjon. I én utførelsesform kan for eksempel en variant-undergruppe-III-konsensus-rammeverkssekvens omfatte en substitusjon på én eller flere av posisjonene 71, 73, 78 og/eller 94. I én utførelsesform er nevnte substitusjon R71A, N73T, L78A og/eller R94M, i enhver kombinasjon derav.

Slik det er kjent på fagområdet, og slik det i mer inngående detalj er beskrevet her, så kan aminosyre-posisjonen/grensen som avgrenser en hyper-variabelregion for et antistoff variere avhengig av konteksten og de ulike definisjoner som er kjent på fagområdet (som beskrevet nedenfor). Noen posisjoner på et variabeldomene kan bli sett på som hybrid hypervariabel posisjoner ved at disse posisjonene kan bli ansett som å være innenfor en hypervariabel region under et sett med kriterier mens de kan bli ansett for å ligge på utsiden av en hypervariabel region under et ulikt sett med kriterier. En eller flere av disse posisjonene kan også bli funnet i utvidede hypervariable regioner (som ytterligere definert nedenfor). Oppfinnelsen tilveiebringer antistoffer som omfatter modifiseringer på disse hybride hypervariable posisjonene. I én utførelsesform inkluderer disse hybride hypervariable posisjonene én eller flere av posisjonene 26-30, 33-35B, 47-49, 49, 57-65, 93, 94 og 102 på et tungkjede variabelt domene. I én utførelsesform inkluderer disse hybride hypervariable posisjonene én eller flere av posisjonene 24-29, 35-36, 46-49, 49, 56 og 97 på lett kjede variabelt domene. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en human variant undergruppe konsensus-rammeverkssekvens som er modifisert på én eller flere hybrid hypervariable posisjoner. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen et tungkjede variabelt domene som omfatter en human variant undergruppe-III-konsensus-rammeverkssekvens som er modifisert på én eller flere av posisjonene 28-35, 49, 50, 52a, 53, 54, 58-61, 63, 65, 94 og 102. I én utførelsesform

omfatter antistoffet en T28F, F29I, S30T, S31N, Y32N, A33Y, M34W og S35G substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en S49G-substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en V50F- eller F50D- eller V50Y-substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en G53Y-substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en G54S-
 5 substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en Y58F-substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en A60N- eller A60D- eller A60T-substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en D61P- eller D61A- eller D61H-substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en V63L-substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en G65S-substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en R94M-
 10 substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en R94A- eller R94- eller R94G- eller R94Q- eller R94S-substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en G95P-substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet én eller flere av substitusjonene på posisjonene 28-35, 49, 50, 52a, 53, 54, 58-61, 63, 65, 94 og 102 og omfatter ytterligere én eller flere av substitusjonene på posisjonene R71A eller N73T eller L78A eller L78F. I én
 15 utførelsesform omfatter antistoffet en Y102F-substitusjon. Med referanse til fig. 1B kan det bli sett at disse substitusjonene foreligger i HVR-H1, HVR-H2 og/eller HVR-H3 i den tunge kjeden.

I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen et lettkjede variabelt domene som omfatter en human variantundergruppe-I-konsensusrammeverkssekvens som
 20 er modifisert på én eller flere av posisjonene 27, 29-31, 33, 34, 49, 50, 53-55, 91 og 96. I én utførelsesform omfatter antistoffet en Q27E-substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en I29V-substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en S30D-substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en N31T- eller N31S- eller N31D-substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en Y32L-substitusjon. I én
 25 utførelsesform omfatter antistoffet en A34H-substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en Y49K-substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en A50Y-substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en S53Q-substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en L54S-substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en E55I- eller E55V-substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en
 30 Y91G-substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en W96N- eller W96L-substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en A25S-substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en A25-substitusjon til G, S, T eller V. I én utførelsesform omfatter antistoffet en modifisering som er valgt fra én eller flere av de følgende gruppene med substitusjoner. I én utførelsesform omfatter f.eks. antistoffet en S26-substitusjon til G,
 35 I, K, N, P, Q eller T. I én utførelsesform omfatter antistoffet en Q27-substitusjon til E, A, D, G, H, I, K, L, N, Q, R eller V. I én utførelsesform omfatter antistoffet en S28-substitusjon til A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, V eller Y. I én utførelsesform omfatter antistoffet en I29-substitusjon til V, A, G, K, L, M, Q eller R. I én utførelsesform omfatter antistoffet en S30-substitusjon til D, A, E, G, H, I, K, L, N, P, S, T eller V. I én utførelsesform omfatter

antistoffet en N31-substitusjon til D, T, E eller G. I én utførelsesform omfatter antistoffet en Y32-substitusjon til L, I eller M. I én utførelsesform omfatter antistoffet en L33-substitusjon til A, I, M eller V. I én utførelsesform omfatter antistoffet en A34-substitusjon til H, F, Y eller S. I én utførelsesform omfatter antistoffet en Y49-substitusjon til K eller N. I én

5 utførelsesform omfatter antistoffet en A50Y-substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en S53Q-substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en L54S-substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en E55-substitusjon til V, I eller K. I én utførelsesform omfatter antistoffet en Y91G-substitusjon. I én utførelsesform omfatter antistoffet en W96-substitusjon til N, L, W, Y, R, S, A, F, H, I, M, N, R, S, T, V eller Y. Med

10 referanse til fig. 1A kan det bli observert at disse substitusjonene ligger i HVR-L1, HVR-L2 og/eller HVR-L3 i den lette kjeden.

Et antistoff ifølge oppfinnelsen kan omfatte enhver passende, human eller human konsensuslettkjede-rammeverksekvens, gitt at antistoffet oppviser de ønskede, biologiske karakteristika (f.eks. en ønsket bindingsaffinitet). I én utførelsesform omfatter et antistoff

15 ifølge oppfinnelsen minst en del (eller hele) av rammeverksekvensen til human κ -lettkjede. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen minst en del (eller hele) av human κ -undergruppe-I-rammeverk-konsensussekvens.

I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen et tungkjede- og/eller lettkjede variabelt domene som omfatter rammeverksekvenser som er avbildet i SEKV. ID

20 nr. 34-41 og i fig. 1, 7 og 8, gitt at posisjon 49 på lettkjeden og 94 på tungkjeden er inkludert i de utvidede HVR'ene og gitt at nevnte posisjon 49 er K og at nevnte posisjon 94 fortrinnsvis men ikke nødvendigvis er M og kan være R.

Antagonister ifølge oppfinnelsen kan bli benyttet til å modulere ett eller flere aspekter av beta7-assosierte effekter, inkludert assosiering med alfa4-integrinsubenheter,

25 assosiering med alfaE-integrinsubenheter, binding av alfa4beta7-integrin til MAdCAM, VCAM-1 eller fibronektin og binding av alfaEbeta7-integrin til E-kadherin. Disse effektene kan bli modulert ved hjelp av enhver biologisk relevant mekanisme, inkludert ødeleggelse av ligandbinding til beta7-subenhet eller til alfa4beta7 eller alfaEbeta7-dimert integrin og/eller ødelegge assosiering mellom alfa- og beta-integrinsubenheter slik at dannelse av det

30 dimere integrinet blir inhibert. I én utførelsesform tilveiebringer dermed oppfinnelsen et beta7-antagonistantistoff som inhiberer binding av alfa4 til beta7. I én utførelsesform ødelegger et beta7-antagonistantistoff ifølge oppfinnelsen binding av alfa4beta7 til MAdCAM. I én utførelsesform ødelegger et beta7-antagonistantistoff ifølge oppfinnelsen binding av alfa4beta7 til VCAM-1. I én utførelsesform ødelegger et beta7-antagonistantistoff bindingen

35 av alfa4beta7 til fibronektin. I én utførelsesform ødelegger et beta7-antagonistantistoff ifølge oppfinnelsen binding av beta7 til alfaE. I én utførelsesform ødelegger et beta7-antagonistantistoff ifølge oppfinnelsen binding av alfaEbeta7-integrin til E-kadherin. Interferens kan være direkte eller indirekte. Et beta7-antagonistantistoff kan for eksempel binde til beta7 på en sekvens i alfa4beta7- eller alfaEbeta7-dimeriseringsregionen og dermed inhibere

interaksjon for integrinsubenheterne og dannelse av en integrindimer. I et ytterligere eksempel kan et beta7-antagoniststoff binde til en sekvens på ligandbindingsdomenet til beta7-subenhet og derved inhibere interaksjon av nevnte bundne domene med sin bindingspartner (slik som fibronektin, VCAM og/eller MAdCAM for alfa4beta7-integrin, eller E-kadherin for alfaEbeta7-integrin). I et annet eksempel kan et beta7-antagoniststoff binde til en sekvens som ikke ligger på integrinsubenhetsdimeriseringsdomenet eller et ligandbindingsdomene, men der nevnte beta7-antagoniststoffbinding fører til ødeleggelse av evnen for beta7-domenet til å interagere med sin bindingspartner (slik som en alfa4- eller alfaE-integrinsubenhet og/eller en ligand slik som fibronektin, VCAM, MAdCAM eller E-kadherin). I én utførelsesform binder et antagoniststoff ifølge oppfinnelsen til beta7 (for eksempel det ekstracellulære domenet) slik at beta7-dimerisering med alfa4- eller alfaE-subenheten blir ødelagt. I én utførelsesform binder et antagoniststoff ifølge oppfinnelsen til beta7 slik at evnen for beta7 og/eller et alfa4beta7- og/eller et alfaEbeta7-integrin i å binde til sin respektive ligand eller ligander bli ødelagt. I én utførelsesform tilveiebringer for eksempel oppfinnelsen et antagoniststoff som ved binding til et beta7-molekyl inhiberer dimerisering av nevnte molekul. I én utførelsesform binder et beta7-antagoniststoff ifølge oppfinnelsen spesifikt til en sekvens på ligandbindingsdomenet til beta7. I én utførelsesform binder et beta7-antagoniststoff ifølge oppfinnelsen spesifikt til en sekvens på ligandbindingsdomene til beta7 slik at ligandbinding (dvs. fibronektin, VCAM og/eller MAdCAM) til alfa4beta7-integrinet blir ødelagt. I én utførelsesform binder et beta7-antagoniststoff ifølge oppfinnelsen spesifikt til en sekvens på ligandbindingsdomenet til beta7 slik at ligandbinding (dvs. E-kadherin) til alfaEbeta7-integrinet blir ødelagt.

I én utførelsesform ødelegger et antagoniststoff ifølge oppfinnelsen beta7-dimerisering som omfatter heterodimerisering (dvs. beta7-dimerisering med et alfa4- eller alfaE-integrinsubenhetsmolekyl).

I én utførelsesform binder et antagoniststoff ifølge oppfinnelsen en epitop på beta7-integrinsubenheten som er kartlagt til aminosyrene 176-237. I en annen utførelsesform binder et antagoniststoff ifølge oppfinnelsen til den samme epitopen på beta7-integrinet som vesentlig er den samme epitopen som Fib504.64 (ATCC HB-293). Bestemmelse av epitopbinding blir utført ved standardteknikker inkludert konkurransebindingsanalyse.

I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et antistoff som omfatter en kombinasjon av én, to, tre, fire, fem eller alle HVR-sekvensene som er avbildet i tabellen med aminosyre-substitusjoner i fig. 13.

Et terapeutisk middel til anvendelse hos et vertsendivid utløser fortrinnsvis lite eller ingen immunogen respons mot midlet hos nevnte individ. I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen et slikt middel. I én utførelsesform tilveiebringer for eksempel oppfinnelsen et humanisert antistoff som utløser og/eller er forventet å utløse en human anti-rotte- eller human anti-muse- eller human anti-human-antistoffrespons ved vesentlig redusert nivå

sammenlignet med et antistoff som omfatter sekvensen ifølge SEKV. ID nr. 10, 11, 12 og/eller SEKV. ID nr. 13 (rotte-anti-muse-Fib504 (ATCC HB-293), fig. 1 og 9) hos et vertsendivid. I et annet eksempel tilveiebringer oppfinnelsen et humanisert antistoff som utløser og/eller er forventet å utløse ingen human anti-muse-, human anti-rotte- eller human anti-human-antistoffrespons.

Et humanisert antistoff ifølge oppfinnelsen kan omfatte én eller flere humane og/eller humane konsensus-ikke-hypervariabel region (f.eks. rammeverk)-sekvenser på sitt tungkjede- og/eller lettkjede variable domene. I noen utførelsesformer foreligger én eller flere ytterligere modifiseringer på de humane og/eller humane konsensus-ikke-hypervariabel regionsekvensene. I én utførelsesform omfatter det tungkjede variable domenet til et antistoff ifølge oppfinnelsen en human konsensusrammeverksekvens, som i én utførelsesform er undergruppe-III-konsensusrammeverksekvensen. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en variantundergruppe-III-konsensus-rammeverksekvens som er modifisert på minst én aminosyreposisjon. I én utførelsesform kan for eksempel en variantundergruppe-III-konsensusrammeverksekvens omfatte en substitusjon på én eller flere av posisjonene 71, 73, 78 og/eller 94, selv om posisjon 94 er en del av en utvidet tungkjedehypervariabel region-H3 ifølge foreliggende oppfinnelse. I én utførelsesform er nevnte substitusjon R71A, N73T, N78A og/eller R94M, i enhver kombinasjon derav.

Et antistoff ifølge oppfinnelsen kan omfatte enhver passende human eller human konsensuslettkjede-rammeverksekvens, gitt at antistoffet oppviser de ønskede, biologiske karakteristika (f.eks. en ønsket bindingsaffinitet). I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen minst en del av (eller hele) rammeverksekvensen for human κ -lettkjede. I én utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen minst en del av (eller hele) human κ -undergruppe-I-rammeverk-konsensussekvens.

Antagonister ifølge oppfinnelsen kan bli benyttet til å modulere ett eller flere aspekter av beta7-assosierte effekter. Et beta7-antagonistantistoff kan for eksempel binde til beta7 på en sekvens i alfa4beta7- eller alfaEbeta7-dimeriseringsregionen og derved inhibere interaksjon av integrinsubenheter og dannelsen av en integrindimer. I et ytterligere eksempel kan et beta7-antagonistantistoff binde til en sekvens på ligandbindingsdomenet til beta7-subenhet og derved inhibere interaksjon av nevnte bundne domene med sin bindingspartner (slik som fibronektin, VCAM og/eller MAdCAM for alfa4beta7-integrinet, eller E-kadherin for alfaEbeta7-integrinet. I et annet eksempel kan et beta7-antagonistantistoff binde til en sekvens som ikke ligger på integrinsubenhetsdimeriseringsdomenet eller et ligandbindingsdomene, men der nevnte beta7-antagonistantistoffbinding fører til ødeleggelse av evnen for beta7-domenet til å interagere med sin bindingspartner (slik som en alfa4- eller alfaE-integrinsubenhet og/eller en ligand slik som fibronektin, VCAM, MAdCAM eller E-kadherin). I én utførelsesform binder et antagonistantistoff ifølge oppfinnelsen til beta7 (for eksempel ekstracellulærdomenet) slik at beta7-

dimerisering med alfa4- eller alfaE-subenheten blir ødelagt. I én utførelsesform binder et antagonististoff ifølge oppfinnelsen til beta7 slik at evnen for beta7 og/eller et alfa4beta7- og/eller et alfaEbeta7-integrin til å binde sin respektive ligand eller ligander bli ødelagt. I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen for eksempel et antagonististoff som ved binding til et beta7-molekyl inhiberer en dimerisering av nevnte molekyl. I én utførelsesform binder et beta7-antagonististoff ifølge oppfinnelsen spesifikt til en sekvens på ligandbindingsdomenet til beta7. I én utførelsesform binder et beta7-antagonististoff ifølge oppfinnelsen spesifikt til en sekvens på ligandbindingsdomenet til beta7 slik at ligandbinding (dvs. fibronektin, VCAM og/eller MAdCAM) til alfa4beta7-integrinet blir ødelagt. I én utførelsesform binder et beta7-antagonististoff ifølge oppfinnelsen spesifikt til en sekvens på ligandbindingsdomenet til beta7 slik at ligandbinding (dvs. E-kadherin) til alfaEbeta7-integrinet blir ødelagt.

I én utførelsesform ødelegger et antagonististoff ifølge oppfinnelsen beta7-dimerisering som omfatter heterodimerisering (dvs. beta7-dimerisering med et alfa4- eller alfaE-integrinsubenhetsmolekyl).

I noen tilfeller kan det være fordelaktig å ha et beta7-antagonististoff som ikke interfererer med binding av en ligand (slik som fibronektin, VCAM, MAdCAM eller alfaE) til beta7-subenhet som en del av et integrin eller til et alfa4beta7-integrin eller et alfaEbeta7-integrin som en dimer. I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen dermed et antistoff som ikke binder et fibronektin-, VCAM-, MAdCAM- eller E-kadherinbindingssete på beta7, men som isteden inhiberer interaksjon mellom beta7-subenhet og en alfa-subenhet (slik som alfa4- eller alfaE-integrinsubenhet) slik at et biologisk aktivt integrin blir forhindret i å bli dannet. I ett eksempel kan et antagonististoff ifølge oppfinnelsen bli benyttet sammen med én eller flere andre antagonister, der antagonistene blir målsøkt ved ulike prosesser og/eller funksjoner innenfor beta7-integrinaksen. I én utførelsesform binder slik et beta7-antagonististoff ifølge oppfinnelsen en epitop på beta7 som er forskjellig fra en epitop som blir bundet av et annet beta7- eller alfa/beta-integrinantagonististoff (slik som en alfa4beta7) inkludert monoklonalt antistoff eller et antistoff slik som et humanisert antistoff eller monoklonalt antistoff som er avledet fra og/eller som har de samme eller effektivt de samme bindingskarakteristikaene eller spesifisitet som et antistoff som er avledet fra et murint antistoff.

I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen et beta7-antagonististoff som ødelegger beta7-, alfa4- eller alfaE-multimerisering til det respektive integrinet i tillegg til ligandbinding. Et antagonististoff ifølge oppfinnelsen som inhiberer beta7-dimerisering med alfa4- eller alfaE-integrinsubenhet kan for eksempel ytterligere omfatte en evne til å konkurrere med ligand for binding til beta7 eller integrindimeren (f.eks. kan den interferere med bindingen av fibronektin, VCAM og/eller MAdCAM til beta7 og/eller alfa4beta7, eller den kan interferere med bindingen av E-kadherin til beta7 eller alfaEbeta7).

I én utførelsesform av et beta7-antagonistantistoff ifølge oppfinnelsen inhiberer binding av antagonisten til beta7 ligandbindingsaktivert cellulær adhesjon. I en annen utførelsesform av et beta7-antagonistantistoff ifølge oppfinnelsen inhiberer binding av antagonisten til beta7 i en celle rekruttering av cellen til celler og/eller vev der det beta7-inneholdende integrinet ble uttrykt.

I én utførelsesform binder et beta7-antagonistantistoff ifølge oppfinnelsen spesifikt minst en del av aminosyrene 176-250 (eventuelt aminosyrene 176-237) på det beta7-ekstracellulære domenet (se Tidswell, M. et al. (1997) J. Immunol. 159:1497-1505) eller variant derav, og reduserer eller blokkerer binding av ligandene MAdCAM, VCAM-1, fibronektin og/eller E-kadherin. I én utførelsesform ødelegger, reduserer og/eller forhindrer slik blokkering av ligandbinding adhesjon av en celle som uttrykker liganden til en celle som uttrykker den beta7-inneholdende liganden. I én utførelsesform binder et antagonistantistoff ifølge oppfinnelsen spesifikt til en aminosyresekvens for beta7 som omfatter restene 176-237. I én utførelsesform binder et antagonistantistoff ifølge oppfinnelsen spesifikt til en konformasjonsmessig epitop som er dannet av en del av eller hele av minst én av sekvensene som er valgt fra gruppen som består av restene 176-237 i beta7. I én utførelsesform binder et antagonistantistoff ifølge oppfinnelsen spesifikt en aminosyresekvens som har minst 50 %, minst 60 %, minst 70 %, minst 80 %, minst 90 %, minst 95 %, minst 98 %, minst 99 % sekvensidentitet eller likhet med aminosyresekvensen ifølge restene 176-237 eller restene 176-250 i human beta7. I én utførelsesform binder antagonisten anti-beta7-antistoffet ifølge oppfinnelsen den samme epitopen som anti-beta7-antistoffet Fib504 som er produsert av hybridom ATCC HB-293.

I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen sammensetninger som omfatter ett eller flere antagonistantistoffer ifølge oppfinnelsen og en bærer. I én utførelsesform er bæreren farmasøytisk akseptabel.

I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen nukleinsyrer som koder for et beta7-antagonistantistoff ifølge oppfinnelsen.

I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen vektorer som omfatter en nukleinsyre ifølge oppfinnelsen.

I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen vertsceller som omfatter en nukleinsyre eller en vektor ifølge oppfinnelsen. En vektor kan være av en hvilken som helst type, for eksempel en rekombinant vektor slik som en ekspresjons-vektor. Enhver av en mengde vertsceller kan bli benyttet. I én utførelsesform er en vertscelle en prokaryot celle, for eksempel *E. coli*. I én utførelsesform er en vertscelle en eukaryot celle, for eksempel en pattedyrscelle slik som kinesisk hamster ovarie(CHO)-celle.

I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen fremgangsmåter for å fremstille en antagonist ifølge oppfinnelsen. Oppfinnelsen tilveiebringer for eksempel en fremgangsmåte for å fremstille et beta7-antagonistantistoff (som slik det er definert her inkluderer fullengde antistoff og fragmenter derav), der nevnte fremgangsmåte omfatter å uttrykke en

rekombinant vektor ifølge oppfinnelsen som koder for nevnte antistoff (eller fragment derav) i en passende vertscelle og gjenvinne nevnte antistoff.

I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremstilt artikkel som omfatter en beholder og en sammen-setning inneholdt i beholderen, der sammensetningen omfatter ett eller flere beta7-antagonist-antistoffer ifølge oppfinnelsen. I én utførelsesform omfatter sammensetningen en nukleinsyre ifølge oppfinnelsen. I én utførelsesform omfatter en sammensetning som omfatter et antistoff ytterligere en bærer, som i noen utførelsesformer er farmasøytisk akseptabel. I én utførelsesform omfatter en fremstilt artikkel ifølge oppfinnelsen ytterligere instruksjoner for å administrere sammensetningen (for eksempel antagonistantistoffet) til et individ.

I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et sett som omfatter en første beholder som omfatter en sammensetning som omfatter ett eller flere beta7-antagonistantistoffer ifølge oppfinnelsen, og en andre beholder som omfatter en buffer. I én utførelsesform er bufferen farmasøytisk akseptabel. I én utførelsesform omfatter en sammensetning som omfatter et antagonist-antistoff ytterligere en bærer, som i noen utførelsesformer er farmasøytisk akseptabel. I én utførelsesform omfatter et sett ytterligere instruksjoner for administrering av sammen-setningen (for eksempel antagonistantistoffet) til et individ.

I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et sett som omfatter en første beholder som omfatter et preparat som omfatter ett eller flere beta7-antagonistantistoffer ifølge oppfinnelsen og en andre beholder som omfatter en buffer. I én utførelsesform er bufferen farmasøytisk akseptabel. I én utførelsesform omfatter et preparat som omfatter et antagonistantistoff ytterligere en bærer, som i noen utførelsesformer er farmasøytisk akseptable. I én utførelsesform omfatter et sett ytterligere instruksjoner for administrering av preparatet (f.eks. antagonistantistoffet) til et individ.

Beta7-integriner og deres ligander blir forskjellig uttrykt i sykdomstilstander. Ekspresjonen av MAdCAM-1 på tarmendotel er økt på steder med slimhinneinflammasjon hos pasienter med inflammatorisk tarmsykdom (UC og CD) og tykktarm laminapropria hos UC- og CD-pasienter viser også økt CD3+ og a5b7+-celler sammenlignet med IBS-kontroller (se Souza H., et al., Gut 45:856 (1999)). MAdCAM-1-ekspresjon ble observert å være assosiert med portaltraktus inflammasjon ved leversykdommer og kan være viktig i rekruttering av alfa4beta7+ lymfocytter til leveren ved inflammasjon. (Hillan, K., et al., Liver. 19(6):509-18 (1999)). MAdCAM-1 på hepatiske blodkar støtter adhesjon av a4b7+ lymfocytter fra pasienter med IBD og primær sklerosekolangitt. Adhesjonen ble inhibert med anti-MAdCAM-1-, anti-alfa4beta7- eller anti-alfa4-antistoffer (Grant AJ et al., Hepatology. 33(5):1065-72 (2001)). MAdCAM-1, VCAM-1 og E-kadherin blir uttrykt på hjerne-endotelceller og/eller på mikroblodkar i det betente sentralnervesystemet. Beta7-integriner bidrar til demyelinerende sykdom i CNS (Kanwar et al., J. Neuroimmunology 103, 146 (2000)). Ekspresjon av alfa4beta7 var vesentlig høyere i LPL i CD enn i kontroller og pasienter med UC (Oshitani, N. et al., International Journal of Molecule Medicine 12, 715-719 (2003)).

IEL'er fra CD-pasienter kan bli kronisk stimulert og rekruttert fra periferien (Meresse, B., et al., *Human Immunology*, 62, 694-700 (2001)). Ved human leversykdom blir alfaEbeta7-T-celler (CD4+ og CD8+) fortrinnsvis akkumulert i human lever der E-kadherin blir uttrykt på hepatocytter og gallegangepitel (Shimizu, Y., et al., *Journal of Hepatology* 39, 918-924 (2003)). Ved kronisk pankreatitt infiltrerer CD8+CD103+-T-celler, analogt med intestinale intraepitel-lymfocytter, pankreas ved kronisk pankreatitt (Matthias, P., et al., *Am J Gastroenterol* 93:2141-2147 (1998)). Oppregulering av alfaEbeta7 er funnet hos pasienter med systemisk lupus erytematosus med spesifikk epitel-involvering (Pang et al., *Arthritis & Rheumatism* 41:1456-1463 (1998)). Ved Sjøgrens syndrom adherer CD8+alfaEbeta7+T-celler og dreper acinøse epitelceller ved å indusere apoptose (Kroneld et al., *Scand J Rheumatol* 27:215-218, 1998). Integrin alfa4beta7 og alfaEbeta7 spiller en rolle i T-celle-epidermotropisme ved hudinflamasjon og bidrar til hudtransplantatavstøtning (Sun et al., *Transplantation* 74, 1202, 2002). Teraki og Shiohara viste fortrinnsvis ekspresjon av aEb7-integrin på CD8+-T-celler hos psoriasisrammet epidermis (Teraki og Shiohara, *Br. J. Dermatology* 147, 1118, 2002). Spytt-T-lymfocytter er aktiverte IEL'er (CD69+ CD103+) ved astma, KOLS og normale individer (Leckie et al., *Thorax* 58, 23, 2003). CD103+ (aEb7+) CTL akkumulerer med transplantatepitel ved klinisk nyretransplantatavstøtning (Hadley et al., *Transplantation* 72, 1548, 2001). I ett aspekt tilveiebringer således oppfinnelsen anvendelse av et beta7-antagoniststoff ifølge oppfinnelsen for å inhibere beta7-integrin ligandinteraksjon for å redusere eller lindre en sykdom slik som én eller flere av sykdomstilstandene som er beskrevet ovenfor. I én utførelsesform blir antistoffet ifølge oppfinnelsen benyttet i fremstillingen av et medikament for den terapeutiske og/eller profylaktiske behandlingen av en sykdom, slik som en inflammatorisk sykdom inkludert inflammatorisk tarmsykdom (slik som Crohns sykdom og ulcerøs kolitt), inflammatorisk leversykdom, inflammasjon i CNS, kronisk pankreatitt, systemisk lupus erytematosus, Sjøgrens syndrom, psoriasis og hudinflamasjon, astma, kronisk obstruktiv pulmonal sykdom (KOLS), interstitiell lungesykdom, allergi, autoimmun sykdom, transplantasjons-avstøtning, nyretransplantatavstøtning, transplantat-versus-vert sykdom, diabetes og kreft.

I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen anvendelse av en nukleinsyre ifølge oppfinnelsen til fremstillingen av et medikament til den terapeutiske og/eller profylaktiske behandlingen av en sykdom, slik som en immun-forstyrrelse (slik som autoimmun forstyrrelse eller inflammatorisk forstyrrelse) inkludert inflammatorisk tarmsykdom (slik som Crohns sykdom eller ulcerøs kolitt) og allergisk reaksjon (slik som forstyrrelser i det respiratoriske systemet, hud, ledd, allergisk astma og andre organer som rammes av allergisk reaksjon som er mediert ved et beta7-inneholdende integrin).

I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen av en ekspresjonsvektor ifølge oppfinnelsen i fremstillingen av et medikament til den terapeutiske og/eller profylaktiske behandlingen av en sykdom slik som immunforstyrrelse (slik som autoimmun forstyrrelse eller inflammatorisk forstyrrelse) inkludert uten begrensning inflammatorisk tarmsykdom (slik som Crohns

sykdom eller ulcerøs kolitt) og allergisk reaksjon (slik som forstyrrelser i det respiratoriske systemet, hud, ledd og andre organer som er rammet av allergisk reaksjon som er mediert ved et beta7-inneholdende integrin).

I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen anvendelse av en vertscelle ifølge
5 oppfinnelsen til fremstillingen av et medikament til den terapeutiske og/eller profylaktiske
behandlingen av en sykdom, slik som en immun-forstyrrelse (slik som autoimmun
forstyrrelse eller inflammatorisk forstyrrelse) inkludert inflammatorisk tarmsykdom (slik som
Crohns sykdom eller ulcerøs kolitt) og allergisk reaksjon (slik som forstyrrelser i det
respiratoriske systemet, huden, leddene og andre organer som er rammet av allergisk
10 reaksjon som er mediert ved et beta7-inneholdende integrin).

I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremstilt artikkel ifølge oppfinnelsen i
fremstillingen av et medikament for den terapeutiske og/eller profylaktiske behandlingen av
en sykdom, slik som en immunforstyrrelse (slik som autoimmun forstyrrelse eller
inflammatorisk forstyrrelse) inkludert inflammatorisk tarmsykdom (slik som Crohns sykdom
15 eller ulcerøs kolitt) og allergisk reaksjon (slik som forstyrrelser i det respiratoriske systemet,
huden, leveren og andre organer som er rammet av allergisk reaksjon som er mediert ved
et beta7-inneholdende integrin).

I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen anvendelse av et sett ifølge oppfinnelsen i
fremstillingen av et medikament for den terapeutiske og/eller profylaktiske behandlingen av
20 en sykdom, slik som en immun-forstyrrelse (slik som autoimmun forstyrrelse eller
inflammatorisk forstyrrelse) inkludert inflammatorisk tarmsykdom (slik som Crohns sykdom
eller ulcerøs kolitt) og allergisk reaksjon (slik som forstyrrelser i det respiratoriske systemet,
huden, leddene og andre organer som er rammet av allergisk reaksjon som er mediert ved
et beta7-inneholdende integrin).

Oppfinnelsen tilveiebringer fremgangsmåter og sammensetninger som er nyttige for
25 å modulere sykdomstilstander som er assosiert med feilregulering av den beta7-
integrinmedierte celle-celle-interaksjonsprosessen. Beta7-integrinene er involvert i flere
biologiske og fysiologiske funksjoner, inkludert for eksempel inflammatoriske forstyrrelser og
allergiske reaksjoner. I ett aspekt tilveiebringer slik oppfinnelsen en fremgangsmåte som
30 omfatter å administrere et antistoff ifølge oppfinnelsen til et individ.

I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å inhibere beta7-
integrinmediert inflammasjon, der nevnte fremgangsmåte omfatter å kontakte en celle eller
et vev med en effektiv mengde av et antistoff ifølge oppfinnelsen, hvorved lymfocytt- eller
B-celleinteraksjon og binding til en beta7-integrinuttrykkende celle blir inhibert.

I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å behandle en
35 patologisk tilstand som er assosiert med feilregulering av beta7-integrinbinding hos et
individ, der nevnte fremgangsmåte omfatter å administrere en effektiv mengde av et
antistoff ifølge oppfinnelsen til individet, hvorved nevnte tilstand blir behandlet.

I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å inhibere bindingen av en lymfocytt som uttrykker en beta7-integrinligand (slik som en celle som uttrykker MAdCAM, VCAM, E-kadherin eller fibronektin) til en celle som uttrykker beta7-integrin (slik som alfa4beta7- eller alfaEbeta7-integrinet), der nevnte fremgangsmåte omfatter å kontakte
5 nevnte celler med et antistoff ifølge oppfinnelsen for derved å inhibere eller forhindre adhesjon av cellene og forårsake en reduksjon av inflammatorisk reaksjon.

I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å behandle eller forhindre en inflammatorisk forstyrrelse som er assosiert med økt uttrykking eller aktivitet av beta7-integrin eller en interaksjon mellom et beta7-integrin på én celle og en beta7-integrinreseptor på en annen celle, der nevnte fremgangsmåte omfatter å administrere en
10 effektiv mengde av et antistoff ifølge oppfinnelsen til et individ med behov for slik behandling, for derved effektivt å behandle eller forebygge nevnte inflammatoriske forstyrrelse. I én utførelsesform er nevnte inflammatoriske forstyrrelse inflammatorisk tarmsykdom (IBD). I en annen utførelsesform er nevnte inflammatoriske forstyrrelse en
15 allergisk reaksjon.

Fremgangsmåter ifølge oppfinnelsen kan bli benyttet til å påvirke enhver passende patologisk tilstand, for eksempel celler og/eller vev som er assosiert med feilregulering av den beta7-integrinbinende reaksjonsveien. Beta7-integriner blir uttrykt primært på leukocytter (Tidswell, M. et al. (1997) ovenfor). I én utførelsesform blir en leukocytt målsøkt
20 i en fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen og blir forhindret fra å binde til en celle som uttrykker en ligand for beta7-integrinet. For eksempel blir en intraepitel-lymfocytt som uttrykker E-kadherin forhindret ifølge oppfinnelsen fra å binde til en alfaEbeta7-uttrykkende celle med et anti-beta7-antagonistantistoff. Celler som uttrykker MAdCAM, VCAM-1 eller fibronektin blir med et anti-beta7-antagonistantistoff forhindret ifølge oppfinnelsen fra å
25 binde til en leukocytt som uttrykker alfa4beta7.

Fremgangsmåter ifølge oppfinnelsen kan ytterligere omfatte ytterligere behandlings-trinn. I én utførelsesform omfatter for eksempel en fremgangsmåte ytterligere et trinn der en målsøkt celle og/eller vev (for eksempel en endotelcelle i tarmslimhinnen) eksponert for et anti-TNF-antistoff eller et småmolekylært terapeutisk middel inkludert 5-ASA-forbindelser.
30

Som beskrevet her medierer beta7-integriner viktige biologiske prosesser der feilreguleringen av disse, fører til uttallige, patologiske tilstander. I én utførelsesform av fremgangsmåter ifølge oppfinnelsen er en celle som er målsøkt (for eksempel en endotelcelle) én der adhesjon av en celle som uttrykker en beta7-integrinligand for et beta7-integrin (hvor cellen kan være en lymfocytt og liganden kan være MAdCAM, VCAM eller E-kadherin) er ødelagt, inhibert eller forhindret sammenlignet med cellene i fraværet av anti-beta7-antagonistantistoffet ifølge oppfinnelsen. I én utførelsesform inhiberer en fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen lymfocyttenes målsøking, for derved å inhibere inflammasjon på stedet med beta7-integrinuttrykking. Kontakt med en antagonist ifølge
35

oppfinnelsen kan for eksempel føre til en celles manglende evne til å adhere til en celle som uttrykker en ligand for et beta7-integrin.

Kort beskrivelse av figurene

5 Fig. 1A og 1B viser sammenstilling av sekvenser for de variabel lette og tunge kjedene for de følgende: human lettkjede-undergruppe-kappa-I-konsensussekvens (fig. 1A, SEKV. ID nr. 23), human tungkjede-undergruppe-III-konsensussekvens (fig. 1B, SEKV. ID nr. 24), rotte-anti-muse-beta7-antistoff (Fib504)-variabel lettkjede (fig. 1A, SEKV. ID nr. 10), rotte-anti-muse-beta7-antistoff (Fib504)-variabel tungkjede (fig. 1B, SEKV. ID nr. 11)
 10 og humaniserte antistoffvarianter: humanisert hu504Ktransplantatvariabel lettkjede (fig. 1A, SEKV. ID nr. 25), humanisert hu504K-transplantatvariabel tungkjede (fig. 1B, SEKV. ID nr. 26), variant hu504.5 (aminosyrevariasjoner fra humanisert hu504K transplantat er indikert i fig. 1A (lettkjede) og fig. 1B (tungkjede) for variantene hu504.5, hu504.16 og hu504.32. Ytterligere aminosyresubstitusjoner i HVR-H1 og HVR-H2 for hu504K-transplantat som førte
 15 til beta7-bindende antistoffer er indikert i fig. 1C.

Fig. 2A og 2B viser fullengdesekvensen for human konsensus-undergruppe-III-sekvens-lettkjede (fig. 2A, SEKV. ID nr. 27) og tungkjede (fig. 2B, SEKV. ID nr. 28). HVR'er er understreket.

Fig. 3A og 3B viser fullengdesekvensen for de humaniserte 504-transplantat-
 20 inneholdende rotte-Fib504-hypervariabel regionene (som beskrevet her) som er transplantert på den humane kappa-I-konsensussekvenslettkjeden (fig. 3A, SEKV. ID nr. 29) og på den humane undergruppe-III-konsensussekvenstungkjeden (fig. 3B, SEKV. ID nr. 30). HVR'er er understreket.

Fig. 4A og 4B viser fullengdesekvensen for den humaniserte 504K-transplantat der
 25 posisjon 49 i lettkjeden til hu504-transplantat er en Y49K-substitusjon. hu504K-transplantatlettkjeden er avbildet i SEKV. ID nr. 31 og hu504K-transplantattungkjeden er avbildet i SEKV. ID nr. 30. HVR'er er understreket.

Fig. 5A og 5B viser fullengdesekvensen til hu504K-RF-transplantat der posisjonene
 30 71 og 78 i tungkjeden til hu504-transplantat er en A71R-substitusjon og en A78F-substitusjon fra hu504K-transplantatsekvensen. Hu504K-RF-transplantatlettkjeden er avbildet i SEKV. ID nr. 31 og hu504K-RF-transplantattungkjeden er avbildet i SEKV. ID nr. 32. HVR'er er understreket.

Fig. 6A og 6B viser fullengdesekvensen for hu504.32-varianten som omfatter
 35 tungkjeden til hu504K-RF-transplantat (SEKV. ID nr. 32) og T31D- og Y32L-substitusjoner på lettkjeden til hu504K-transplantat (SEKV. ID nr. 33). HVR'er er understreket.

Fig. 7A-7B og fig. 8A-8B viser eksempelmessige humane akseptorkonsensusrammeverksekvenser til anvendelse i utøvelse av den foreliggende oppfinnelsen med sekvensidentifikatorer som følger:

Variabel lett (VL)-konsensusrammeverk (fig. 7A, B)

human VL-kappaundergruppe-I-konsensusrammeverk (SEKV. ID nr. 14)

human VL-kappaundergruppe-I-konsensusrammeverk minus forlenget HVR-L2 (SEKV. ID nr. 15)

5 human VL-kappaundergruppe-II-konsensusrammeverk (SEKV. ID nr. 16)

human VL-kappaundergruppe-III-konsensusrammeverk (SEKV. ID nr. 17)

human VL-kappaundergruppe-IV-konsensusrammeverk (SEKV. ID nr. 18)

Skyggelagte regioner representerer lettjede-HVR'er (indikert som L1, L2 og L3).

10 Variabel tung (VH)-konsensusrammeverk (fig. 8A, B)

human VH-undergruppe-I-konsensusrammeverk minus Kabat-CDR'er (SEKV. ID nr. 19)

human VH-undergruppe-I-konsensusrammeverk minus forlengede hypervariable regioner (SEKV. ID nr. 20-22)

human VH-undergruppe-II-konsensusrammeverk minus Kabat-CDR'er (SEKV. ID nr. 48)

15 human VH-undergruppe-II-konsensusrammeverk minus forlengede hypervariable regioner (SEKV. ID nr. 49-51)

human VH-undergruppe-III-konsensusrammeverk minus Kabat-CDR'er (SEKV. ID nr. 52)

human VH-undergruppe-III-konsensusrammeverk minus forlengede hypervariable regioner (SEKV. ID nr. 53-55)

20 human VH-akseptorrammeverk minus Kabat-CDR'er (SEKV. ID nr. 56)

human VH-akseptorrammeverk minus forlengede hypervariable regioner (SEKV. ID nr. 57-58)

human VH-akseptor-2-rammeverk minus Kabat-CDR'er (SEKV. ID nr. 59)

25 human VH-akseptor-2-rammeverk minus forlengede hypervariable regioner (SEKV. ID nr. 60-62).

Fig. 9A og 9B viser en aminosyresekvens for variabelkjedene til rotte-anti-muse-integrin-beta7-Fib504-antistoffet produsert av hybridoma ATCC HB-293. HVR'er er understreket. Variabellettjeder avbildet i fig. 9A (SEKV. ID nr. 12) og variabeltungjeder avbildet i fig. 9B (SEKV. ID nr. 13).

30 Fig. 10A viser aminosyreposisjoner på tungkjeden til de ulike konsensussekvensene (hu-undergrupper I-III). Konsensussekvensen som er benyttet til utvikling av Herceptin-anti-HER2-antistoffet, rotte-Fib504- og hu504-RL- og hu504-RF-rammeverk er beskrevet i eksemplene her. Fig. 10B er et stolpediagram som viser den relative bindingen av alfa4beta7 til hu504-transplantatantistoff og hu504K-transplantatantistoff som en funksjon
35 av "RL" eller "RF"-rammeverksmodifiseringer som beskrevet i eksempel 1.

Fig. 11A-11C. Fig. 11A viser HVR-endringene som skyldes affinitetsmodning utført ved å tilby et begrenset utvalg av aminosyresubstitusjoner i hu504.16-varianten. Resultatene er fra biblioteker med individuelt modifiserte HVR'er i hu504.16-varianten som beskrevet i eksempel 2 her. Aminosyreforkortelser i bokser er aminosyrer funnet hyppigere

på de beta7-binende antistoffene (bakteriofagselekterte antistoffer). Fig. 11B og 11C er stolpediagrammer av resultatene i fig. 11A som viser antallet og type aminosyre-substitusjoner i hu504.16-varianten (lettkjede, fig. 11B, tungkjede, fig. 11C) som er påvisbare ved hjelp av mutagenese- og seleksjonsfremgangsmåtene ifølge eksempel 2.

5 Fig. 12 viser resultatene av affinitetsmodning utført ved å tilby et bredt utvalg av mulige aminosyre-substitusjoner i HVR'ene til hu504.32-variant som beskrevet i eksempel 2. Boksene indikerer aminosyren som ble påvist hyppigst i antistoffene som ble påvist som beta7-bindende antistoffer ved hjelp av mutagenese- og seleksjonsfremgangsmåtene i eksempel 2.

10 Fig. 13A og 13B viser HVR-sekvenser for rotte-anti-muse-Fib504 (ATCC-293) og den humane konsensusen (kolonner på venstre side). Eksempler på aminosyre-substitusjonene som er observert for hver HVR-posisjon ved hjelp av analysene som er beskrevet i eksemplene (aminosyre-substitusjoner som er observert ved myk aminosyrerandomisering, bred aminosyre-substitusjons-scanning og begrenset aminosyre-substitusjons-scanning) er vist på
15 høyre side (en nyttig fremgangsmåte for å modifisere HVR'er for humanisering, som er anvendbar på varianter ifølge foreliggende oppfinnelse er funnet i US søknad serienr. 60/545,840, innsendt 19. februar 2004).

Fig. 14 er en eksemplermessig grafisk representering av Fib504 og variantantistoff-binding til MAdCAM som en funksjon av antistoffkonsentrasjonen som beskrevet i eksempel
20 3. IC₅₀- og IC₉₀-verdier for antistoffene ble bestemt.

Fig. 15A og 15B viser lettkjede- og tungkjede-HVR-aminosyresekvensene for 504.32R-anti-beta7-antistoff med hensyn på posisjon ifølge Kabat-nummereringssystemet og et relativt nummereringssystem (A-F) for de seks HVR'ene i antistoffet. Aminosyrer på posisjon 71, 73 og 78 i tungkjede-FR3-regionen er også vist. Nyttige aminosyre-
25 substitusjoner er også fremlagt for mange av posisjonene på HVR'ene eller tungkjede-FR3-region.

Fig. 16 viser et stolpediagram for den relative evnen til 504.32M- og 504.32R-antistoffene i å blokkere målsøking av radiomerkede T-celler til kolon hos mus som opplever inflammatorisk tarmsykdom.

30

Måter å utføre oppfinnelsen på

Oppfinnelsen tilveiebringer fremgangsmåter, preparater, sett og fremstilte artikler for å identifisere og/eller anvende inhibitorer av beta7-signaliseringsveien.

35 Detaljer omkring disse fremgangsmåtene, preparatene, settene og de fremstilte artiklene blir tilveiebrakt her.

Generelle teknikker

Utøvelsen av foreliggende oppfinnelse vil hvis ikke annet er indikert benytte konvensjonelle teknikker for molekylærbiologi (inkludert rekombinante teknikker),

mikrobiologi, cellebiologi, biokjemi og immunologi, som er innenfor emnet på fagområdet. Slike teknikker er fullt ut forklart i litteraturen, slik som i "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", annen utgave (Sambrook et al., 1989), "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, red., 1984), "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, red., 1987), "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.), "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel et al., red., 1987, og periodiske oppdateringer), "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., red., 1994), "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Berbard V., 1988), "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas et al., 2001).

10 Definisjoner

Med "beta7-subenhet" eller " β 7-subenhet" er det ment den humane β 7-integrin-subenheten (Erle et al., (1991) J. Biol. Chem. 266:11009-11016). Beta7-subenheten assosieres med alfa4-integrin-subenheten slik som den humane α 4-subenheten (Kilger og Holzmann (1995) J. Mol. Biol. 73:347-354). Alfa4beta7-integrinet blir uttrykt på en hoveddel av modne lymfocytter, i tillegg til på en liten populasjon av tymocytter, benmargsceller og mastceller. (Kilshaw og Murant (1991) Eur. J. Immunol. 21:2591-2597, Gurish et al., (1992) 149: 1964-1972, og Shaw, S.K. og Brenner, M.B. (1995) Semin. Immunol. 7:335). Beta7-subenheten assosierer også med alfaE-subenheten, slik som den humane alfaE-integrin-subenheten (Cepek, K.L., et al. (1993) J. Immunol. 150:3459). AlfaEbeta7-integrinet blir uttrykt på intratarmepitellymfocytter (iIEL'er) (Cepek, K.L. (1993) ovenfor). Beta7-subenheten som binder til det humaniserte anti-beta7-antistoffet ifølge oppfinnelsen kan være naturlig forekommende og kan være løselig eller lokalisert på overflaten til en celle.

Med "alfaE-subenhet" eller "alfaE-integrin-subenhet" eller " α E-subenhet" eller " α E-integrin-subenhet" eller "CD103" er det ment en integrin-subenhet som er funnet å være assosiert med beta7-integrin på intraepitel-lymfocytter, der alfaEbeta7-integrinet medierer binding til iEL'ene på tarmepitel som uttrykker E-kadherin (Cepek, K.L. et al. (1993) J. Immunol. 150:3459, Shaw, S.K. og Brenner, M.B. (1995) Semin. Immunol. 7:335).

"MAdCAM" eller "MAdCAM-1" blir benyttet om hverandre i konteksten av foreliggende oppfinnelse og refererer til proteinet slimhinneaddressin-celleaddisjonsmolekyl-1, som er et enkeltkjede polypeptid som omfatter en kort cytoplasmahale, en transmembranregion og en ekstracellulær sekvens sammensatt av tre immunglobulinlignende domener. cDNA for murin, human og makak-MAdCAM-1 har blitt klonet (Briskin, et al., (1993) Nature, 363:461-464, Shyjan et al., (1996) J. Immunol. 156:2851-2857).

"VCAM-1" eller "vaskulærcelleadhesjonsmolekyl-1", "CD106" refererer til en ligand for alfa4beta7 og alfa4beta1, som er uttrykt på aktivert endotel og som er viktig i endotel-leukocytinteraksjoner slik som binding og transmigrasjon for leukocytter i løpet av inflammasjon.

"E-kadherin" refererer til et medlem av familien av kadheriner, der E-kadherin blir uttrykt på epitelceller. E-kadherin er en ligand for alfaEbeta7-integrinet og medierer binding

av iEL-uttrykt alfaEbeta7 til tarmepitel, selv om dens funksjon ved lymfocytt-målsøking er uklar (E-kadherinuttrykking er oppregulert av TGF-beta1).

"Fibronektin" refererer til fibronektin som er involvert i vevsreparasjon, embryogenese, blodkoagulasjon og cellemigrasjon/adhesjon. Den virker som en linker i ECM (ekstracellulær matriks) og som dimer funnet i plasma (plasma-fibronektin). Plasmaformen blir syntetisert av hepatocytter, mens ECM-formen blir produsert av fibroblaster, kondrocytter, endotelceller, makrofager i tillegg til visse epitelceller. I denne konteksten interagerer den med alfa4beta7-integrin for å mediere aspekter av lymfocyttmålsøking eller adhesjon. ECM-formen av fibronektin virker som et generelt celledhesjonsmolekyl ved å forankre celler til kollagen eller proteoglykansubstrater. Fibronektin kan også virke for å organisere cellulær interaksjon med ECM ved å binde til ulike komponenter på ekstracellulærmatriksen og til membranbundne fibronektinreseptorer på celleoverflater. Til slutt er fibronektin viktig i cellemigrasjonshendelser i løpet av embryogenese.

"Gastrointestinale inflammatoriske lidelser" er en gruppe av kroniske lidelser som forårsaker inflammasjon og/eller sårdannelse i slimhinne-membran. Disse lidelsene inkluderer for eksempel inflammatorisk tarmsykdom (f.eks. Crohns sykdom, ulcerøs kolitt, ubestemt kolitt og smittsom kolitt), mukositt (f.eks. oral mukositt, gastrointestinal mukositt, nesemukositt og proktitt), nekrotiserende enterokolitt og øsofagitt.

"Inflammatorisk tarmsykdom" eller "IBD" blir her benyttet om hverandre for å referere til sykdommer i tarmen som forårsaker inflammasjon og/eller sårdannelse og inkluderer Crohns sykdom og ulcerøs kolitt.

"Crohns sykdom (CD)" eller "ulcerøs kolitt (UC)" er kroniske, inflammatoriske tarmsykdommer av ukjent etiologi. Crohns sykdom, i motsetning til ulcerøs kolitt, kan ramme enhver del av tarmen. De mest fremherskende egenskapene ved Crohns sykdom er den granulære, rød-rosa ødemaktige fortykningen av tarmveggen. Med utviklingen av inflammasjon mister disse granulomene ofte deres grenser og integrerer i de omkringliggende vevene. Diaré og forstoppelse i tarmen er de dominerende, kliniske trekk. Som med ulcerøs kolitt kan utviklingen av Crohns sykdom være kontinuerlige eller tilbakefallende, mild eller alvorlig, men ulikt ulcerøs kolitt er ikke Crohns sykdom mulig å kurere ved fjerning av de involverte segmentene i tarmen. De fleste pasienter med Crohns sykdom er avhengig av kirurgi på et tidspunkt, men påfølgende tilbakefall er vanlig og kontinuerlig, medisinsk behandling er vanlig.

Crohns sykdom kan involvere en hvilken som helst del av fordøyelsessystemet fra munn til anus, men den fremkommer typisk i de ileokole områdene, tynntarmsområdet eller i kolon-rektumområdet. Histopatologisk manifesterer sykdommen seg ved diskontinuerlige granulomatomer, kryptabcesser, sprekker og aftøse sår. Det inflammatoriske infiltratet er blandet, bestående av lymfocytter (både T- og B-celler), plasmaceller, makrofager og nøytrofiler. Det er en uforholdsmessig økning i IgM- og IgG-utskillende plasmaceller, makrofager og nøytrofiler.

Antiinflammatoriske legemidler som sulfasalazin og 5-aminosalisylysyre (5-ASA) er nyttige for å behandle mild, aktiv kolon-Crohns-sykdom og blir ofte foreskrevet for å opprettholde remisjon av sykdommen. Metroidazol og ciprofloksasin er lignende i virkning som sulfasalazin og ser ut til å være spesielt nyttige for å behandle perianal sykdom. I mer alvorlige tilfeller er kortikosteroider effektive i å behandle aktive forverringer og kan til og med opprettholde remisjon. Azatioprin og 6-merkaptopurin har også vist suksess hos pasienter som krever kronisk administrering av kortikosteroider. Det er også mulig at disse legemidlene kan spille en rolle i langtidsprofylaksen. Dessverre kan det være en svært lang forsinkelse (opptil seks måneder) før virkningen setter inn hos noen pasienter.

Antidiarélegemidler kan også tilveiebringe symptomatisk lindring hos noen pasienter. Næringsterapi eller elementdiett kan forbedre næringsstatusen for pasienter og indusere symptomatisk forbedring ved akutt sykdom, men den induserer ikke vedvarende, kliniske remisjoner. Antibiotika blir benyttet for å behandle sekundær, bakterieovervekst i tynntarm og i behandling av pyogene komplikasjoner.

”Ulcerøs kolitt (UC)” rammer tykktarmen. Utviklingen av sykdommen kan være kontinuerlig eller tilbakefallende, mild eller alvorlig. Den tidligste lesjonen er en inflammatorisk infiltrasjon med abscessdannelse ved basen av Lieberkühns krypter. Sammenvekning av disse oppsvulmede og sprukne kryptene har en tendens til å separere den overliggende slimhinnen fra dens blodtilførsel, noe som fører til sårdannelse.

Symptomer på sykdommen inkluderer kramper, smerte i nedre del av buken, rektalblødning og hyppig løs avføring bestående i hovedsak av blod, puss og slim med spredte fekale partikler. En total kolektomi kan være nødvendig for akutt, alvorlig eller kronisk, ikke-forbedrende ulcerøs kolitt.

De kliniske trekkene ved UC er svært variable, og fremkomsten kan være snikende eller plutselig, og kan inkludere diaré, tenesmus og tilbakefallende rektal blødning. Ved full involvering av hele kolon, toksisk megakolon, så kan en livstruende tilstand oppstå. Manifesteringer på utsiden av tarmen inkluderer artritt, pyoderma gangrenosum, uveitt og erytema nodosum.

Behandling av UC inkluderer sulfasalazin og beslektede, salisylatinneholdende legemidler for milde tilfeller og kortikosteroidlegemidler i alvorlige tilfeller. Topisk administrering av enten salisylater eller kortikosteroider er noen ganger effektivt, spesielt når sykdommen er begrenset til den distale tarmen, og er assosiert med minskede bivirkninger sammenlignet med systemisk anvendelse. Tilleggstiltak slik som administrering av jern og antidiarémidler er noen ganger indikert. Azatioprin, 6-merkaptopurin og metotreksat blir noen ganger også foreskrevet for anvendelse i refraktoriske, kortikosteroid-avhengige tilfeller.

En ”modifisering” av en aminosyrerest/posisjon, som benyttet her, refererer til en endring av en primær aminosyresekvens sammenlignet med en utgangsaminoesyresekvens, der endringen skyldes en sekvensendring som involverer nevnte aminosyrerest/posisjon.

Typiske modifiseringer inkluderer for eksempel substitusjon av resten (eller på nevnte posisjon) med en annen aminosyre (f.eks. en konservativ eller ikke-konservativ substitusjon), insersjon av én eller flere (vanligvis færre enn 5 eller 3) aminosyrer ved siden av nevnte rest/posisjon og delesjon av nevnte rest/posisjon. En "aminosyresubstitusjon", eller variasjon derav, refererer til erstatningen av en eksisterende aminosyrerest på en forhåndsbestemt (utgangs)aminosyresekvens med en annen aminosyrerest. Vanligvis og fortrinnsvis fører modifiseringen til endring i minst én fysiobiokjemisk aktivitet for variantpolypeptidet sammenlignet med polypeptid som omfatter utgangsaminosyresekvensen (eller "villtype aminosyresekvensen"). I tilfellet med et antistoff kan for eksempel en fysiobiokjemisk aktivitet som er endret være bindingsaffinitet, bindingsevne og/eller bindings-effekt til et målmolekyl.

Uttrykket "aminosyre" innenfor omfanget av foreliggende oppfinnelse blir benyttet i sin bredeste betydning og er ment å skulle inkludere de naturlige forekommende L- α -aminosyrene eller -restene. De vanlig benyttede enbokstavsforkortelsene eller trebokstavsforkortelsene for naturlig forekommende aminosyrer blir benyttet her (Lehninger, A.L., *Biochemistry*, 2. utgave, s. 71-92, (Worth Publishers, New York, New York, 1975). Uttrykket inkluderer D-aminosyrer i tillegg til kjemisk modifiserte aminosyrer slik som aminosyreanaloger, naturlig forekommende aminosyrer som vanligvis ikke blir inkorporert inn i proteinet slik som norleucin, og kjemisk syntetiserte forbindelser som har egenskaper som er kjent på fagområdet for å være karakteristiske for en aminosyre. For eksempel er analoger eller hermene av fenylalanin eller prolin som muliggjør den samme konformasjonsmessige begrensningen for peptidforbindelsene som naturlig Phe eller Pro inkludert innenfor definisjonen av aminosyre. Slike analoger og hermene blir her referert til som "funksjonelle ekvivalenter" for en aminosyre. Andre eksempler på aminosyrer er fremlagt av Roberts og Vellaccio, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Gross og Meiehofer, red., bind 5, s. 341 (Academic Press, Inc., New York, New York, 1983). Der en enkelt bokstav blir benyttet for å betegne én av de naturlige forekommende aminosyrene er betegnelsene som de vanligvis blir funnet i den relevante litteraturen (se for eksempel Alberts, B. et al. *Molecular Biology of the Cell*, 3. utgave, Garland Publishing, Inc. 1994, side 57).

Et "isolert" antistoff er ett som har blitt identifisert og separert og/eller gjenvunnet fra en komponent i sitt naturlige miljø. Forurensende komponenter fra dens naturlige miljø er materialer som vil interferere med diagnostiske eller terapeutiske anvendelser av antistoffet, og kan inkludere enzymer, hormoner og andre proteininnholdende eller ikke-proteininnholdende oppløste stoffer. I foretrukne utførelsesformer vil antistoffet være rensert (1) til mer enn 95 % etter vekt av antistoff som bestemt ved Lowry-fremgangsmåten, og mest foretrukket mer enn 99 % etter vekt, (2) til en grad som er tilstrekkelig for å oppnå minst 15 rester av N-terminal eller intern aminosyresekvens ved anvendelse av en spinning-cup-sekvenator eller (3) til homogenitet ved hjelp av SDS-PAGE ved reduserende eller ikke-reduserende betingelser ved å benytte Coomassie blått eller fortrinnsvis sølvfarging. Isolert

antistoff inkluderer antistoffet *in situ* innenfor rekombinante celler siden minst én komponent fra antistoffets naturlige miljø ikke vil være tilstede. Ordinært vil likevel isolert antistoff bli fremstilt ved hjelp av minst ett rensetrinn.

Uttrykket "variabelt domene rest-nummerering som i Kabat" eller "aminosyre-
 5 posisjonsnummerering som i Kabat", og variasjoner derav, refererer til nummererings-
 systemet som blir benyttet for tungkjede variable domener eller lettkjede variable domener
 for samlingen av antistoffet i Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest,
 5. utgave, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Ved å
 benytte dette nummereringssystemet kan den faktiske, lineære aminosyresekvensen
 10 inneholde færre eller ytterligere aminosyrer som tilsvarer en forkortning av, eller insersjon i,
 en FR eller CDR i variabeldomenet. Et tungkjede variabelt domene kan for eksempel
 inkludere en enkel aminosyreinsersjon (rest 52a ifølge Kabat) etter rest 52 i H2 og innsatte
 rester (f.eks. restene 82a, 82b og 82c, osv., ifølge Kabat) etter tungkjede-FR-rest 82.
 Kabat-nummereringen av rester kan bli bestemt for et gitt antistoff ved å sammenstille ved
 15 regioner med homologi av sekvensen for antistoffet med en Kabat-nummerert
 "standardsekvens".

Uttrykket "vesentlig lik" eller "vesentlig den samme", slik det blir benyttet her,
 betegner en tilstrekkelig høy grad av likhet mellom to numeriske verdier (vanligvis én som
 er assosiert med et antistoff ifølge oppfinnelsen og den andre assosiert med et referanse/-
 20 sammenligningsantistoff) slik at en fagperson på området vil anse forskjellen mellom de to
 verdiene å være av liten eller ingen biologisk og/eller statistisk signifikans innenfor
 konteksten av de biologiske karakteristika som er målt ved nevnte verdier (f.eks. Kd-
 verdier). Forskjellen mellom nevnte to verdier er fortrinnsvis mindre enn omtrent 50 %,
 fortrinnsvis mindre enn omtrent 40 %, fortrinnsvis mindre enn omtrent 30 %, fortrinnsvis
 25 mindre enn omtrent 20 %, fortrinnsvis mindre enn omtrent 10 % som en funksjon av
 verdien for referanse/sammenligningsantistoffet.

"Bindingsaffinitet" refererer vanligvis til styrken av den totale summen av ikke-
 kovalente interaksjoner mellom et enkelt bindingssete på et molekyl (f.eks. et antistoff) og
 dets bindingspartner (f.eks. et antigen). Hvis ikke annet er indikert refererer
 30 "bindingsaffinitet", slik det er benyttet her, til iboende bindingsaffinitet som gjenspeiler en
 1:1-interaksjon mellom medlemmer i et bindingspar (f.eks. antistoff og antigen). Affiniteten
 for et molekyl X for sin partner Y kan generelt bli representert ved dissosiasjonskonstanten
 (Kd). Affinitet kan bli målt ved vanlige fremgangsmåter på fagområdet, inkludert de som er
 beskrevet her. Lavaffinitetsantistoffer binder vanligvis antigen sakte og har en tendens til å
 35 dissosiere lett, mens høyaffinitetsantistoffet vanligvis binder antigen raskere og har en
 tendens til å forbli bundet lengre. En mengde fremgangsmåter for å måle bindingsaffinitet er
 kjent på fagområdet, og en hvilken som helst av disse kan bli benyttet for formål ifølge
 foreliggende oppfinnelse. Spesifikke, illustrerende utførelsesformer er beskrevet i det
 følgende.

I én utførelsesform blir "Kd-verdien" eller "Kd" ifølge denne oppfinnelsen målt ved hjelp av en radiomerket antigenbindingsanalyse (RIA) som blir utført med Fab-versjonen av et antistoff av interesse og dets antigen som beskrevet ved den følgende analysen som måler løsningsbindingsaffinitet for Fab'er for antigen ved å balansere Fab med en minimal konsentrasjon av (^{125}I)-merket antigen i nærvær av en titreringsserie med umerket antigen, deretter fange bundet antigen med en anti-Fab-antistoffbelagt plate (Chen, et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881). For å etablere betingelser for analysen blir mikrotiterplater (Dynex) belagt over natten med 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ med et innfangende anti-Fab-antistoff (Cappel Labs) i 50 mM natriumkarbonat (pH 9,6) og deretter blokkert med 2 % (vekt/volum) bovint serumalbumin i PBS i to til fem timer ved romtemperatur (omtrent 23 °C). På en ikke-adsorberende plate (Nunc kat.# 269620) blir 100 pM eller 26 pM [^{125}I]-antigen blandet med seriefortynninger av en Fab av interesse (f.eks. i overensstemmelse med vurderingen av et anti-VEGF-antistoff, Fab-12 i Presta et al., (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599). Fab'en av interesse blir deretter inkubert over natt, men inkuberingen kan likevel fortsette i en lengre periode (f.eks. 65 timer) for å sikre at likevekt blir nådd. Deretter blir blandingene overført til innfangningsplaten for inkubering ved romtemperatur (f.eks. 1 time). Løsningen blir deretter fjernet og platen blir vasket åtte ganger med 0,1 % Tween-20 i PBS. Når platene har tørket blir 150 μl /brønn med scintillasjonsmiddel (MicroScint-20, Packard) tilsatt, og platen blir talt på en Topcount-gammateller (Packard) i 10 min. Konsentrasjonene for hver Fab som gir mindre enn eller lik 20 % maksimal binding blir valgt til anvendelse i kompetitive bindingsanalyser. Ifølge en annen utførelsesform blir Kd eller Kd-verdien målt ved å benytte surface-plasmon-resonance-analyse ved å benytte en BIAcore™-2000 eller en BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) ved 25°C med immobilisert antigen CM5-brikker ved ca. 10 responsenheter (RU). Kort fortalt blir karboksymetylerede dekstranbiosensorbrikker (CM5, BIAcore Inc.) aktivert med N-etyl-N'-(3-dimetylaminopropyl)-karbodiimidhydroklorid (EDC) og N-hydroksysuksinimid (NHS) ifølge produsentens instruksjoner. Antigen blir fortynnet med 10 mM natriumacetat, pH 4,8 i 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ca. 0,2 μM) før injeksjon med en strømningshastighet på 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ for å oppnå omtrent 10 responsenheter (RU) med koblet protein. Etter injeksjonen av antigen blir 1 M etanolamin injisert for å blokkere ureagerte grupper. For kinetiske målinger blir to ganger seriefortynninger med Fab (0,78 nM til 500 nM injisert i PBS med 0,05 % Tween-20 (PBST) ved 25°C ved en strømningshastighet på omtrent 25 $\mu\text{l}/\text{min}$. Assosiasjonshastigheter (k_{on}) og dissosiasjonshastigheter (k_{off}) blir beregnet ved å benytte en enkel én-til-én Langmuir-bindingsmodell (BIAcore Evaluation Software versjon 3.2) ved samtidig å tilpasse assosiasjons- og dissosiasjonssensorgrammet. Likevektsdissosiasjonskonstanten (Kd) blir beregnet som forholdet $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$. Se f.eks. Chem, Y., et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881. Hvis på-hastigheten overskrider $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ ved hjelp av surface-plasmon-resonansanalysen ovenfor kan på-hastigheten bli bestemt ved å benytte en fluorescenslukkingsteknikk som måler økningen eller minskningen i fluorescensemisjonsintensitet (eksitasjon = 295 nm, emisjon =

340 nm, 16 nm båndpassering) ved 25°C for et 20 nM anti-antigenantistoff (Fab-form) i PBS, pH 7,2 i nærvær av økende konsentrasjoner av antigen som målt i et spektrometer, slik som et stoppstrømningsutstyrt spektrofotometer (Aviv Instruments) eller et 8000-serie SLM-Aminco-spektrofotometer (ThermoSpectronic) med en omrørt kyvette.

5 En "på-hastighet" eller "assosierings hastighet" eller "assosierings hastighet" eller " k_{on} " ifølge denne oppfinnelsen kan også bli bestemt ved hjelp av den samme surface-plasmon-resonansteknikken som er beskrevet ovenfor ved å benytte en BIAcore-2000 eller en BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) ved 25 °C med immobilisert antigen CM5-brikker ved ca. 10 responsenheter (RU). Kort fortalt blir karboksymetylerede dekstran-

10 biosensorbrikker (CM5, BIAcore Inc.) aktivert med N-etyl-N'-(3-dimetylaminopropyl)-karbodiimidhydroklorid (EDC) og N-hydroksysuksinimid (NHS) ifølge produsentens instruksjoner. Antigen blir fortynnet med 10 mM natriumacetat, pH 4,8 i 5 µg/ml (ca. 0,2 µM) før injeksjon ved en strømningshastighet på 5 µl/min for å oppnå omtrent 10 responsenheter (RU) med koblet protein. Etterpå blir 1 M etanolamin injisert for å blokkere

15 ureareagerte grupper. For kinetikk målinger blir to ganger seriefortynninger av Fab (0,78 nM til 500 nM) injisert i PBS med 0,05 % Tween-20 (PBST) ved 25 °C med en strømningshastighet på omtrent 25 µl/min. Assosiasjonshastigheter (k_{on}) og dissosiasjonshastigheter (k_{off}) blir beregnet ved å benytte en enkel én-til-én Langmuir-bindingsmodell (BIAcore Evaluation Software versjon 3.2) ved samtidig å tilpasse assosiasjons- og dissosiasjons-

20 sensorgrammet. Likevekt dissosiasjonskonstanten (K_d) ble beregnet som forholdet k_{off}/k_{on} . Se f.eks. Chen, Y., et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881. Hvis på-hastigheten overskrider $10^6 M^{-1} S^{-1}$ ved surface-plasmon-resonansanalysen ovenfor blir likevel på-hastigheten fortrinnsvis bestemt ved å benytte en fluorescenslukkingsteknikk som måler økningen eller

25 minskningen i fluorescensemisjonsintensitet (eksitasjon = 295 nm, emisjon = 340 nm, 16 nm båndpassering) ved 25 °C for et 20 nM anti-antigenantistoff (Fab-form) i PBS, pH 7,2 i nærvær av økende konsentrasjoner av antigen som målt i et spektrometer, slik som et stoppstrømningsutstyrt spektrofotometer (Aviv Instruments) eller en 8000-serie SLM-Aminco-spektrofotometer (ThermoSpectronic) med en omrørt kyvette. "Kd-verdien" eller

30 "Kd" ifølge denne oppfinnelsen blir i én utførelsesform målt i en bindingsanalyse med radiomerket antigen (RIA) utført med Fab-versjonen av antistoffet og antigenmolekyler som beskrevet av den følgende analysen som måler løsningsbindingsaffinitet for Fab'er for antigen ved å balansere Fab med en minimal konsentrasjon av (^{125}I)-merket antigen i nærvær av en titreringsserie med umerket antigen, deretter fange bundet antigen med en anti-Fab-antistoffbelagt plate (Chen, et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881). For å etablere

35 betingelser for analysen blir mikrotiterplater (Dynex) belagt over natt med 5 µg/ml med anti-Fab-innfangningsantistoff (Cappel Labs) i 50 mM natriumkarbonat (pH 9,6) og deretter blokkert med 2 % (vekt/volum) bovint serumalbumin i PBS i 2-5 timer ved romtemperatur (omtrent 23 °C). På en ikke-adsorberende plate (Nunc kat.# 269620) blir 100 pM eller 26 pM [^{125}I]-antigen blandet med seriefortynninger av en Fab av interesse (i overensstemmelse

med vurdering av et anti-VEGF-antistoff, Fab-12, i Presta et al., (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599). Fab av interesse ble deretter inkubert over natt, selv om inkuberingen kan fortsette i en lengre periode (f.eks. 65 timer) for å sikre at likevekt blir nådd. Deretter blir blandingene overført til innfangingsplaten for inkubering ved romtemperatur i 1 time.

5 Løsningen ble deretter fjernet og platen blir vasket 8 timer med 0,1 % Tween-20 i PBS. Når platene har tørket blir 150 μl /brønn med scintillasjonsmiddel (MicroScint-20, Packard) tilsatt og platene blir talt på en Topcount gammateller (Packard) i 10 min. Konsentrasjoner av hver Fab som gir mindre enn eller likt med 20 % av maksimal binding blir valgt til anvendelse i kompetitive bindingsanalyser. Ifølge en annen utførelsesform blir Kd eller Kd-verdien målt

10 ved å benytte surface-plasmon-resonansanalyse ved å benytte BIAcore™-2000 eller en BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) ved 25°C med immobilisert antigen CM5-brikke ved ca. 10 responsenheter (RU). Kort fortalt blir karboksymetylerede dekstranbiosensorbrikker (CM5, BIAcore Inc.) aktivert med N-etyl-N'-(3-dimetylaminopropyl)-karbodiimidhydroklorid (EDC) og N-hydroksysuksinimid (NHS) ifølge produsentens

15 instruksjoner. Antigen ble fortynt med 10 mM natriumacetat, pH 4,8 i 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ca. 0,2 μM) før injeksjon i en strømningshastighet på 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. for å oppnå omtrent 10 responsenheter (RU) med koblet protein. Etter injeksjonen av antigen blir 1 M etanolamin injisert for å blokkere ureagerede grupper. For kinetikkmålinger blir to ganger seriefortynninger av Fab (0,78 nM til 500 nM) injisert i PBS med 0,05 % Tween-20 (PBST) ved 25°C ved en

20 strømningshastighet på omtrent 25 $\mu\text{l}/\text{min}$. Assosiasjonshastigheter (k_{on}) og dissosiasjonshastigheter (k_{off}) blir beregnet ved å benytte en enkel én-til-én Langmuir-bindingsmodell (BIAcore Evaluation Software versjon 3.2) ved samtidig å tilpasse assosiasjons- og dissosiasjonssensorgrammet. Likevektsdissosiasjonskonstanten (Kd) blir beregnet som forholdet $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$. Se f.eks. Chen, Y., et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881. Hvis på-

25 hastigheten overskrider $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ ved hjelp av surface-plasmon-resonansanalysen ovenfor kan på-hastigheten bli bestemt ved å benytte en fluorescenslukkingsteknikk som måler økningen eller minsken i fluorescensemisjonsintensitet (eksitasjon = 295 nm, emisjon = 340 nm, 16 nm båndpassering) ved 25 °C for et 20 nM anti-antigenantistoff (Fab-form) i PBS, pH 7,2 i nærvær av økende konsentrasjoner av antigen som målt i et spektrometer, slik som et stoppstrømningsutstyrsspektrofotometer (Aviv Instruments) eller en 8000-serie SLM-Aminco-spektrofotometer (ThermoSpectronic) med en omrørt kyvette.

I én utførelsesform blir en "på-hastighet" eller "assosiasjonshastighet" eller " k_{on} " ifølge denne oppfinnelsen bestemt ved hjelp av den samme surface-plasmon-resonans-teknikken som er beskrevet ovenfor ved å benytte en BIAcore™-2000 eller en BIAcore™-

35 3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) ved 25 °C med immobilisert antigen CM5-brikke ved ca. 10 responsenheter (RU). Kort fortalt blir karboksymetylerede dekstranbiosensorbrikker (CM5, BIAcore Inc.) aktivert med N-etyl-N'-(3-dimetylaminopropyl)-karbodiimidhydroklorid (EDC) og N-hydroksysuksinimid (NHS) ifølge produsentens instruksjoner. Antigen blir fortynt med 10 mM natriumacetat, pH 4,8 i 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ca. 0,2 μM) før injeksjon i en

strømningshastighet på 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. for å oppnå omtrent 10 responsenheter (RU) med koblet protein. Deretter blir 1 M etanolamin injisert for å blokkere ureagerte grupper. For kinetikk-målinger blir to ganger seriefortynninger av Fab (0,78 nM til 500 nM) injisert i PBS med 0,05 % Tween-20 (PBST) ved 25°C ved en strømningshastighet på omtrent 25 $\mu\text{l}/\text{min}$.

- 5 Assosiasjonshastigheter (k_{on}) og dissosiasjonshastigheter (k_{off}) blir beregnet ved å benytte en enkel én-til-én Langmuir-bindingsmodell (BIAcore Evaluation Software versjon 3.2) ved samtidig å tilpasse assosiasjons- og dissosiasjonssensorgrammet. Likevektsdissosiasjonskonstanten (Kd) blir beregnet som forholdet $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$. Se f.eks. Chen, Y., et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881. Hvis på-hastigheten overskrider $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ ved surface-plasmon-
- 10 resonansanalysen ovenfor kan likevel på-hastigheten fortrinnsvis bli bestemt ved å benytte en fluorescensslukkingsteknikk som måler økningen eller minskingen i fluorescensemisjonsintensitet (eksitasjon = 295 nm, emisjon = 340 nm, 16 nm båndpassering) ved 25 °C for et 20 nM anti-antigenantistoff (Fab-form) i PBS, pH 7,2 i nærvær av økende konsentrasjoner av antigen som målt i et spektrometer, slik som et stoppstrømningsutstyrt
- 15 spektrofotometer (Aviv Instruments) eller et 8000-serie SLM-Aminco spektrofotometer (ThermoSpectronic) med en omrørt kyvette.

Uttrykket "vesentlig redusert" eller "vesentlig forskjellig", slik det blir benyttet her, betegner en tilstrekkelig høy grad av forskjell mellom to numeriske verdier (vanligvis én som er assosiert med et antistoff ifølge oppfinnelsen og den andre assosiert med et

20 referanse/sammenligningsantistoff) slik at en fagperson på området vil anse forskjellen mellom de to verdiene å være av statistisk signifikans i konteksten av det biologiske karakteristikum som blir målt ved nevnte verdier (Kd-verdier, HAMA-respons). Forskjellen mellom nevnte to verdier er fortrinnsvis større enn omtrent 10 %, fortrinnsvis større enn omtrent 20 %, fortrinnsvis større enn omtrent 30 %, fortrinnsvis større enn omtrent 40 %, fortrinnsvis omtrent større enn omtrent 50 % som en funksjon av verdien for referanse/-

25 sammenligningsantistoffet.

"Prosentvis (%) aminosyresekvensidentitet" med hensyn på en peptid- eller polypeptidsekvens er definert som prosentandelen av aminosyrerester i en kandidatsekvens som er identiske med aminosyrerestene i den spesifikke peptid- eller polypeptidsekvensen,

30 etter å ha sammenstilt sekvensene og introdusert åpningen, hvis det er nødvendig, for å oppnå den maksimale, prosentvise sekvensidentiteten, og uten å overveie eventuelle konservative substitusjoner som del av sekvensidentiteten. Sammenstilling for formål av å bestemme prosentvis aminosyresekvensidentitet kan bli oppnådd på ulike måter som ligger innenfor kunnskapen på fagområdet, for eksempel ved å benytte allment tilgjengelig data-

35 programvare slik som BLAST, BLAST-2, ALIGN eller Megalign (DNASTAR)-programvare. Fagfolk på området kan bestemme passende parametere for å måle sammenstilling, inkludert enhver algoritme som er nødvendig for å oppnå maksimal sammenstilling over den fulle lengden av sekvensene som blir sammenlignet. For formål her blir likevel prosentvise aminosyresekvensidentitetsverdier generert ved å benytte sekvenssammenlignings-

dataprogrammet ALIGN-2, der den fullstendige kildekoden for ALIGN-2-programmet er tilveiebrakt i tabell A nedenfor. ALIGN-2-sekvenssammenligningsdataprogrammet ble skrevet av Genentech, Inc., og kildekoden som er vist i tabell A nedenfor har blitt innsatt med brukerdokumentasjon til the US Copyright Office, Washington D.C., 20559, der den er

5 registrert under US Copyright Registration nr. TXU510087. ALIGN-2-programmet er allment tilgjengelig via Genentech, Inc., South San Francisco, California eller kan bli kompilert fra kildekoden som er tilveiebrakt i fig. 8 ovenfor. ALIGN-2-programmet bør bli kompilert for anvendelse på et UNIX-operasjonssystem, fortrinnsvis digital UNIX 4.0D. Alle sekvenssammenligningsparametere er satt i ALIGN-2-programmet og varierer ikke.

10 I situasjoner der ALIGN-2 blir benyttet til aminosyresekvenssammenligninger blir den prosentvise aminosyresekvensidentiteten for en gitt aminosyresekvens A til, med eller mot enhver gitt aminosyresekvens B (som alternativt kan bli betegnet som en gitt aminosyresekvens A som har eller omfatter en viss, prosentvis aminosyresekvensidentitet til, med eller mot en gitt aminosyresekvens B) beregnet som følger:

$$15 \quad 100 \text{ ganger fraksjon } X/Y$$

der X er antall aminosyrerester som er verdiskåret som identiske matcher ved hjelp av sekvenssammenstillingsprogrammet ALIGN-2 i dette programmets sammenstilling av A og

20 B, og der Y er det totale antallet aminosyrerester i B. Det er på det rene at der lengden av aminosyresekvens A ikke er lik lengden til aminosyresekvens B så vil ikke den prosentvise aminosyresekvensidentiteten for A i forhold til B være lik den prosentvise aminosyresekvensidentiteten for B i forhold til A.

Dersom ikke annet spesifikt er bemerket, er alle prosentvise

25 aminosyresekvensidentitetsverdier som blir benyttet her fremskaffet som beskrevet i det umiddelbart påfølgende avsnittet ved å benytte ALIGN-2-dataprogrammet.

Tabell A

```

/*
*
* C-C increased from 12 to 15
* Z is average of EQ
* B is average of ND
* match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
*/
#define _M      -8      /* value of a match with a stop */

int    _day[26][26] = {
/*   A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */  { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
/* B */  { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
/* C */  {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
/* D */  { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
/* E */  { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
/* F */  {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
/* G */  { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
/* H */  {-1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
/* I */  {-1, -2, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},
/* J */  { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */  {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
/* L */  {-2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
/* M */  {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},
/* N */  { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},
/* O */  { _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M,
0, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M,
/* P */  { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0},
/* Q */  { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -5, 0, -4, 3},
/* R */  {-2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0},
/* S */  { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0},
/* T */  { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0},
/* U */  { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */  { 0, -2, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2},
/* W */  {-6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -5, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6},
/* X */  { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},

```

```

/* Y */ { -3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4},
/* Z */ { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
};

/*
*/
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP      16      /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP     24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS       1024    /* max jmps in an path */
#define MX         4       /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT       3       /* value of matching bases */
#define DMIS       0       /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0      8       /* penalty for a gap */
#define DINS1      1       /* penalty per base */
#define PINS0      8       /* penalty for a gap */
#define PINS1      4       /* penalty per residue */

struct jmp {
    short          n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
};
/* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
    int            score;     /* score at last jmp */
    long           offset;    /* offset of prev block */
    short          ijmp;      /* current jmp index */
    struct jmp     jp;        /* list of jmps */
};

struct path {
    int            spc;       /* number of leading spaces */
    short         n[JMPS];    /* size of jmp (gap) */
    int           x[JMPS];    /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

```

```

};

char      *ofile;          /* output file name */
char      *namex[2];      /* seq names: getseqs() */
char      *prog;          /* prog name for err msgs */
char      *seqx[2];        /* seqs: getseqs() */
int       dmax;           /* best diag: nw() */
int       dmax0;          /* final diag */
int       dna;            /* set if dna: main() */
int       endgaps;        /* set if penalizing end gaps */
int       gapx, gapy;     /* total gaps in seqs */
int       len0, len1;     /* seq lens */
int       ngapx, ngapy;   /* total size of gaps */
int       smax;           /* max score: nw() */
int       *xbm;           /* bitmap for matching */
long      offset;        /* current offset in jmp file */
struct    diag *dx;       /* holds diagonals */
struct    path pp[2];     /* holds path for seqs */

char      *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char      *getseq(), *g_calloc();

```

```

/* Needleman-Wunsch alignment program

```

```

*

```

```

* usage: progs file1 file2

```

```

* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.

```

```

* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity

```

```

* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored

```

```

* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)

```

```

* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA

```

```

* Output is in the file "align.out"

```

```

*

```

```

* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.

```

* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650

*/

#include "nw.h"

#include "day.h"

```
static _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};
```

```
static _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};
```

main(ac, av) _____ main

```
    int    ac;
    char   *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0;                /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out";        /* output file */
}
```

```

nw();      /* fill in the matrix, get the possible jumps */
readjumps(); /* get the actual jumps */
print();   /* print stats, alignment */

cleanup(0); /* unlink any tmp files */
}

```

```
/* do the alignment, return best score: main()
```

```
* dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
```

```
* pro: PAM 250 values
```

```
* When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
```

```
* a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
```

```
* to a gap in seq y.
```

```
*/
```

```
nw()
```

```
nw
```

```

{
    char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int       *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
    int       ndelx, delx;      /* keep track of delx */
    int       *tmp;             /* for swapping row0, row1 */
    int       mis;              /* score for each type */
    int       ins0, ins1;       /* insertion penalties */
    register  id;               /* diagonal index */
    register  ij;               /* jmp index */
    register  *col0, *col1;     /* score for curr, last row */
    register  xx, yy;           /* index into seqs */

```

```
dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
```

```
ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
```

```
dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
```

```
col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
```

```
col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
```

```
ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
```

```

ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

smax = -10000;
if (endgaps) {
    for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
        col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
        ndely[yy] = yy;
    }
    col0[0] = 0;    /* Waterman Bull Math Biol 84 */
}
else
    for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
        dely[yy] = -ins0;

/* fill in match matrix
*/
for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
    /* initialize first entry in col
    */
    if (endgaps) {
        if (xx == 1)
            col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
        else
            col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
        ndelx = xx;
    }
    else {
        col1[0] = 0;
        delx = -ins0;
        ndelx = 0;
    }
}

```

```

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
    mis = col0[yy-1];
    if (dna)

```

```

    mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
else
    mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

/* update penalty for del in x seq;
* favor new del over ongong del
* ignore MAXGAP if weighting endgaps
*/
if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
    if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
        ndely[yy] = 1;
    } else {
        dely[yy] -= ins1;
        ndely[yy]++;
    }
} else {
    if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
        ndely[yy] = 1;
    } else
        ndely[yy]++;
}

/* update penalty for del in y seq;
* favor new del over ongong del
*/
if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
    if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1;
    } else {
        delx -= ins1;
        ndelx++;
    }
} else {
    if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {

```

```

        delx = coll[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1;
    } else
        ndelx++;
}

```

```

/* pick the maximum score; we're favoring
 * mis over any del and delx over dely
 */

```

```

...llw

id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    coll[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    coll[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = delx;
}

```

```

else {
    coll[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejumps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = dely[yy];
}
if (xx == len0 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        coll[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
    if (coll[yy] > smax) {
        smax = coll[yy];
        dmax = id;
    }
}
}
if (endgaps && xx < len0)
    coll[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (coll[yy-1] > smax) {
    smax = coll[yy-1];
    dmax = id;
}
}
tmp = col0; col0 = coll; coll = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);

```

```

        (void) free((char *)dely);
        (void) free((char *)col0);
        (void) free((char *)col1);    }

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

#define SPC      3
#define P_LINE   256 /* maximum output line */
#define P_SPC   3 /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int    olen; /* set output line length */
FILE   *fx; /* output file */

print() _____ print
{
    int    lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);

```

```

fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
olen = 60;
lx = len0;
ly = len1;
firstgap = lastgap = 0;
if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
    pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
    ly -= pp[0].spc;
}
else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
    pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
    lx -= pp[1].spc;
}
if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
    lastgap = len0 - dmax0 - 1;
    lx -= lastgap;
}
else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
    lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
    ly -= lastgap;
}
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
pr_align();
}

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap) _____ getmat
    int    lx, ly;                /* "core" (minus endgaps) */
    int    firstgap, lastgap;     /* leading trailing overlap */
{
    int    nm, i0, i1, siz0, siz1;

```

```

char      outx[32];
double    pct;
register   n0, n1;
register char *p0, *p1;

/* get total matches, score
*/
i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
n0 = pp[1].spc + 1;
n1 = pp[0].spc + 1;

nm = 0;
while ( *p0 && *p1 ) {
    if (siz0) {
        p1++;
        n1++;
        siz0--;
    }
    else if (siz1) {
        p0++;
        n0++;
        siz1--;
    }
    else {
        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
            nm++;
        if (n0++ == pp[0].x[i0])
            siz0 = pp[0].n[i0++];
        if (n1++ == pp[1].x[i1])
            siz1 = pp[1].n[i1++];
        p0++;
        p1++;
    }
}
}

```

```

/* pct homology:
 * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
 * else, knock off overhangs and take shorter core
 */
if (endgaps)
    lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
else
    lx = (lx < ly)? lx : ly;
pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
fprintf(fx, "\n");
fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "":"s");
    fprintf(fx, "%s", outx);
}

fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
if (gapy) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "":"s");
    fprintf(fx, "%s", outx);
}
if (dna)
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
        smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
else
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
        smax, PINS0, PINS1);
if (endgaps)

```

```

fprintf(fx,
"<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
else
fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}

static      nm;          /* matches in core -- for checking */
static      lmax;       /* lengths of stripped file names */
static      ij[2];      /* jmp index for a path */
static      nc[2];      /* number at start of current line */
static      ni[2];      /* current elem number -- for gapping */
static      siz[2];
static char *ps[2];     /* ptr to current element */
static char *po[2];     /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align() _____ pr_align
{
    int      nn;        /* char count */
    int      more;
    register      i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(name[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;

        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
    }
}

```

```

ps[i] = seqx[i];
po[i] = out[i];      }

```

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more;) { _____...pr_align
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;

        more++;

        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
                */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;

            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location

```

```

        */
        siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
        while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
            siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
    }
    ni[i]++;
}
}
if (++nn == olen || !more && nn) {
    dumpblock();
    for (i = 0; i < 2; i++)
        po[i] = out[i];
    nn = 0;
}
}
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock() _____ dumpblock
{
    register    i;

    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';

    _____ ...dumpblock

    (void) putc('\n', fx);
    for (i = 0; i < 2; i++) {
        if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
            if (i == 0)
                nums(i);
            if (i == 0 && *out[1])
                stars();
        }
    }
}

```

```

        putline(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        if (i == 1)
            nums(i);
    }
}

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix) _____ nums
{
    int    ix;    /* index in out[] holding seq line */
    {
        char    nline[P_LINE];
        register    i, j;
        register char    *pn, *px, *py;

        for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
            *pn = ' ';
        for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
            if (*py == ' ' || *py == '-')
                *pn = ' ';
            else {
                if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                    j = (i < 0)? -i : i;
                    for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                        *px = j%10 + '0';
                    if (i < 0)
                        *px = '-';
                }
                else
                    *pn = ' ';
                i++;
            }
        }
    }
}

```

```

    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix) _____putline
    int    ix;          {
_____...putline

    int    i;
    register char *px;

    for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
        (void) putc(*px, fx);
    for (; i < lmax+P_SPC; i++)
        (void) putc(' ', fx);

    /* these count from 1:
     * ni[] is current element (from 1)
     * nc[] is number at start of current line
     */
    for (px = out[ix]; *px; px++)
        (void) putc(*px&0x7F, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()

```

```

*/
static
stars()
{
    int          i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

    if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '.';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

```

/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)_____stripname
    char *pn; /* file name (may be path) */
{
    register char *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char *jname = "/tmp/homgXXXXXX"; /* tmp file for jumps */
FILE *fj;

int cleanup(); /* cleanup tmp file */
long lseek();

```

```

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i) _____ cleanup
    int    i;
{
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char *
getseq(file, len) _____ getseq
    char *file; /* file name */
    int *len; /* seq len */
{
    char line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int natgc, tlen;
    FILE *fp;

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))

```

```

        tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';

```

...getseq

```

py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++;
    }
}
*py++ = '\0';
*py = '\0';
(void) fclose(fp);
dna = natgc > (tlen/3);
return(pseq+4);
}

```

char *

g_calloc(msg, nx, sz)

g_calloc

char *msg; /* program, calling routine */

```

int    nx, sz;          /* number and size of elements */
{
char    *px, *calloc();

if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
    if (*msg) {
        fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx,
sz);
        exit(1);
    }
}
return(px);
}

/*
* get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
*/
readjumps()-----readjumps
{
    int        fd = -1;
    int        siz, i0, i1;
    register   i, j, xx;

    if (fj) {
        (void) fclose(fj);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }

    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                ;


---


            if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {

```

```

        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
    }
    else
        break;
}
if (i >= JMPS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
    cleanup(1);
}
if (j >= 0) {
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
    if (siz < 0) {          /* gap in second seq */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1
        */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) {    /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}

```

```

        }
        else
            break;
    }

    /* reverse the order of jmps
    */
    for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
        i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
        i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
    }
    for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
        i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
        i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
    }
    if (fd >= 0)
        (void) close(fd);
    if (fj) {
        (void) unlink(jname);
        fj = 0;
        offset = 0;
    }
}

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejumps(ix) _____ writejumps
    int    ix;
{
    char    *mktemp();

    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }
}

```

```

if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
    fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
    exit(1);
}
}
(void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
(void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);

```

Uttrykket "vektor" slik det blir benyttet her er ment å skulle referere til et nukleinsyremolekyl som er i stand til å transportere en annen nukleinsyre som den har blitt koblet til. En type vektor er et "plasmid" som refererer til en sirkulær, dobbelttrådet DNA-løkke på hvilken ytterligere DNA-segmenter kan bli ligert. En annen type vektor er en bakteriofagvektor. En annen type vektor er en virusvektor, der ytterligere DNA-segmenter kan bli ligert til virusgenomet. Visse vektorer er i stand til å utføre autonom replikasjon i en vertscelle som de har blitt introdusert inn i (f.eks. bakterievektorer som har et replikasjonsorigo fra bakterier og episomale pattedyrvektorer). Andre vektorer (f.eks. ikke-episomale pattedyrvektorer) kan bli integrert inni genomet til en vertscelle ved introduksjon inn i vertscellen, og replikerer derved sammen med vertsgenomet. Visse vektorer er videre i stand til å styre ekspresjonen av gener som de er opererbart bundet til. Slike vektorer blir her referert til som "rekombinante ekspresjonsvektorer" (eller ganske enkelt "rekombinante vektorer"). Vanligvis foreligger ekspresjonsvektorer som kan benyttes i rekombinante DNA-teknikker ofte i form av plasmider. I foreliggende oppfinnelse kan "plasmid" og "vektor" bli benyttet om hverandre siden plasmidet er den mest vanlig benyttede formen for vektor.

"Polynukleotid" eller "nukleinsyre", slik de blir benyttet om hverandre her, refererer til polymerer av nukleotider med enhver lengde og inkluderer DNA og RNA. Nukleotidene kan være deoksyribonukleotider, ribonukleotider, modifiserte nukleotider eller baser og/eller deres analoger, eller et hvilket som helst substrat som kan bli inkorporert i en polymer ved hjelp av DNA- eller RNA-polymerase, eller ved hjelp av en syntetisk reaksjon. Et polynukleotid kan omfatte modifiserte nukleotider, slik som metylerte nukleotider og deres analoger. Hvis de er til stede kan modifiseringer av nukleotidstrukturen bli innført før eller etter sammensetning av polymeren. Sekvensene av nukleotider kan være avbrutt av ikke-nukleotidkomponenter. Et polynukleotid kan ytterligere bli modifisert etter syntese, slik som ved konjugering med et merke. Andre typer av modifiseringer inkluderer for eksempel "caps", substitusjon av én eller flere av de naturlig forekommende nukleotidene med en analog, internukleotidmodifisering slik som for eksempel de med uladete bindinger (f.eks. metylfosfonater, fosfotriester, fosfoamidater, karbamater, osv.) og med ladete bindinger (f.eks. fosforotioater, fosforoditioater, osv.), de som inneholder vedhengende enheter, slik som for eksempel proteiner (f.eks. nukleaser, toksiner, antistoffer, signalpeptider, ply-L-

lysin, osv.), de med interkalatorer (f.eks. akridin, psoralen, osv.), de som inneholder gelatorer (f.eks. metaller, radioaktive metaller, bor, oksidative metaller, osv.), de som inneholder alkylatorer, de med modifiserte bindinger (f.eks. alfaanomere nukleinsyrer, osv.), i tillegg til ikke-modifiserte former av polynukleotidene. Enhver av hydroksylgruppene som ordinært foreligger på sukkertypene kan videre bli erstattet for eksempel med fosfonat-

5 grupper, fosfatgrupper, beskyttet av standard beskyttelsesgrupper, eller aktivert for å lage ytterligere bindinger til ytterligere nukleotider, eller kan være konjugert til faste eller halvfaste bærere. Den 5' og 3' terminale OH kan være fosforylert eller substituert med aminer eller organiske cappinggruppeenheter på fra 1-20 karbonatomer. Andre hydroksyler

10 kan også være derivatiserte til standard beskyttelsesgrupper. Polynukleotider kan også inneholde analoge former av ribose eller deoksyribosesukkertyper som generelt er kjent på fagområdet, inkludert for eksempel 2'-O-metyl-, 2'-O-allyl, 2'-fluor- eller 2'-azidoribose, karbosyklisk sukkeranaloger, alfa-anomere sukkertyper, epimere sukkertyper slik som arabinose, xyloser eller lyksoser, pyranosesukre, furanosesukre, sedoheptuloser, asykliske

15 analoger og abasiske nukleosidanaloger slik som metylribosid. Én eller flere fosfodiesterbindinger kan bli erstattet med alternative linkergrupper. Disse alternative linkergruppene inkluderer utførelsesformer der fosfat blir erstattet av P(O)S("tioat"), P(S)S("ditioat"), "(O)NR.sub.2("amidat"), P(O)R, P(O)OR', CO eller CH.sub.2("formacetal"), der hver R eller R' uavhengig er H eller substituert eller ikke-substituert alkyl (1-20 C.) eventuelt

20 inneholdende en eter(-O-)-binding, aryl, alkenyl, sykloalkyl, sykloalkenyl eller araldyl. Ikke alle bindinger i et polynukleotid trenger å være identiske. Den foregående beskrivelsen gjelder alle polynukleotider som er referert til her, inkludert RNA og DNA.

"Oligonukleotid", slik det blir benyttet her, refererer vanligvis til korte, vanligvis enkeltrådede, vanligvis syntetiske polynukleotider som vanligvis, men ikke nødvendigvis, er

25 på mindre enn omtrent 200 nukleotider i lengde. Uttrykkene "oligonukleotid" og "polynukleotid" er ikke gjensidig utelukkende. Beskrivelsen ovenfor for polynukleotider er like og full anvendelig for oligonukleotider.

Uttrykkene "antistoff" og "immunglobulin" blir benyttet om hverandre i sin bredeste betydning og inkluderer monoklonale antistoffer (for eksempel fullengde eller intakte

30 monoklonale antistoffer), polyklonale antistoffer, multivalente antistoffer, multi-spesifikke antistoffer (f.eks. bispesifikke antistoffer så lenge de oppviser den ønskede, biologiske aktiviteten) og kan også inkludere visse antistoff-fragmenter (som beskrevet i større detalj her). Et antistoff kan være humant, humanisert og/eller affinitetsmodnet.

"Antistoff-fragmenter" omfatter kun en del av et intakt antistoff, der delen

35 fortrinnsvis opprettholder minst én, fortrinnsvis de fleste eller alle, av funksjonene som normalt er assosiert med denne delen når den foreligger på et intakt antistoff. I én utførelsesform omfatter et antistoff-fragment et antigenbindingssete fra det intakte antistoffet og opprettholder slik evnen til å binde antigen. I en annen utførelsesform opprettholder et antistoff-fragment, f.eks. et som omfatter Fc-regionen, minst én av de

biologiske funksjonene som normalt er assosiert med Fc-regionen når den foreligger på et intakt antistoff, slik som FcRn-binding, antistoffhalveringstidmodulering, ADCC-funksjon og komplementbinding. I én utførelsesform er et antistoff-fragment et monovalent antistoff som har en halveringstid *in vivo* som vesentlig er lik den for et intakt antistoff. Et slikt antistoff-fragment kan for eksempel omfatte en antigenbindende arm koblet til en Fc-sekvens som er i stand til å overføre *in vivo*-stabilitet til fragmentet.

Uttrykket "monoklonalt antistoff" refererer slik det blir benyttet her til et antistoff som er fremskaffet fra en populasjon av vesentlig homogene antistoffer, dvs. at de individuelle antistoffene som utgjør populasjonen er identiske bortsett fra mulige, naturlig forekommende mutasjoner som kan foreligge i mindre mengder. Monoklonale antistoffer er svært spesifikke, i det de er rettet mot et enkelt antigen. I motsetning til polyklonale antistoffsammensetninger som typisk inkluderer ulike antistoffer som er rettet mot ulike determinanter (epitoper) så er videre hvert monoklonale antistoff rettet mot en enkelt determinant på antigenet.

De monoklonale antistoffene her inkluderer spesifikt "kimære" antistoffer der en del av den tunge og/eller lette kjeden er identisk med eller homolog med tilsvarende sekvenser i antistoffer som er avledet fra en spesiell art eller som tilhører en spesiell antistoffklasse eller -underklasse, der resten av kjeden(e) er identisk med eller homolog med tilsvarende sekvenser i antistoffer som er avledet fra en annen art eller som tilhører en annen antistoffklasse eller -underklasse, i tillegg til fragmenter av slike antistoffer, så lenge de oppviser den ønskede, biologiske aktiviteten (US patentskrift nr. 4 816 567 og Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)).

"Humaniserte" former av ikke-humane (f.eks. murine) antistoffer er kimære antistoffer som inneholder minimalt med sekvens avledet fra ikke-humant immunglobulin. For det meste er humaniserte antistoffer humane immunglobuliner (mottakerantistoff) der rester fra en hypervariabel region hos mottakeren er erstattet med rester fra en hypervariabel region fra en ikke-human art (donorantistoff) slik som mus, rotte, kanin eller ikke-human primat som har den ønskede spesifisiteten, affiniteten og kapasiteten. I noen tilfeller er rammeverksregionen (FR)-rester for det humane immunglobulinet erstattet med tilsvarende ikke-humane rester. Videre kan humaniserte antistoffer omfatte rester som ikke er funnet i mottakerantistoffet eller i donorantistoffet. Disse modifiseringene ble gjort for ytterligere å forbedre antistoffytelsen. Vanligvis vil det humaniserte antistoff omfatte vesentlig alle eller minst én, og typisk to, variable domener, der alle eller vesentlig alle de hypervariable løkkene tilsvarer de fra et ikke-humant immunglobulin og der alle eller vesentlig alle FR'ene er de fra en human immunglobulinsekvens. Det humaniserte antistoffet vil eventuelt også omfatte minst en del av en immunglobulin konstantregion (Fc), typisk den for et humant immunglobulin. For ytterligere detaljer, se Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986), Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988), og Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Se også de følgende i oppsummeringsartiklene og referansene som er

sitert der: Vaswani og Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998), Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995), Hurle og Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

Et "antigen" er et forhåndsbestemt antigen som et antistoff kan binde selektivt til.
 5 Målantigenet kan være polypeptid, karbohydrat, nukleinsyre, lipid, haptent eller annen naturlig forekommende eller syntetisk forbindelse. Fortrinnsvis er målantigenet et polypeptid. Et "humant akseptorrammeverk" for formålet her er et rammeverk som omfatter aminosyresekvensen til et VL- eller VH-rammeverk som er avledet fra et humant immunglobulin-rammeverk, eller fra et humant konsensus-rammeverk. Et humant
 10 akseptorrammeverk "som er avledet fra" et humant immunglobulin-rammeverk eller humant konsensus-rammeverk kan omfatte den samme aminosyresekvensen derav, eller kan inneholde allerede eksisterende aminosyresekvensendringer. Der allerede eksisterende aminosyreendringer foreligger er fortrinnsvis ikke mer enn 5 og fortrinnsvis 4 eller færre, eller 3 eller færre, forhånds eksisterende aminosyreendringer tilstede. Der allerede
 15 eksisterende aminosyreendringer foreligger i en VH foreligger fortrinnsvis disse endringene kun på tre, to eller én av posisjonene 71H, 73H og 78H, for eksempel kan aminosyrerestene på disse posisjonene være 71A, 73T og/eller 78A. I én utførelsesform er det humane VL-akseptorrammeverket identisk i sekvens med den humane VL-immunglobulin-rammeverksekvensen eller den humane konsensus-rammeverksekvensen.

20 Et "humant konsensus-rammeverk" er et rammeverk som representerer den mest vanlige forekommende aminosyrerest i et utvalg av humane immunglobulin-VL- eller -VH-rammeverksekvenser. Generelt er utvalget av humane immunglobulin-VL- eller -VH-sekvenser fra en undergruppe av variabeldomenesekvenser. Vanligvis er undergruppen av sekvenser en undergruppe som i Kabat et al. I én utførelsesform for VL er undergruppen
 25 undergruppe-kappa-I som i Kabat et al. I én utførelsesform for VH er undergruppen undergruppe-III som i Kabat et al.

Et "VL-undergruppe-I-konsensusrammeverk" omfatter konsensussekvensen som er fremskaffet fra aminosyresekvensene i variabel lett kappa-undergruppe-I ifølge Kabat et al. I én utførelsesform omfatter VL-undergruppe-I-konsensus-rammeverksaminosyresekvensen
 30 minst en del av eller alt av de følgende sekvensene:
 DIQMTWSPSSLSASVGDRTITC (SEKV. ID nr. 34)-L1-WYQQKPGKAPKLLI (SEKV. ID nr. 35)-
 L2-GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEKV. ID nr. 36)-L3-FGQGTKVEIKR (SEKV. ID nr. 37).

Et "VH-undergruppe-III-konsensusrammeverk" omfatter konsensussekvensen som er fremskaffet fra aminosyresekvensene i variabel tungundergruppe-III ifølge Kabat et al. I én utførelsesform omfatter VH-undergruppe-III-konsensusrammeverksaminosyresekvensen
 35 minst en del av eller alt av hver av de følgende sekvensene:
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEKV. ID nr. 38)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEKV. ID NR.

39)-H2-RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCA (SEKV. ID nr. 40)-H3-WGQGTLVTVSS (SEKV. ID nr. 41).

Et "ikke-modifisert, humant rammeverk" er et humant rammeverk som har den samme aminosyresekvensen som det humane akseptorrammeverket, f.eks. mangler den humane til ikke-humane aminosyresubstitusjoner i det humane akseptorrammeverket.

En "endret hypervariabel region" for formålene her er en hypervariabel region som omfatter én eller flere (f.eks. 1 til omtrent 16) aminosyresubstitusjoner i denne.

En "ikke-modifisert hypervariabel region" for formålene her er en hypervariabel region som har den samme aminosyresekvensen som et ikke-humant antistoff fra hvilket den er avledet, dvs. en som mangler én eller flere aminosyresubstitusjoner i denne.

Uttrykket "hypervariabel region", "HVR" eller "HV" refererer når de blir benyttet her til regionene på et antistoffvariabeldomene som er hypervariable i sekvens og/eller som danner strukturelt definerte løkker. Generelt omfatter antistoffer seks hypervariable regioner, tre i VH (H1, H2, H3) og tre i VL (L1, L2, L3). Et antall hypervariabel region-utledninger er i bruk og er omfattet her. De komplementaritetsbestemmende regionene (CDR) ifølge Kabat er basert på sekvensvariabilitet og er de som er mest vanlig benyttet (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5. utgave, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia refererer isteden til lokaliseringen for de strukturelle løkkene (Chothia og Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). AbM-hypervariabel regionene representerer et kompromiss mellom CDR'en ifølge Kabat og strukturelle løkker ifølge Chothia, og blir benyttet av Oxford Molecular's AbM-antistoffmodelleringsprogramvaren. "Kontakthypervariabel regionene" er basert på en analyse av de tilgjengelige, komplekse krystallstrukturene. Restene fra hver av disse hypervariable regionene er vist nedenfor.

25

Tabell 1

Løkke	Kabat	AbM	Chothia	Kontakt
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1 Kabat- nummerering	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
H1 Chothia- nummerering	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Hypervariable regioner kan omfatte "forlengede hypervariable regioner" som følger: 24-36 eller 24-34 (L1), 46-56 eller 49-56 eller 50-56 eller 52-56 (L2) og 89-97 (L3) i VL og 26-35 (H1), 50-65 eller 49-65 (H2) og 93-102, 94-102 eller 95-102 (H3) i VH. De variable domenerestene er nummerert ifølge Kabat et al., ovenfor, for hver av disse definisjonene.

5 "Rammeverksrester" eller "FR-rester" er de variable domenerestene som er forskjellige fra de hypervariable regionrestene slik de er definert her.

Et "humant antistoff" er ett som innehar en aminosyresekvens som tilsvarer den for et antistoff som er produsert av et menneske og/eller har blitt fremstilt ved å benytte enhver av teknikkene for å fremstille humane antistoffer som er tilkjennegjort her. Denne 10 definisjonen av et humant antistoff ekskluderer spesifikt et humanisert antistoff som omfatter ikke-humane, antigenbindende rester.

Et "affinitetsmodnet" antistoff er ett med én eller flere endringer i én eller flere CDR'er derav som fører til en forbedring i affiniteten for antistoffet for antigen, sammenlignet med et opphavsantistoff som ikke innehar disse endringene. Foretrukne, 15 affinitetsmodnede antistoffer vil ha nanomolare eller til og med pikomolare affiniteter for målantigenet. Affinitetsmodnede antistoffer blir fremstilt ved hjelp av prosedyrer som er kjent på fagområdet. Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) beskriver affinitetsmodning ved hjelp av VH- og VL-domeneombyting. Tilfeldig mutagenese av CDR og/eller rammeverksrester er beskrevet av: Barbas et al. *Proc. Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 20 (1994), Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995), Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995), Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995), og Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

Et "blokkerende antistoff" eller et "antagonistantistoff" er ett som inhiberer eller reduserer biologisk aktivitet for antigenene det binder til. Foretrukne blokkerende antistoffer 25 eller antagonistantistoffer inhiberer vesentlig eller fullstendig den biologiske aktiviteten til antigenet.

Et "agonistantistoff" er slik det blir benyttet her et antistoff som hermer minst én av de funksjonelle aktivitetene til et polypeptid.

En "forstyrrelse" er enhver tilstand som vil dra nytte av behandling med et 30 stoff/molekyl eller fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen. Disse inkluderer kroniske og akutte forstyrrelser eller sykdommer inkludert de patologiske tilstandene som predisponerer pattedyret overfor forstyrrelsen det er snakk om. Eksempler på forstyrrelse som skal bli behandlet her inkluderer maligne og godartede tumorer, ikke-leukemier og lymfoide maligniteter, nevronforstyrrelse, gliforstyrrelse, asterocytforstyrrelser, hypotalamus- 35 forstyrrelser og andre kjertel-, makrofag-, epitel-, stromal- og blastocytforstyrrelser, og inflammatoriske forstyrrelser, immunologiske forstyrrelser og andre angiogenesebeslektede forstyrrelser.

Uttrykket "immunrelatert sykdom" betyr en sykdom der en komponent i immunsystemet hos et pattedyr forårsaker, medierer eller på annen måte bidrar til

sykelighet hos pattedyret. Også inkludert er sykdommer der stimulering eller intervensjon i immunresponsen har en lindrende effekt på utvikling av sykdommen. Inkludert innenfor dette uttrykket er immunmedierte, inflammatoriske sykdommer, ikke-immunmedierte inflammatoriske sykdommer, smittsomme sykdommer, immunsviktsykdommer, neoplasi, osv.

Eksempler på immunrelaterte sykdommer og inflammatoriske sykdommer, der noen er immuncellemedierte eller T-cellemedierte, som kan bli behandlet ifølge foreliggende oppfinnelse inkluderer systemisk lupus erytematosus, revmatoid artritt, juvenil kronisk artritt, spondyloartropati, systemisk sklerose (skleroderma), idiopatisk inflammatoriske myopatii (dermatomyositt, polymyositt), Sjøgrens syndrom, systemisk vaskulitt, sarkoidose, autoimmun hemolyttisk anemi (immunpancytopeni), paroksysmal nokturnal hemoglobinuri), autoimmun trombocytopeni (idiopatisk trombocytopenisk purpura, immunmediert trombocytopeni), tyroiditt (Graves sykdom, Hashimotos tyroiditt, juvenil lymfocytt tyroiditt, atrofisk tyroiditt), diabetes mellitus, immunmediert nyresykdom (glomerulonefritt, tubulointerstitiell nefritt), demyelinerende sykdommer i det sentrale og perifere nervesystem slik som multippel sklerose, idiopatisk demyelinerende polyneuropati eller Guillain-Barré syndrom og kronisk inflammatorisk demyelinerende polyneuropati, hepatobiliære sykdommer slik som smittsom hepatitt (hepatitt A, B, C, D, E og andre ikke-hepatotropiske virus), autoimmun kronisk aktiv hepatitt, primær biliær cirrose, granulomatøs hepatitt og skleroserende kolangitt, inflammatorisk tarmsykdom (ulcerøs kolitt, Crohns sykdom), glutensensitiv enteropati og Whipples sykdom, autoimmun eller immunmedierte hudsykdommer inkludert bulløse hudsykdommer, erytema multiforme og kontaktdermatitt, psoriasis, allergiske sykdommer slik som astma, allergisk rinitt, atopisk dermatitt, matvarehypersensitivitet og urtikaria, immunologiske sykdommer i lunger slik som eosinofile lungebetennelser, idiopatisk pulmonal fibrose og en hypersensitivitets-lungebetennelse, transplantasjonsassosierte sykdommer inkludert transplantatavstøtning og transplantat-versus-vert-sykdom. Smittsomme sykdommer inkluderer virussykdommer slik som AIDS (HIV-infeksjon), hepatitt A, B, C, D og E, herpes, osv., bakterieinfeksjoner, soppinfeksjoner, protozoainfeksjoner og parasittinfeksjoner.

En "autoimmun forstyrrelse" eller "autoimmun sykdom" slik de blir benyttet om hverandre her er en ikke-malign sykdom eller forstyrrelse som fremkommer fra og som er rettet mot et individs egne vev. De autoimmune sykdommene som er beskrevet her ekskluderer spesifikt maligne sykdommer eller kreftsykdommer eller krefttilstander, og ekskluderer spesielt B-cellelymfom, akutt lymfoblastleukemi (ALL), kronisk lymfocytteleukemi (CLL), hårcelleleukemi og kronisk myeloblastleukemi. Eksempler på autoimmune sykdommer eller forstyrrelser inkluderer inflammatoriske responser slik som inflammatoriske hudsykdommer inkludert psoriasis og dermatitt (for eksempel atopisk dermatitt), systemisk skleroderma og sklerose, responser som er assosiert med inflammatorisk tarmsykdom (slik som Crohns sykdom og ulcerøs kolitt), respiratorisk distressyndrom (inkludert adult

respiratorisk distressyndrom, ARDS), dermatitt, meningitt, encefalitt, uveitis, kolitt, glomerulonefritt, allergiske tilstander slik som eksem og astma og andre tilstander som involverer infiltrering av T-celler og kroniske inflammatoriske responser, aterosklerose, leukocytadhesjonsmangel, revmatoid artritt, systemisk lupus erytematosus (SLE), diabetes mellitus (f.eks. type I diabetes mellitus eller insulinavhengig diabetes mellitus), multippel sklerose, Reynauds syndrom, autoimmun tyroiditt, allergisk ensefalomyelitt, Sjögrens syndrom, barnediabetes, og immunresponser som er assosiert med akutt og forsinket hypersensitivitet som er mediert av cytokiner og T-lymfocytter som vanligvis finnes ved tuberkulose, sarkoidose, polymyocitt, granulomatose og vaskulitt, pernisiøs anemi (Addisons sykdom), sykdommer som involverer leukocyttdiapedeser, sentralnervesystem (CNS)-inflammatoriske forstyrrelser, multippel organskade syndrom, hemolyttisk anemi (inkludert kryogloblinemi eller Coombs positive anemi), myastenia gravis, antigen-antistoffkompleksmedierte sykdommer, anti-glomerulær basalmembransykdom, antifosfolipidsyndrom, allergisk nevritt, Graves sykdom, Lambert-Eaton myastenisk syndrom, pemfigoid bulløs, pemfigøs, autoimmune polyendokrinopati, Reiters sykdom, stoff-man syndrom, Behcets sykdom, storcelleartritt, immunkompleksnefritt, IgA-nevropati, IgM-polynevropati, immuntrombocytopenisk purpura (ITP) eller autoimmun trombocyttopeni, osv.

Uttrykket "inflammatoriske gastrointestinale forstyrrelser" er en gruppe av kroniske forstyrrelser som forårsaker inflammasjon og/eller sårdannelse i slimhinne-membranen. Uttrykket inkluderer inflammatorisk tarmsykdom (f.eks. Crohns sykdom, ulcerøs kolitt, ubestemt kolitt og smittsom kolitt), mukositt (f.eks. oral mukositt, gastrointestinal mukositt, nesemukositt og proktitt), nekrotiserende enterokolitt og øsofagitt.

Uttrykkene "celleproliferativ forstyrrelse" og "proliferativ forstyrrelse" refererer til forstyrrelser som er assosiert med noen grad av unormal celleproliferasjon. I én utførelsesform er den celleproliferative forstyrrelsen kreft.

"Tumor" refererer slik det blir benyttet her til all neoplastisk cellevekst og proliferasjon, uansett om den er malign eller godartet, og alle celler som er i ferd med å bli kreftceller og kreftrammede celler og vev. Uttrykkene "kreft", "kreftrammet", "celleproliferativ forstyrrelse", "proliferativ forstyrrelse" og "tumor" er ikke gjensidig utelukkende slik de blir referert til her.

Uttrykkene "kreft" og "kreftaktig" refererer til eller beskriver den fysiologiske tilstanden hos pattedyr som typisk er karakterisert ved uregulert cellevekst/proliferasjon. Eksempler på kreft inkluderer karsinom, lymfom, blastom, sarkom og leukemi. Mer spesielle eksempler på slike kreftformer inkluderer skvamøs cellekreft, småcellet lungekreft, ikke-småcellet lungekreft, adenokarsinom i lungene, skvamøst karsinom i lungene, kreft i peritoneum, hepatocellulær kreft, gastrointestinal kreft, pankreaskreft, glioblastom, cervixkreft, ovariekreft, leverkreft, blærekreft, hepatom, brystkreft, kolonkreft, kolorektalkreft, endometrie- eller livmorkarsinom, spyttkjertelkarsinom, nyrekreft, leverkreft, prostatakreft, vulvakreft, tyroidkreft, hepatisk karsinom og ulike typer av hode- og nakkekreft.

Feilregulering av angiogenese kan føre til mange forstyrrelser som kan bli behandlet med preparatene og fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen. Disse forstyrrelsene inkluderer både ikke-neoplastiske og neoplastiske tilstander. Neoplastiske forstyrrelser inkluderer de som er beskrevet ovenfor. Ikke-neoplastiske forstyrrelser inkluderer uønsket eller avvikende hypertrofi, artritt, revmatoid artritt (RA), psoriasis, psoriasisplakk, sarkoidose, aterosklerose, aterosklerotiske plakk, diabetes retinopati og andre proliferative retinopati inkludert retinopati ved prematuritet, retrolental fibroplasi, neovaskulært glaukom, aldersrelatert makulær degenerering, diabetesmakulært ødem, kornea neovaskularisering, kornea transplantatneovaskularisering, kornea transplantatavstøtning, retina/koroid neovaskularisering, neovaskularisering i angle (rubeose), okulær neovaskulariseringssykdom, vaskulær restenose, arteriovenøse feildannelser (AVM), meningiom, hemangiom, angiofibrom, tyroid hyperplasi (inkludert Graves sykdom), kornea- og annen vevstransplantasjon, kronisk inflammasjon, lungeinflammasjon, akutt lungeskade/ARDS, sepsis, primær pulmonal hypertensjon, maligne pulmonale effusjoner, cerebralt ødem (f.eks. assosiert med akutt slag/lukket hodeskade/traume), synovial inflammasjon, pannusdannelse ved RA, myositis ossificans, hypertrofisk bendannelse, osteoartritt (OA), refraktorisk ascites, polycystisk ovariesykdom, endometriose, 3. spacing ved fluidsykdommer (pankreatitt, compartment-syndrom, brannskader, tarmsykdom), livmorfibroider, for tidlig fødsel, kronisk inflammasjon slik som IBD (Crohns sykdom og ulcerøs kolitt), nyreallograftavstøtning, inflammatorisk tarmsykdom, nefrotisk syndrom, uønsket eller avvikende vevsmassevekst (ikke-kreft), hemofile ledd, hypertrofiske arr, inhibering av hårvekst, Osler-Weber syndrom, pyogene granulomaretrolentalfibroplasi, skleroderma, trakom, vaskulære adhesjoner, synovitt, dermatitt, preeklampsi, ascites, perikardial effusjon (slik som den som er assosiert med perikarditt) og pleural effusjon.

Som benyttet her refererer "behandling" til klinisk intervensjon i et forsøk på å endre den naturlige utviklingen for individet eller cellen som blir behandlet og kan bli utført enten for profylakse eller i løpet av utviklingen av klinisk patologi. Ønskede effekter ved behandling inkluderer å forhindre fremkomst eller tilbakekomst av sykdom, lindring av symptomer, minskning av enhver direkte eller indirekte patologisk konsekvens av sykdommen, forhindre metastaser, minske hastigheten på sykdomsprogresjon, lindre eller døyve sykdomstilstanden og remisjon eller forbedret prognose. I noen utførelsesformer blir antistoffer ifølge oppfinnelsen benyttet for å forsinke utviklingen av sykdommer og forstyrrelser.

En "effektiv mengde" refererer til en mengde som er effektiv ved doseringer og i tidsperioder som er nødvendig for å oppnå det ønskede, terapeutiske eller profylaktiske resultater.

En "terapeutisk effektiv mengde" av et stoff/molekyl ifølge oppfinnelsen, agonist eller antagonist kan variere i overensstemmelse med faktorer slik som sykdomstilstand, alder, kjønn og vekt for individet, og evnen til stoffet/molekylet, agonisten eller antagonist

eller å utløse en ønsket respons hos individet. En terapeutisk effektiv mengde er også én der enhver toksisk eller skadelig effekt av stoffet/molekylet, agonisten eller antagonisten blir oppveid ved de terapeutisk, fordelaktige effektene. En "profylaktisk effektiv mengde" refererer til en mengde som ved dosering og tidsperioder som er nødvendige er effektiv for å oppnå det ønskede, profylaktiske resultatet. Vanligvis, men ikke nødvendigvis, siden en profylaktisk dose blir benyttet på individer før eller på et tidligere stadium av sykdommen så vil den profylaktisk, effektive mengden være mindre enn den terapeutisk, effektive mengden.

Uttrykket "cytotoksisk middel" refererer slik det blir benyttet her til et stoff som inhiberer eller forhindrer virkningen av celler og/eller forårsaker ødeleggelse av celler. Uttrykket er ment å skulle inkludere radioaktive isotoper (f.eks. At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², p³² og radioaktive isotoper av Lu), kjemoterapeutiske midler, f.eks. metotreksat, adriamycin, vinkaalkaloider (vinkristin, vinblastin, etopsid), doksorubisin, melfalan, mitomycin-C, klorambucil, daunorubicin eller andre interkalerende midler, enzymer og fragmenter derav slik som nukleolytiske enzymer, antibiotika og toksiner slik som småmolekyltoksiner eller enzymatisk aktive toksiner av bakterieopphav, soppopphav, planteopphav eller dyreopphav, inkludert fragmenter og/eller varianter derav og de ulike anti-tumor- eller anti-kreftmidlene som er tilkjennegjort nedenfor. Andre cytotoksiske midler er beskrevet. Et tumordrepende middel forårsaker ødeleggelse av tumorceller.

Et "kjemoterapeutisk middel" er en kjemisk forbindelse som er nyttig i behandlingen av kreft. Eksempler på kjemoterapeutiske midler inkluderer alkylere midler så som tiotepa og CYTOXAN syklofosfamid, alkylsulfonater slik som busulfan, improsulfan og piposulfan, aziridiner slik som benzodopa, karboquon, meturedopa og uredopa, etyleniminer og metylamelaminer inkludert altretamin, trietylenmelamin, trietylenfosforamid, trietylenfosforamid og trimetylolomelamin, acetogener (spesielt bullatacin og bullatacinon), delta-9-tetrahydrokannabinol (dronabinol, MARINOL), beta-lapachon, lapachol, kolchiciner, betulinsyre, et kamptotecin (inkludert den syntetiske analogen topotekan (HYCAMTIN), CPT-11 (irinotekan, CAMPTOSAR), acetylkamptotecin, skopolektin og 9-aminokamptotecin), bryostatin, kallystatin, CC-1065 (inkludert dens syntetiske adozelesin-, karzelesin- og bizelesinanaloger), podofyllotoksin, podofyllinsyre, teniposid, kryptofysiner (spesielt kryptofysin-1 og kryptofysin-8), dolastatin, duokarmycin (inkludert de syntetiske analogene KW-2189 og CB1-TM1), eleuterobin, pankreatistatin, et sarkodityin, spongistatin, nitrogen-senneper så som klorambucil, klornafasin, kolofosfamid, estramustin, ifosfamid, mekloretamin, mekloretaminhydroksidhydroklorid, melfalan, novembichin, fenesterin, prednimustin, trofosfamid, uracilsennep, nitrozoureaer slik som karmustin, klorozotosin, fotemustin, lomustin, nimustin og ranimustin, antibiotika slik som enediynantibiotikaene (f.eks. kalicheamicin, spesielt kalicheamicin-gammaI1 og kalicheamicin-omegaI1 (se f.eks. Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33:183-186 (1994)), dynemicin, inkludert dynemicin-A, et esperamicin, i tillegg til neokarsinostatinkromofor og beslektede kromoprotein-enediyn-

antibiotiske kromoforer), aklasinomyciner, aktinomycin, autramycin, azaserin, bleomyciner, kaktinomycin, carabycin, karminomycin, karsinofilin, kromomycinis, daktinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-okso-L-norleucin, ADRIAMYCIN doksorubisin (inkludert morfolinodoksorubisin), cyanomorfolinodoksorubicin, 2-pyrrolino-doksorubicin og deoksy-

5 doksorubicin), epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomycin, mitomyciner slik som mitomycin-C, mykofenolsyre, nogalamycin, olivamyciner, peplomycin, potfyromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozosin, tubersidin, ubenimeks, asinostatin, sorubicin, antimetabolitter slik som metotreksat og 5-fluoruracil (5-FU), folsyreanaloger slik som denopterin, metotreksat, pteropterin, trimetreksat, purinanaloger

10 slik som fludarabin, 6-merkaptopurin, tiamitrin, tioguanin, pyrimidinanaloger slik som ancitabin, azasitidin, 6-azauridin, karmofur, cytarabin, dideoksyuridin, doksifluridin, enocitabin, floksuridin, androgener slik som kalusteron, dromostanolonpropionat, epitiostanol, mepitiostan, testolakton, anti-adrenaler slik som aminoglutetimid, mitotan, trilostan, folsyreerstatte slik som frolynsyre, aceglaton, aldofosfamidglykosid, amino-

15 levulinsyre, eniluracil, amsakrin, bestrabucil, bisantren, edatraksat, defofamin, demekolcin, diazikon, elfornitin, elliptiniumacetat, et eptonon, etoglucid, galliumnitrat, hydroksyurea, lentinan, lonidainin, maytansinoider slik som maytansin og ansamitociner, mitoguazon, mitoksantron, mopidanmol, nitraerin, pentostatin, fenamet, pirarubicin, losoksantron, 2-etylhydrazid, prokarbazin, PSK-polysakkaridkompleks (JHS Natural Products, Eugene, OR),

20 razoksan, rizoksin, sizofiran, spirogermanium, tenuazonsyre, triazikon, 2,2',2''-triklortrietylamin, trikotecener (spesielt T-2-toksin, verrakurin-A, roridin-A og anguidin), uretan, vindesin (ELDISIN, FILDESIN), dakarbazin, mannomustin, mitobronitol, mitolaktol, pipobroman, gacytosin, arabinosid ("Ara-C), tiotepa, taksoider, f.eks. TAXOL paklitaksel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), ABRAXANE kreomoforfri, albuminfremstilt

25 nanopartikkelformulering av paklitaksel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), og TAXOTERE doksetaksel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Frankrike), kloranbucil, gemcitabin (GEMZAR), 6-tioguanin, merkaptopurin, metotreksat, platinaanaloger slik som cisplatin og karboplatin, vinblastin (VELBAN), platina, etopsid (VP-16), ifosfamid, mitoksantron, vinkristin (ONCOVIN), oksaliplatin, leukovovin, vinorelbin (NAVELBINE),

30 novantron, edatreksat, daunomycin, aminopterin, ibandronat, topoisomeraseinhibitor (RFS 2000, difluormetylornitin (DMFO), retionoider slik som retinolsyre, kapecitabin (XELODA), farmasøytisk akseptable salter, syrer eller derivater av enhver av de som er fremlagt ovenfor, i tillegg til kombinasjoner av to eller flere av de som er fremlagt ovenfor slik som CHOP, som er en forkortelse for en kombinert terapi med syklofosfamid, doksorubicin,

35 vinkristin og prednisolon og FOLFOX som er en forkortelse for et behandlingsregime med oksaliplatin (ELOXATIN) kombinert med 5-FU og leukovovin.

Også inkludert i denne definisjonen er anti-hormonmidler som virker slik at det regulerer, reduserer, blokkerer eller inhiberer effekten av hormoner som kan fremme veksten av kreft, og foreligger ofte i form av systemisk behandling eller helkroppbehandling.

De kan være hormoner selv. Eksempler inkluderer antiøstrogener og selektive østrogenreseptormodulatorer (SERM), inkludert for eksempel tamoksifen (inkludert NOLVADEX tamoksifen), EVISTA raloksifen, droloksifen, 4-hydroksytamoksifen, trioksifen, keoksifen, LY117018, onapriston og FARESTON toremifen, anti-progesteroner, østrogenreseptor-
 5 nedregulatorer (ERD), midler som virker slik at de undertrykker eller slår av ovariene, for eksempel luteiniserende hormonfrigjørende hormon (LHRH)-agonister slik som LUPRON og ELIGARD-leuprolidacetat, goserelinacetat, buserelinacetat og tripterelin, andre anti-androgener slik som flutamid, nilutamid og bikalutamid, og aromataseinhibitorer som
 10 inhiberer enzymet aromatase, som regulerer østrogenproduksjon i binyrekjertlene, slik som for eksempel 4(5)-imidazoler, aminoglutetimid, MEGASE megestrolacetat, AROMASIN eksemestan, formestani, fadrozol, RIVISOR vorozol, FEMARA letrozol og ARIMIDEX anastrozol. I tillegg inkluderer en slik definisjon av kjemoterapeutiske midler bisfosfonater slik som klodronat (for eksempel BONEFOS eller OSTAC), DIDROCAL etidronat, NE-58095, ZOMETA zoledronsyre/zoledronat, FOSAMAX alendronat, AREDIA pamidronat, SKELID
 15 tiludronat eller ACTONEL risedronat, i tillegg til troksacitabin (en 1,3-dioksolan-nukleosid cytosinanalogue), antisensoligonukleotider, spesielt de som inhiberer uttrykk av gener i signaliseringsveier som er implisert i feilaktig celleproliferasjon slik som for eksempel PKC-alfa, Raf, H-Ras og epidermal vekstfaktorreseptor (EGF-R), vaksiner slik som THERATOPE-vaksine og genterapivaksiner, for eksempel ALLOVECTIN-vaksine, LEUVECTIN-vaksine og
 20 VAXID-vaksine, LURTOTECAN-topoisomerase-1-inhibitor, ABRALIX rnrh, lapatinib ditosylat (en toverdige småmolekyl-ErbB-2- og EGFR-tyrosinkinaseinhibitor som også er kjent som GW572016) og farmasøytisk akseptable salter eller derivater av en hvilken som helst av de som er nevnt ovenfor.

Et "vekstinhibitorisk middel" refererer når det blir benyttet her til en forbindelse eller
 25 sammensetning som inhiberer vekst for en celle hvis vekst er avhengig av beta7-aktivering enten *in vitro* eller *in vivo*. Slik kan det vekstinhibitoriske midlet være ett som vesentlig reduserer prosentandelen av beta7-avhengige celler i S-fase. Eksempler på vekstinhibitoriske midler inkluderer midler som blokkerer cellyklusprogresjon (på et sted forskjellig fra S-fase), slik som midler som induserer G1-arrest og M-fasearrest. Klassiske M-
 30 faseblokkere inkluderer vinkaene (vinkristin og vinblastin), taksaner og topoisomerase-II-inhibitorer slik som doksorubicin, epirubicin, daunorubicin, etopsid og bleomycin. De midlene som stopper G1 går også over i S-fasearrest, for eksempel DNA-alkylerende midler slik som tamoksifen, prednison, dakarbazin, mekloretamin, cisplatin, metotreksat, 5-fluoruracil og ara-C. Ytterligere informasjon kan bli funnet i The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn og
 35 Israel, red., kapittel 1, med tittel "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" av Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), spesielt s. 13. Taksanene (paklitaksel og docetaksel) er antineoplastiske legemidler som begge er avledet fra barlind. Docetaksel (TAXOTERE, Rhone-Poulenc Rorer), som er avledet fra europeisk barlind er en halvsynetisk analog av paklitaksel (TAXOL, Bristol-Myers Squibb). Paklitaksel og docetaksel

fremmer sammensetningen av mikrotubuli fra tubilindimerer og stabiliserer mikrotubuli ved å forhindre depolymerisering, som fører til inhiberingen av mitose i celler.

5 "Doksorubicin" er et antrasyklinantibiotikum. Det fulle, kjemiske navnet til dokso-
rubicin er (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoksy- α -L-lykso-heksapyranosyl)oksy]-7,8,9,10-
tetrahydro-6,8,11-trihydroksey-8-(hydroksyacetyl)-1-metoksy-5,12-naftacendion.

Forbindelser som er nyttige i kombinasjonsterapi med et anti-beta7-antagonist-
antistoff ifølge oppfinnelsen inkluderer antistoffer (inkludert andre anti-beta7-antagonist-
antistoffer (Fib 21, 22, 27, 30 (Tidswell, M. (1997) ovenfor) eller humaniserte derivater
derav), anti-alfa4-antistoffer (slik som ANTEGEN), anti-TNF (REMICADE)) eller ikke-protein-
10 forbindelser inkludert 5-ASA-forbindelsene ASACOL, PENTASA, ROWASA, COLAZAL og andre
forbindelser slik som Purinetol og steroider slik som prednison. I én utførelsesform omfatter
oppfinnelsen en fremgangsmåte for å behandle en pasient, slik som en human pasient, med
anti-beta7-antagonistantistoffer ifølge oppfinnelsen alene eller i kombinasjon med en annen
forbindelse som også er nyttig i å behandle inflammasjon. I én utførelsesform er den andre
15 forbindelsen valgt fra gruppen som består av Fib 21, 22, 27, 30 eller humaniserte derivater
derav), anti-alfa4-antistoffer, ANTEGEN, anti-TNF, REMICADE, 5-ASA-forbindelser, ASACOL,
PENTASA, ROWASA, COLAZAL, Purinetol, steroider og prednison. I én utførelsesform av
oppfinnelsen reduserer administrering av anti-beta7-antagonistantistoffet ifølge oppfinnelsen
vesentlig dosen av den andre forbindelsen. I én utførelsesform er nevnte reduksjon i dosen
20 av den andre forbindelsen minst 30 %, minst 40 %, minst 50 %, minst 60 %, minst 70 %,
minst 80 %, minst 90 %, minst 95 %. I én utførelsesform av oppfinnelsen lindrer
kombinasjonen av antistoffet ifølge oppfinnelsen og den reduserte dosen av den andre
forbindelsen symptomer hos pasienten til vesentlig den samme graden eller bedre enn ved
administrering av den andre forbindelsen alene.

25

Fremstilling av variantantistoffer som oppviser redusert eller fravær av HAMA-respons

Reduksjon eller eliminering av en HAMA-respons (human anti-muse (også
anvendbar på human anti-rotte eller human anti-human) er et vesentlig aspekt av klinisk
utvikling av passende terapeutiske midler. Se f.eks. Khaxzaeli et al., J. Natl. Cancer Inst.
30 (1988), 80:937, Jaffers et al., Transplantation (1986), 41:572, Shawler et al., J. Immunol.
(1985), 135:1530, Sears et al., J. Biol. Response Mod. (1984), 3:138, Miller et al., Blood
(1983), 62-988, Hakimi et al., J. Immunol. (1991), 147:1352, Reichmann et al., Nature
(1988), 332:323, Junghans et al., Cancer Res. (1990), 50:1495. Som beskrevet her
tilveiebringer oppfinnelsen antistoffer som er humaniserte slik at HAMA-responsen blir
35 redusert eller eliminert. Varianter av disse antistoffene kan ytterligere bli fremskaffet ved å
benytte rutinemessige fremgangsmåter som er kjent på fagområdet, der noen av disse
ytterligere er beskrevet nedenfor.

For eksempel kan en aminosyresekvens for et antistoff som er beskrevet her virke
som en utgangssekvens for diversifisering av rammeverket og/eller de(n) hypervariable

sekvensen(e). En valgt rammeverksekvens til hvilken en utgangshypervariabel sekvens blir bundet, blir her referert til som et humant akseptorrammeverk. Mens de humane akseptorrammeverkene kan være fra, eller være avledet fra et humant immunglobulin (VL- og/eller VH-regionene derav) så er fortrinnsvis de humane akseptorrammeverkene fra, eller avledet fra, en human konsensus-rammeverksekvens fordi slike rammeverk har blitt vist å ha minimalt eller ingen immunogenisitet hos humane pasienter.

Der akseptoren er avledet fra et humant immunglobulin kan man eventuelt velge en human rammeverksekvens som er valgt basert på dens homologi med donor-rammeverksekvensen ved å sammenstille donor-rammeverksekvensen med ulike humane rammeverksekvenser i en samling av humane rammeverksekvenser og velge den mest homologe rammeverksekvensen som akseptoren.

I én utførelsesform er humane konsensusrammeverk her fra, eller avledet fra VH-undergruppe-III- og/eller VL-kappa-undergruppe-I-konsensusrammeverksekvenser.

Slik kan det humane VH-akseptorrammeverket omfatte én, to, tre eller alle de følgende rammeverksekvensene:

FR1 som omfatter EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEKV. ID nr. 38),

FR2 som omfatter WVRQAPGKGLEWV (SEKV. ID nr. 39),

FR3 som omfatter RFTISX1DX2SKNTX3YLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEKV. ID nr. 42),

hvor X1 er A eller R, X2 er T eller N, og X3 er A, L eller F,

FR4 som omfatter WGQGTLVTVSS (SEKV. ID nr. 41).

Eksempler på VH-konsensusrammeverk inkluderer:

humant VH-undergruppe-I-konsensusrammeverk minus Kabat-CDR'er (SEKV. ID nr. 19),

humant VH-undergruppe-I-konsensusrammeverk minus foreliggende hypervariable regioner (SEKV. ID nr. 20-22),

humant VH-undergruppe-II-konsensusrammeverk minus Kabat-CDR'er (SEKV. ID nr. 48),

humant VH-undergruppe-II-konsensusrammeverk minus forlengede hypervariable regionen (SEKV. ID nr. 49-51),

humant VH-undergruppe-III-konsensusrammeverk minus Kabat-CDR'er (SEKV. ID nr. 52),

humant VH-undergruppe-III-konsensusrammeverk minus forlengede hypervariable regioner (SEKV. ID nr. 53-55),

humant VH-akseptorrammeverk minus Kabat-CDR'er (SEKV. ID nr. 56),

humant VH-akseptorrammeverk minus forlengede hypervariable regioner (SEKV. ID nr. 57-58),

humant VH-akseptor-2-rammeverk minus Kabat-CDR'er (SEKV. ID nr. 59), eller

humant VH-akseptor-2-rammeverk minus forlengede hypervariable regioner (SEKV. ID nr. 60-62).

I én utførelsesform omfatter det humane VH-akseptorrammeverket én, to, tre eller alle de følgende rammeverksekvensene:

FR1 som omfatter EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEKV. ID nr. 38),

FR2 som omfatter WVRQAPGKGLEWV (SEKV. ID nr. 39),

5 FR3 som omfatter RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEKV. ID nr. 43,
RFTISRDTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEKV. ID nr. 44),
RFTISRDTSKNTFYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEKV. ID nr. 45),
RFTISADTSKNFYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEKV. ID nr. 46),
FR4 som omfatter WGQGTLVTVSS (SEKV. ID nr. 41).

10 Det humane VL-akseptorrammeverket kan omfatte én, to, tre eller alle de følgende rammeverksekvensene:

FR1 som omfatter DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (SEKV. ID nr. 34),

FR2 som omfatter WYQQKPGKAPKLLI (SEKV. ID nr. 35),

FR3 som omfatter GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYC (SEKV. ID nr. 36),

15 FR4 som omfatter FGQGTKVEIKR (SEKV. ID nr. 37).

Eksempler på VL-konsensusrammeverk inkluderer:

humant VL-kappa-undergruppe-I-konsensusrammeverk (SEKV. ID nr. 14),

humant VL-kappa-undergruppe-I-konsensusrammeverk (forlengt HVR-L2) (SEKV.
ID nr. 15),

20 humant VL-kappa-undergruppe-II-konsensusrammeverk (SEKV. ID nr. 16),

humant VL-kappa-undergruppe-III-konsensusrammeverk (SEKV. ID nr. 17), eller

humant VL-kappa-undergruppe-IV-konsensusrammeverk (SEKV. ID nr. 18).

Mens akseptoren kan være identisk i sekvens med den humane rammeverk-
sekvensen som er valgt, uansett om den er fra et humant immunglobulin eller et humant
25 konsensusrammeverk, så omfatter foreliggende oppfinnelse at akseptorsekvensen kan
omfatte allerede eksisterende aminosyresubstitusjoner i forhold til den humane
immunglobulinsekvensen eller den humane konsensusrammeverksekvensen. Disse allerede
eksisterende substitusjonene er fortrinnsvis minimale, vanligvis fire, tre, to eller én amino-
syreforskjell i forhold til den humane immunglobulinsekvensen eller konsensus-
30 rammeverksekvensen.

Hypervariabel regionrester i det ikke-humane antistoffet blir inkorporert inn i de
humane VL- og/eller VH-akseptorrammeverkene. Man kan for eksempel inkorporere rester
som tilsvarer Kabat-CDR-restene, Chothia-hypervariabelløkkerrestene, Abm-restene og/eller
kontaktrestene. Eventuelt blir restene i de forlengede hypervariabel regionene som følger
35 inkorporert: 24-34 (L1), 49-56 (L2) og 89-97 (L3), 26-35 (H1), 50-65 eller 49-65 (H2) og
93-102, 94-102 eller 95-102 (H3).

Mens "inkorporering" av hypervariabel regionrestt som diskutert her er det på det
rene at dette kan bli oppnådd på ulik måte, for eksempel kan nukleinsyre som koder for den
ønskede aminosyresekvensen bli generert ved å mutere nukleinsyre som koder for muse-

variabeldomenesekvensen slik at rammeverksrestene derav blir endret til humane akseptorrammeverksrester, eller ved å mutere nukleinsyre som koder for den humane variabeldomenesekvensen slik at hypervariabeldomenerestene blir endret til ikke-humane rester, eller ved å syntetisere nukleinsyre som koder for den ønskede sekvensen, osv.

5 I eksemplene her ble hypervariabel regiontransplantatvarianter generert ved hjelp av Kunkel-mutagenese på nukleinsyre som koder for den humane akseptorsekvensen ved å benytte et separat oligonukleotid for hver hypervariabel region. Kunkel et al., *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987). Passende endringer kan bli introdusert på rammeverk- og/eller hypervariabel region ved å benytte rutinemessige teknikker, for å korrigere og
10 reetablere riktige hypervariabel region-antigeninteraksjoner.

Bakteriofag(mid)visning (også referert til her som phage-display i noen kontekster) kan bli benyttet som en hensiktsmessig og rask fremgangsmåte for å generere og screene mange ulike, potensielle variantantistoffer i et bibliotek som er generert ved hjelp av sekvensrandomisering. Andre fremgangsmåter for å fremstille og screene endrede
15 antistoffer er imidlertid tilgjengelige for fagfolk på området.

Bakteriofag(mid)visningsteknologi har frembrakt et kraftig redskap for å generere og selektene nye proteiner som binder til en ligand, slik som et antigen. Ved å benytte teknikkene med bakteriofag(mid) visning muliggjøres fremstilling av store biblioteker av proteinvarianter som raskt kan bli sortert for de sekvensene som binder et målmolekyl med
20 høy affinitet. Nukleinsyrer som koder for variantpolypeptider blir generelt fusjonert til en nukleinsyresekvens som koder for et viruskappeprotein, slik som gen-III-proteinet eller gen-VIII-proteinet. Monovalente fagmidvisningssystemer der nukleinsyresekvensen som koder for proteinet eller polypeptidet er fusjonert til en nukleinsyresekvens som koder for en del av gen-III-proteinet har blitt utviklet. (Bass, S., *Proteins*, 8:309 (1990), Lowman og Wells,
25 *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 3:205 (1991). I et monovalent fagmidvisningssystem blir genfusjonen uttrykt ved lave nivåer og villtype gen-III-proteinene blir også uttrykt slik at smittsomheten til partiklene blir opprettholdt. Fremgangsmåte for å fremstille peptidbiblioteker og for å screene disse bibliotekene har blitt tilkjennegjort i mange patenter (f.eks. US patentskrift nr. 5 723 286, US patentskrift nr. 5 432 018, US
30 patentskrift nr. 5 580 717, US patentskrift nr. 5 427 908 og US patentskrift nr. 5 498 530).

Biblioteker av antistoffer eller antigenbindende polypeptider har blitt fremstilt på et antall måter, inkludert ved å endre et enkelt gen ved å sette inn tilfeldige DNA-sekvenser eller ved å klonere en familie av beslektede gener. Fremgangsmåter for å fremvise antistoffer eller antigenbindingsfragmenter ved å benytte bakteriofagvisning har blitt beskrevet i US
35 patentskrift nr. 5 750 373, 5 733 743, 5 837 242, 5 969 108, 6 172 197, 5 580 717 og 5 658 727. Biblioteket blir deretter screenet for uttrykking av antistoffer eller antigenbindende proteiner med de ønskede karakteristika.

Fremgangsmåter for å substituere en aminosyre som er valgt inn i en templatnukleinsyre er veletablert på fagområdet, der noen av disse er beskrevet her. Hypervariabel

regionrester kan for eksempel bli substituert ved å benytte Kunkel-fremgangsmåten. Se for eksempel Kunkel et al., *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987).

Sekvensen av oligonukleotider inkluderer ett eller flere av de designede kodonsettene for de hypervariable regionrestene som skal bli endret. Et kodonsett er et sett av forskjellige nukleotid-triplett-sekvenser som blir benyttet for å kode for ønskede variantamino-syrer. Kodonsett kan bli representert ved hjelp av symboler for å betegne bestemte nukleotider eller ekvimolære blandinger av nukleotider som vist nedenfor i overensstemmelse med IUB-koden.

10 IUB-koder

G Guanin

A Adenin

T Tymin

C Cytosin

15 R (A eller G)

Y (C eller T)

M (A eller C)

K (G eller T)

S (C eller G)

20 W (A eller T)

H (A eller C eller T)

B (C eller G eller T)

V (A eller C eller G)

D (A eller G eller T) H

25 N (A eller C eller G eller T)

For eksempel i kodonsettet DVK kan det være nukleotidene A eller G eller T, V kan være A eller G eller C og K kan være G eller T. Dette kodonsettet kan representere atten ulike kodon og kan kode for aminosyrene Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly og Cys.

30 Oligonukleotid- eller primersett kan bli syntetisert ved å benytte standard fremgangsmåter. Et sett oligonukleotider kan bli syntetisert for eksempel ved fastfase-syntese, som inneholder sekvenser som representerer alle mulige kombinasjoner av nukleotid-tripletter som er tilveiebrakt av kodonsettet og som vil kode for den ønskede gruppen av aminosyrer. Syntese av oligonukleotider med valgt nukleotid-«degenerering» på visse posisjoner er velkjent på fagområdet. Slike sett av nukleotider som har visse kodonsett
35 kan bli syntetisert ved å benytte kommersielle nukleinsyrer-syntetisatorer (tilgjengelig for eksempel fra Applied Biosystems, Foster City, CA), eller kan bli fremskaffet kommersielt (for eksempel fra Life Technologies, Rockville, MD). Et sett av oligonukleotider som er syntetisert med et spesielt kodonsett vil derfor typisk inkludere en flerhet av oligonukleotider med

forskjellige sekvenser, der forskjellene er etablert av kodonsettet i den samlede sekvensen. Oligonukleotider, slik det blir benyttet ifølge foreliggende oppfinnelse, har sekvenser som muliggjør hybridisering på en variabelt domene nukleinsyretemplat og kan også inkludere restriksjonsenzymseter for kloningsformål.

5 I én fremgangsmåte kan nukleinsyresekvenser som koder for variantaminozyrer bli dannet ved hjelp av oligonukleotidmediert mutagenese. Denne teknikken er velkjent på fagområdet som beskrevet av Zoller et al., *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6504 (1987). Kort fortalt dannes nukleinsyresekvenser som koder for variantaminozyrer ved hybridisering av et oligonukleotidsett som koder for de ønskede kodonsettene til et DNA-templat, der templatet er den enkelttrådede formen av plasmidet som inneholder en variabel region nukleinsyre-
10 templat-sekvens. Etter hybridisering blir DNA-polymerase benyttet for å syntetisere en hel andre komplementær tråd av templatet som på det vis vil inkorporere oligonukleotidprimeren, og vil inneholde kodonsettene slik de er tilveiebrakt av oligonukleotidsettet.

Vanligvis blir oligonukleotider med en lengde på minst 25 nukleotider benyttet. Et
15 optimalt oligonukleotid vil ha 12-15 nukleotider som er fullstendig komplementære til templatet på hver side av nukleotidet/ene som koder for mutasjonen(e). Dette sikrer at oligonukleotidet vil hybridisere korrekt til det enkelttrådede DNA-templatmolekylet. Oligonukleotidene kan enkelt bli syntetisert ved å benytte teknikker som er kjent på fagområdet, slik som de som er beskrevet av Crea et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*,
20 75:5765 (1978).

DNA-templatet blir generert ved de vektorene som enten er avledet fra bakteriofag-M13-vektorer (de kommersielt tilgjengelige M13mp18- og M13mp19-vektorene er egnet), eller de vektorene som inneholder et enkelttrådet bakteriofag replikasjonsorigo som beskrevet av Viera et al., *Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). Dermed kan DNA som skal bli
25 mutert bli satt inn i én av disse vektorene for å generere enkelttrådet templat. Fremstilling av det enkelttrådede templatet blir beskrevet i avsnittene 4.21-4.41 i Sambrook et al., ovenfor.

For å endre den native DNA-sekvensen blir oligonukleotidet hybridisert til det enkelttrådede templatet ved passende hybridiseringsbetingelser. Et DNA-polymeriserende
30 enzym, vanligvis T7-DNA-polymerase eller Klenow-fragmentet av DNA-polymerase-I, blir deretter tilsatt for å syntetisere den komplementære tråden til templatet ved å benytte oligonukleotidet som en primer for syntesen. Et hetero-dupleksmolekyl blir dermed dannet slik at én tråd av DNA koder for den muterte formen av gen-1 og den andre tråden (det opprinnelige templatet) koder for den native, uendrede sekvensen for gen-1. Dette hetero-
35 dupleksmolekylet blir deretter transformert inn i en passende vertscelle, vanligvis en prokaryot celle slik som *E. coli* JM101. Etter å ha dyrket cellene blir de platet ut på agaroseplater og screenet ved å benytte oligonukleotidprimeren radiomerket med et 32-fosfat for å identifisere bakteriekoloniene som inneholder det muterte DNAet.

Fremgangsmåten som er beskrevet umiddelbart ovenfor kan bli modifisert slik at et homo-dupleksmolekyl blir dannet der begge tråder i plasmidet inneholder mutasjonen(e). Modifiseringene er som følger: det enkelttrådede oligonukleotidet binder seg til det enkelttrådede templatet som beskrevet ovenfor. En blanding av tre deoksyribonukleotider, deoksyriboadenosin (dATP), deoksyriboguanosin (dGTP) og deoksyribotymidin (dTTP) blir kombinert med et modifisert tiodeoksyribocytosin kalt dCTP-(aS) (som kan bli fremskaffet fra Amersham). Denne blandingen blir tilsatt til templat-oligonukleotid-komplekset. Ved tilsetning av DNA-polymerase til denne blandingen blir en tråd av DNA som er identisk med templatet bortsett fra de muterte basene generert. I tillegg vil denne nye DNA-tråden inneholde dCTP-(aS) istedenfor dCTP, som virker slik at den beskytter den fra restriksjonsendonukleasefordøyning. Etter at templattråden for den dobbelttrådede hetero-dupleksen har fått innført et enkelttrådsbrudd med et passende restriksjonsenzym kan templattråden bli fordøyd med ExoIII-nuklease eller annen passende nuklease forbi regionen som inneholder setet/ene som skal bli mutagenisert. Restriksjonen blir deretter stoppet for å få et molekyl som kun er delvis enkelttrådet. En fullstendig, dobbelttrådet DNA-homo-dupleks blir deretter dannet ved å benytte DNA-polymerase i nærvær av alle fire deoksyribonukleotid-trifosfater, ATP og DNA-ligase. Dette homo-dupleksmolekylet kan deretter bli transformert inn i en passende vertscelle.

Som tidligere antydnet er sekvensen for oligonukleotid-settet av tilstrekkelig lengde for å hybridisere til templatnukleinsyren og kan også inneholde restriksjonssete. DNA-templater kan bli generert ved hjelp av de vektorene som enten er avledet fra bakteriofag-M13-vektorer eller vektorer som inneholder et enkelttrådet bakteriofagrepikasjonsorigo som beskrevet av Viera et al., *Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). Slik må DNA som er mutert bli innsatt i én av disse vektorene for å generere et enkelttrådet templat. Fremstilling av det enkelttrådede templatet er beskrevet i avsnittene 4.21-4.41 i Sambrook et al., ovenfor.

Ifølge en annen fremgangsmåte kan et bibliotek bli generert ved å tilveiebringe oppstrøms- og nedstrøms-oligonukleotidsett, der hvert sett har en flerhet av oligonukleotider med forskjellige sekvenser, der de forskjellige sekvensene som er etablert av kodonsettene er tilveiebrakt innenfor sekvensen av oligonukleotidene. Oppstrøms- og nedstrøms-oligonukleotidsettene, sammen med en variabelt domene templat-nukleinsyresekvens, kan bli benyttet i en polymerasekjedereaksjon for å generere et "bibliotek" av PCR-produkter. PCR-produktene kan bli referert til som "nukleinsyrekassetter", siden de kan bli fusjonert til andre beslektede eller ikke-beslektede nukleinsyresekvenser, for eksempel viruskappeproteiner og dimeriseringsdomener, ved å benytte etablerte molekylærbiologiske teknikker.

Sekvensen til PCR-primere inkluderer ett eller flere av de designede kodonsettene for de løsemiddeltilgjengelige og svært ulike delene i én hypervariabel region. Som beskrevet ovenfor er et kodonsett et sett med ulike nukleotid-triplettsekvenser som blir benyttet for å kode for ønskede variantaminozyrer.

Valgte antistoffer som imøtegår de ønskede kriteriene, som er valgt via passende screening/seleksjonstrinn, kan bli isolert og klonet ved å benytte standard rekombinante teknikker.

5 Vektorer, vertsceller og rekombinante fremgangsmåter

For rekombinant produksjon av et antistoff ifølge oppfinnelsen blir nukleinsyren som koder for det isolert og satt inn i en repliserbar vektor for ytterligere kloning (amplifisering av DNA) eller for ekspresjon. DNA som koder for antistoffet kan enkelt bli isolert og sekvensert ved å benytte konvensjonelle prosedyrer (f.eks. ved å benytte oligonukleotid prober som er i stand til å bindes spesifikt til gener som koder for den tunge og den lette kjeden til antistoffet). Mange vektorer er tilgjengelige. Valget av vektor avhenger delvis av vertscellen som skal bli benyttet. Foretrukne vertsceller er vanligvis av enten prokaryot eller eukaryot (vanligvis pattedyropphav) opphav.

15 Fremstilling av antistoffer ved å benytte prokaryote vertsceller:

Vektorkonstruering

Polynukleotidsekvenser som koder for polypeptidkomponenter for antistoffet ifølge oppfinnelsen kan bli fremskaffet ved å benytte standard, rekombinante teknikker. Ønskede polynukleotidsekvenser kan bli isolert og sekvensert fra antistoffproduserende celler så som hybridomceller. Alternativt kan polynukleotider bli syntetisert ved å benytte nukleotid-syntetisatorer eller PCR-teknikker. Med én gang de er oppnådd blir sekvensene som koder for polypeptidene satt inn i en rekombinant vektor som er i stand til å replikere og uttrykke heterologe polynukleotider i prokaryote verter. Mange vektorer som er tilgjengelige og kjente på fagområdet kan bli benyttet til formålet ifølge foreliggende oppfinnelse. Valg av en passende vektor vil i hovedsak være avhengig av størrelsen på nukleinsyren som skal bli satt inn i vektoren og den spesielle vertscellen som skal bli transformert med vektoren. Hver vektor inneholder ulike komponenter, avhengig av dens funksjon (amplifisering eller ekspresjon av heterologt polynukleotid, eller begge) og dens kompatibilitet med den spesielle vertscellen som den ligger i. Vektorkomponentene inkluderer vanligvis: et replikasjonsorigo, et seleksjonsmarkørgen, en promoter, et ribosombindingssete (RBS), en signalsekvens, det heterologe nukleinsyreinsersjonen og en transkripsjons-terminerings-sekvens.

Vanligvis blir plasmidvektorer som inneholder replikon- og kontrollsekvenser som er avledet fra arter som er compatible med vertscellen benyttet i sammenheng med disse vertene. Vektoren bærer ordinært et replikasjonssete, i tillegg til markeringssekvenser som er i stand til å tilveiebringe fenotypisk seleksjon i transformerte celler. *E. coli* blir typisk transformert ved å benytte pBR322, som er et plasmid som er avledet fra en *E. coli*-art. pBR322 inneholder gener som koder for ampicillin (Amp)- og tetrasyklin (Tet)-resistens og tilveiebringer slik en enkel måte for å identifisere transformerte celler. pBR322, dens

derivater, eller andre mikrobielle plasmider eller bakteriofager kan også inneholde, eller modifisert slik at de inneholder promotorer som kan bli benyttet av mikroorganismen for uttrykking av endogene proteiner. Eksempler på pBR322-derivater som blir benyttet til uttrykking av spesielle antistoffer er beskrevet i detalj i Carter et al., US patentskrift nr. 5 5 648 237.

I tillegg kan bakteriofagvektorer som inneholder replikon- og kontrollsekvenser som er kompatible med vertsorganismen bli benyttet som transformerende vektorer i sammenheng med disse vertene. For eksempel kan bakteriofag slik som λ GEM.TM.-11 bli benyttet for å fremstille en rekombinant vektor som kan bli benyttet til å transformere 10 mottakelige vertsceller slik som *E. coli* LE392.

Ekspresjonsvektoren ifølge oppfinnelsen kan omfatte to eller flere promotor-cistronpar, som koder for hver av polypeptidkomponentene. En promotor er en ikke-translatert, regulatorisk sekvens som er lokalisert oppstrøms (5') for et cistron som modulerer dens uttrykking. Prokaryote promotorer faller typisk innenfor to klasser, 15 induserbare og konstitutive. Induserbare promotor er en promotor som initierer økte nivåer av transkripsjonen av cistronene under dens kontroll som respons på endringer i dyrkningsbetingelser, f.eks. nærvær eller fravær av et næringsstoff eller en endring i temperatur.

Et stort antall promotorer som blir gjenkjent av en mangfoldighet av potensielle 20 vertsceller er kjent. Den valgte promotoren kan være opererbart bundet til cistron-DNA som koder for den lette eller den tunge kjeden ved å fjerne promotoren fra kilde-DNAet via restriksjonsenzymfordøyning og innsetting av den isolerte promotorsekvensen inn i vektoren ifølge oppfinnelsen. Både den native promotorsekvensen og mange heterologe promotorer kan bli benyttet for å styre amplifisering og/eller ekspresjon av målgenene. I noen 25 utførelsesformer blir heterologe promotorer benyttet, siden de vanligvis tillater høyere transkripsjon og høyere utbytter av uttrykt målgen sammenlignet med den native målpolypeptidpromotoren.

Promotorer som er egnet for anvendelse i prokaryote verter inkluderer PhoA-promotoren, β -galaktamase- og laktosepromotorsystemer, et tryptofan (*trp*)-promotorsystem og hybride promotorer slik som *tac*- eller *trc*-promotoren. Imidlertid er andre 30 promotorer som er funksjonelle i bakterier (slik som andre kjente, bakterielle promotorer eller bakteriofagpromotorer) også egnede. Deres nukleotidsekvenser har blitt publisert, og gjør derfor en erfaren fagperson i stand til å opererbart ligere dem til cistroner som koder for de mål-lette og -tunge kjedene (Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269) ved å benytte linkere 35 eller adaptorer for å tilveiebringe alle nødvendige restriksjonssteder.

I ett aspekt av oppfinnelsen omfatter hvert cistron innenfor den rekombinante vektoren en sekresjon-signalsekvens-komponent som styrer translokasjon av de uttrykte polypeptidene over en membran. Vanligvis kan aignalsekvensen være en komponent i vektoren, eller den kan være en del av målpolypeptid-DNAet som er satt inn i vektoren.

Signalsekvensen som er valgt for formålet i denne oppfinnelsen bør være én som blir gjenkjent og prosessert (dvs. kløyvd av en signalpeptidase) av vertscellen. For prokaryote vertsceller som ikke gjenkjenner og prosesserer signalsekvensene som er native for de heterologe polypeptidene, kan signalsekvensen bli substituert med en prokaryot signal-

5 sekvens som for eksempel er valgt fra gruppen som består av alkalisk fosfatase, penicillinase, Ipp eller varmestabil enterotoksin-II (STII)-ledere, LamB, PhoE, PelB, OmpA og MBP. I én utførelsesform av oppfinnelsen er signalsekvensen som blir benyttet på begge cistroner i ekspresjonssystemet STII-signalsekvenser eller varianter derav.

I et annet aspekt kan fremstillingen av immunglobulinene ifølge oppfinnelsen foregå

10 i cytoplasmaet til vertscellen, og krever derfor ikke tilstedeværelse av sekresjons-signalsekvenser på hvert cistron. I så henseende blir immunglobulin lette og tunge kjeder uttrykt, foldet og satt sammen for å danne funksjonelle immunglobuliner i cytoplasma. Visse vertsstammer (f.eks. *E. coli trxB*-stammer) tilveiebringer cytoplasmabetingelser som er fordelaktige for disulfidbindingsdannelse, for derved å tillate riktig folding og sammensetning

15 av uttrykte proteinsubenheter. Proba og Pluckthun *Gene*, 159-203 (1995).

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer et ekspresjonssystem i hvilket det kvantitativt forhold av uttrykte polypeptidkomponenter kan bli modulert for å maksimere utbyttet av utskilte og riktig sammensatte antistoffer ifølge oppfinnelsen. Slik modulering blir i det minste delvis oppnådd ved samtidig å modulere translasjonsstyrker for polypeptid-

20 komponentene.

Én teknikk for å modulere translasjonsstyrker er tilkjennegjort i Simmons et al., US patentskrift nr. 5 840 523. Den benytter varianter av translasjons-initieringsregionen (TIR) på et cistron. For en gitt TIR kan en rekke aminosyre- eller nukleinsyresekvensvarianter bli dannet med en rekke av translasjonsstyrker, for derved å tilveiebringe en hensiktsmessig

25 måte å justere denne faktoren på for det ønskede ekspresjonsnivået for den spesifikke kjeden. TIR-varianter kan bli fremstilt ved hjelp av konvensjonelle mutagenese-teknikker som fører til kodonendringer som kan endre aminosyresekvensen, selv om sovende endringer i nukleotidsekvensen er foretrukket. Endringer i TIR kan for eksempel inkludere endringer i antallet eller fordelingen av Shine-Dalgarno-sekvenser, sammen med endringer i

30 signalsekvensen. En fremgangsmåte for å generere mutantsignalsekvenser er fremstillingen av en "kodonbank" på begynnelsen av en kodonsekvens som ikke endrer aminosyresekvensen for signalsekvensen (dvs. endringene er sovende). Dette kan bli utført ved å endre den tredje nukleotidposisjonen på hvert kodon, og i tillegg har noen aminosyrer, slik som leucin, serin og arginin flere første posisjoner og andre posisjoner som kan tilføre

35 kompleksitet i fremstillingen av banken. Denne fremgangsmåten for mutagenese er beskrevet i detalj i Yansura et al. (1992) *METHODS: A Companion to Methods in Enzymol.* 4:151-158.

Fortrinnsvis blir et sett med vektorer fremstilt med en rekke av TIR-styrker for hvert cistron i disse. Dette begrensede settet tilveiebringer en sammenligning av ekspresjons-

nivåer for hver kjede i tillegg til utbyttet av de ønskede antistoffproduktene ved ulike TIR-styrkekombinasjoner. TIR-styrker kan bli bestemt ved å kvantifisere ekspresjonsnivået av et reporter-gen som beskrevet i detalj i Simmons et al., US patentskrift nr. 5 840 523. Basert på translasjonsstyrke-sammenligningen blir de ønskede, individuelle TIR'ene valgt for å bli kombinert i ekspresjonsvektor-konstruksjonene ifølge oppfinnelsen.

Prokaryote vertsceller som er egnet for å uttrykke antistoffer ifølge oppfinnelsen inkluderer Archaeobacteria og Eubacteria, slik som gram-negative eller gram-positive organismer. Eksempler på nyttige bakterier inkluderer escherichia (f.eks. *E. coli*), Bacilli (f.eks. *B. subtilis*), Enterobacteria, Pseudomonas-arter (f.eks. *P. aeruginosa*), Salmonella typhimurium, Serratia marcescans, Klebsiella, Proteus, Shigella, Rhizobia, Vitreoscilla og Paracoccus. I én utførelsesform blir gram-negative celler benyttet. I én utførelsesform blir *E. coli*-celler benyttet som verter for oppfinnelsen. Eksempler på *E. coli*-stammer inkluderer stamme W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, bind 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), s. 1190-1219; ATCC-deponeringsnummer 27,325) og derivater derav, inkludert stamme 33D3 som har genotype W3110 $\Delta fhuA$ ($\Delta tonA$) *ptr3 lac Iq lacL8 $\Delta ompT$ $\Delta (nmpc-fepE)$ degP41 kan^R* (US patentskrift nr. 5 639 635). Andre stammer og derivater derav, slik som *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli*, 1776 (ATCC 31,537) og *E. coli* RV308 (ATCC 31,608) er også egnede. Disse eksemplene er illustrerende. Fremgangsmåter for å fremstille derivater av enhver av de ovenfor nevnte bakteriene som har definerte genotyper er kjent på fagområdet og for eksempel beskrevet i Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990). Det er vanligvis nødvendig å velge den egnede bakterien ved å overveie replikerbarhet for replikonet i cellene for en bakterie. For eksempel kan *E. coli*, Serratia- eller Salmonella-arter være egnet å benytte som verten når velkjente plasmider slik som pBR322, pBR325, pACYC177 eller pKN410 blir benyttet for å levere replikonet. Vanligvis bør vertscellen utskille minimale mengder med proteolytiske enzymer, og ytterligere proteaseinhibitorer kan om ønskelig bli inkorporert i cellekulturen.

Antistoff-fremstilling

Vertsceller blir transformert med den ovenfor beskrevne ekspresjonsvektoren og dyrket i konvensjonelle næringsmedier som er modifisert der det er hensiktsmessig for å indusere promotorer, velge transformanter eller amplifisere genet som koder for de ønskede sekvensene.

Transformasjon betyr å introdusere DNA inn i den prokaryote verten slik at DNA er replikerbart, enten som et ekstrakromosomalt element eller som en del av kromosomet. Avhengig av vertscellen som blir benyttet blir transformasjonen utført ved å benytte standardteknikker som er passende for slike celler. Kalsiumbehandlingen som benytter kalsiumklorid blir vanligvis benyttet i bakterieceller som inneholder kraftige celleveggsbarrierer. En annen fremgangsmåte for transformasjon benytter polyetylen glykol/DMSO. Nok en annen teknikk som blir benyttet er elektroporering.

Prokaryote celler som blir benyttet til å produsere polypeptidene ifølge oppfinnelsen ble dyrket i medier som er kjent på fagområdet og som er passende for dyrking av de valgte vertscellene. Eksempler på passende medier inkluderer luria broth (LB) pluss nødvendige næringstilskudd. I noen utførelsesformer inneholder mediene også et seleksjonsmiddel, som er valgt basert på konstruksjonen av ekspresjonsvektoren, for selektivt å tillate vekst av prokaryote celler som inneholder ekspresjonsvektoren. For eksempel blir ampicillin tilsatt til mediene for vekst av celler som uttrykker ampicillinresistensen.

Eventuelle nødvendig tilskudd foruten karbon, nitrogen og uorganisk fosfat kilder kan også bli inkludert i passende konsentrasjoner introdusert alene eller som en blanding med annet tilskudd eller medium slik som en kompleks nitrogenkilde. Eventuelt kan kulturmediet inneholde ett eller flere reduserende midler som er valgt fra gruppen som består av glutation, cystein, cystamin, tioglykollat, dithioerytritol og ditiotreitol.

De prokaryote vertscellene er dyrket ved passende temperaturer. For *E. coli*-vekst er for eksempel det foretrukne temperaturområdet fra omtrent 20 °C til omtrent 39 °C, mer foretrukket fra omtrent 25 °C til omtrent 37 °C, enda mer foretrukket ved omtrent 30 °C. pH i mediet kan være enhver pH som strekker seg fra omtrent 5 til omtrent 9, i hovedsak avhengig av vertsorganismen. For *E. coli* er pH fortrinnsvis fra omtrent 6,8 til omtrent 7,4, og mer foretrukket omtrent 7,0.

Hvis en induserbar promotor blir benyttet i ekspresjonsvektoren ifølge oppfinnelsen blir proteinekspresjon induert ved betingelser som er egnet for aktiveringen av promotoren. I ett aspekt av oppfinnelsen blir PhoA-promotorer benyttet for å kontrollere transkripsjon av polypeptidene. De transformerte vertscellene blir dermed dyrket i et fosfatbegrensende medium for induksjon. Fortrinnsvis er det fosfatbegrensende mediet C.R.A.P-mediet (se for eksempel Simmons et al., *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). En mengde andre inducere kan bli benyttet, i overensstemmelse med vektorkonstruksjonen som blir benyttet, slik det er kjent på fagområdet.

I én utførelsesform blir de uttrykte polypeptidene ifølge oppfinnelsen utskilt i og gjenvunnet fra periplasma i vertscellene. Proteingjenvinning involverer typisk å ødelegge mikroorganismen, vanligvis ved hjelp av slike fremgangsmåter som osmotisk sjokk, sonikering eller lysis. Med én gang celler er ødelagt kan celleavfall eller hele celler bli fjernet ved hjelp av sentrifugering eller filtrering. Proteinene kan ytterligere bli rensset, for eksempel ved hjelp av affinitetsresinkromatografi. Alternativt kan protein bli transportert over i kulturmediet og isolert der. Celler kan bli fjernet fra kulturen og kultursupernatanten kan bli filtrert og konsentrert for ytterligere rensing av proteinene som er fremstilt. De uttrykte polypeptidene kan ytterligere bli isolert og identifisert ved å benytte allment kjente fremgangsmåter slik som polyakrylamid-gelelektroforese (PAGE) og Western-blott-analyse.

I ett aspekt av oppfinnelsen blir antistoffproduksjon utført i stor mengde ved hjelp av en fermenteringsprosess. En rekke storskala-matet-parti-fermenteringsprosedyrer er tilgjengelige for produksjon av rekombinante proteiner. Storskalafermenteringer har en

kapasitet på minst 1000 liter, fortrinnsvis omtrent 1000-10 000 liter. Disse fermentorene benytter omrøringinnretninger for å fordele oksygen og næringsmidler, spesielt glukose (den foretrukne karbon/energikilden). Småskalafermentering refererer vanligvis til fermentering i en fermentor som ikke er på mer enn omtrent 100 liter i volumkapasitet, og kan variere fra omtrent 1 liter til omtrent 100 liter.

I en fermenteringsprosess blir induksjon av proteinekspresjon typisk satt i gang etter at cellene har blitt dyrket ved passende betingelser til en ønsket tetthet, f.eks. en OD₅₅₀ på omtrent 180-220, og ved dette stadiet er cellene i den tidlig stasjonære fasen. En rekke inducere kan bli benyttet i overensstemmelse med vektorkonstruksjonen som blir benyttet, slik det er kjent på fagområdet og beskrevet ovenfor. Celler kan bli dyrket i kortere tidsperioder før induksjon. Celler blir vanligvis induisert i omtrent 12-50 timer, selv om lengre eller kortere induksjonstider kan bli benyttet.

For å forbedre produksjonsutbyttet og kvaliteten av polypeptidene ifølge oppfinnelsen kan ulike fermenteringsbetingelser bli modifisert. For eksempel for å forbedre den riktige sammensetningen og foldingen av de utskilte antistoffpolypeptidene kan ytterligere vektorer som overuttrykker chaperonproteiner, slik som Dsb-proteinet (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD og DsbG) eller FkpA (en peptidylprolyl-cis,trans-isomerase med chaperonaktivitet) bli benyttet for å kotransformere de prokaryote vertscellene. Chaperonproteinene har blitt vist å fremme den riktige sammensetningen og løseligheten av heterologe proteiner som er produsert i bakterievertsceller (Chen et al. (1999) *J Biol Chem* 274:19601-19605, Georgiou et al., US patentskrift nr. 6 083 715, Georgiou et al., US patentskrift nr. 6 027 888, Bothmann og Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105, Ramm og Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113, Arie et al. (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210).

For å minimalisere proteolyse av uttrykte, heterologe proteiner (spesielt de som er proteolytisk sensitive), kan visse vertsstammer som mangler proteolytiske enzymer bli benyttet i foreliggende oppfinnelse. Vertscellestammer kan for eksempel bli modifisert slik at det blir innført genetiske mutasjoner i genene som koder for kjente bakterielle proteaser slik som protease-III, OmpT, DegP, Tsp, Protease-I, Protease-Mi, Protease-V, Protease-VI og kombinasjoner derav. Noen *E. coli*-proteasemanglende stammer er tilgjengelige og beskrevet for eksempel i Joly et al. (1998), ovenfor, Georgiou et al., US patentskrift nr. 5 264 365, Georgiou et al., US patentskrift nr. 5 508 192, Hara et al., *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

I én utførelsesform blir *E. coli*-stammer som mangler proteolytiske enzymer og som er transformert med plasmider som overuttrykker én eller flere chaperonproteiner benyttet som vertsceller i ekspresjonssystemet ifølge oppfinnelsen.

Antistoffrensing

I én utførelsesform blir antistoffproteinet som er produsert her ytterligere renses for

å oppnå sammensetninger som er vesentlig homogene for ytterligere analyse og
 anvendelser. Standard proteinrensefremgangsmåter som er kjent på fagområdet kan bli
 benyttet. De følgende prosedyrene er eksempler på passende renseprosedyrer:

5 fraksjonering på immuaffinitets- eller ionebytterkolonner, etanolpresipitering, reversfase-
 HPLC, kromatografi på silika eller på et kationbytteresin slik som DEAE, kromatofokusering,
 SDS-PAGE, ammoniumsulfatpresipitering og gelfiltrering ved å benytte for eksempel
 Sephadex G-75.

I ett aspekt blir protein-A som er immobilisert på en fast fase benyttet til immu-
 affinitetsrensing av fullengde antistoffproduktene ifølge oppfinnelsen. Protein-A er et
 10 celleveggprotein på 41 kD fra *Staphylococcus aureus* som binder med en høy affinitet til Fc-
 regionen på antistoffer. Lindmark et al. (1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13. Den faste fasen
 som protein-A er immobilisert på er fortrinnsvis en kolonne som omfatter en glass- eller
 silikaoverflate, mer foretrukket en kolonne med kontrollert poreglass eller en kiselsyre-
 kolonne. I noen applikasjoner har kolonnen blitt belagt med et reagens, slik som glyserol, i
 15 et forsøk på å forhindre ikke-spesifikk adhering av kontaminanter.

Som det første trinnet i rensing blir sammensetningen som er utvunnet fra celle-
 kulturen som beskrevet ovenfor påsatt den protein-A-immobiliserte faste fasen for å tillate
 spesifikk binding av antistoffet av interesse til protein-A. Den faste fasen blir deretter vasket
 for å fjerne kontaminanter som er ikke-spesifikt bundet til den faste fasen. Til slutt blir
 20 antistoffet av interesse gjenvunnet fra den faste fasen ved hjelp av eluering.

Fremstilling av antistoffer ved å benytte eukaryote vertsceller:

Vektorkomponentene inkluderer vanligvis én eller flere av de følgende: en
 signalsekvens, et origo for replikasjon, ett eller flere markørgener, et enhancerelement, en
 25 promotor og en transkripsjons-termineringssekvens.

(i) Signalsekvenskomponent

En vektor til anvendelse i en eukaryot vertscelle kan også inneholde en signal-
 sekvens eller annen polypeptid som har et spesifikt kløyvingssete på N-terminalen av det
 30 modne proteinet eller polypeptidet av interesse. Den heterologe signalsekvensen som er
 valgt er fortrinnsvis én som blir gjenkjent og prosessert (dvs. kløyvd av en signalpeptidase)
 av vertscellen. Ved pattedyr-celle-ekspressjon er pattedyr-signalsekvenser i tillegg til
 sekretoriske ledere fra virus, for eksempel herpes simplex-gD signalet tilgjengelig.

DNA for en slik forløpperregion blir ligert i leseramme til DNA som koder for
 35 antistoffet.

(ii) Origo for replikasjon

Generelt er ikke et origo for replikasjonskomponent nødvendig for pattedyr-ekspresjonsvektorer. SV40-origoet kan for eksempel vanligvis bli benyttet bare fordi den inneholder den tidlige promotoren.

5 (iii) Seleksjons-genkomponent

Ekspresjons- og kloningsvektorer kan inneholde et seleksjonsgen, også betegnet en selekterbar markør. Typiske seleksjonsgener koder for proteiner som (a) overfører resistens overfor antibiotika eller andre toksiner, f.eks. ampicillin, neomycin, metotreksat eller tetrasyklin, (b) komplementerer auksotrofe mangler, der det er relevant, eller (c) tilfører kritiske næringsstoffer som ikke er tilgjengelige fra komplekse medier.

Ett eksempel på et seleksjonsskjema benytter et legemiddel for å stoppe veksten for en vertscelle. De cellene som er vellykket transformert med et heterologt gen produserer et protein som overfører legemiddelresistens og overlever på det viset seleksjonsregimet. Eksempler på slik dominant seleksjon benytter legemidlene neomycin, mykofenolsyre og hygromycin.

Et annet eksempel på passende selekterbare markører for pattedyrceller er de som muliggjør identifiseringen av celler som er kompetente til å ta opp antistoff-nukleinsyren, slik som DHFR, tymidinkinase, metallotionein-I og -II, fortrinnsvis primat-metallotionein-gener, adenosindeaminase, ornitindekarboksylase, osv.

For eksempel blir celler som er transformert med DHFR-seleksjonsgenet først identifisert ved å dyrke alle transformantene i et kulturmedium som inneholder metotreksat (Mtx), som er en kompetitiv antagonist av DHFR. En passende vertscelle når villtype-DHFR blir benyttet, er kinesisk hamster ovarie(CHO)-cellelinjen som mangler DHFR-aktivitet (f.eks. ATCC CRL-9096).

Alternativt kan vertsceller, (spesielt villtypeverter som inneholder endogent DHFR) som er transformert eller kotransformert med DNA-sekvenser som koder for et antistoff, villtype-DHFR-protein og en annen selekterbar markør slik som aminoglykosid-3'-fosfo-transferase (APH) bli selektert ved cellevekst i medium inneholdende seleksjonsmiddel for den selekterbare markøren slik som et aminoglykosidantibiotika, f.eks. kanamycin, neomycin eller G418. Se US patentskrift nr. 4 965 199.

(iv) Promotorkomponent

Ekspresjons- og kloningsvektorer inneholder vanligvis en promotor som blir gjenkjent av vertsorganismen og som er opererbart bundet til antistoffpolypeptid-nukleinsyren. Promotorsekvenser er kjent for eukaryoter. Nesten alle eukaryote gener har en AT-rik region lokalisert omtrent 25-30 baser oppstrøms fra stedet der transkripsjonen blir startet. En annen sekvens som er funnet 70-80 baser oppstrøms fra transkripsjonsorigoet for mange gener er en CNCAAT-region der N kan være ethvert nukleotid. På den 3' enden av de fleste eukaryote gener ligger det en AATAAA-sekvens som kan være signalet for

påsetning av poly-A-halen på den 3' enden av den kodende sekvensen. Alle disse sekvensene blir hensiktsmessig innsatt i eukaryote ekspresjonsvektorer.

Antistoffpolypeptid-transkripsjon fra vektorer i pattedyrvertsceller blir kontrollert for eksempel av promotorer som er fremskaffet fra genomene til virus slik som polyomavirus, fuglekoppevirus, adenovirus (slik som adenovirus-2), bovint papillomvirus, fuglesarkomvirus, cytomegalovirus, et retrovirus, hepatitt-B-virus og apevirus-40 (SV40), fra heterologe pattedyrpromotorer, f.eks. aktinpromotoren eller en immunglobulinpromotor, fra varmesjokkpromotorer, gitt at slike promotorer er kompatible med vertscellesystemene.

De tidlige og sene promotorene til SV40-viruset oppnås hensiktsmessig som et SV40-restriksjonsfragment som også inneholder replikasjonsorigoet for SV40. Den umiddelbart tidlige promotoren fra det humane cytomegaloviruset oppnås hensiktsmessig som et HindIII E-restriksjonsfragment. Et system for å uttrykke DNA i pattedyrverter ved å benytte det bovine papillomviruset som en vektor er tilkjennegjort i US patentskrift nr. 4 419 446. En modifisering av dette systemet er beskrevet i US patentskrift nr. 4 601 978. Se også Rayes et al., *Nature* 297:598-601 (1982) når det gjelder uttrykking av humant β -interferon-cDNA i museceller under kontrollen av en tymidinkinasepromotor fra herpes simplex-virus. Alternativt kan den lange terminale repetisjonen fra Rous sarkomvirus bli benyttet som promotoren.

20 (v) *Enhancerelement-komponent*

Transkripsjon av DNA som koder for antistoffpolypeptidet ifølge denne oppfinnelsen i høyere eukaryoter blir ofte økt ved å sette inn en enhancersekvens i vektoren. Mange enhancersekvenser er kjent fra pattedyrgener (globin, elastase, albumin, α -fetoprotein og insulin). Vanligvis vil man imidlertid benytte en enhancer fra et eukaryot cellevirus. Eksempler inkluderer SV40-enhanceren på den sene siden av replikasjonsorigoet (bp 100-270), enhanceren til den tidlige promotoren fra cytomegaloviruset, polyoma-enhanceren på den sene siden av replikasjonsorigoet og adenovirusenhancere. Se også Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) når det gjelder enhancerelementer for aktivering av eukaryote promotorer. Enhanceren kan bli spleiset inn i vektoren på en posisjon 5' eller 3' i forhold til den antistoffpolypeptid-kodende sekvensen, men blir fortrinnsvis lokalisert på et sted 5' i forhold til promotoren.

(vi) *Transkripsjonsterminerings-komponent*

Ekspresjonsvektorer som blir benyttet i eukaryote vertsceller vil typisk også inneholde sekvenser som er nødvendig for terminering av transkripsjonen og for å stabilisere mRNA. Slike sekvenser er allment tilgjengelige fra de 5' og noen ganger fra de 3' ikke-translaterte regionene på eukaryote eller virus DNA eller cDNA. Disse regionene inneholder nukleotidsegmenter som blir transkribert som polyadenylerte fragmenter i den ikke-translaterte delen av mRNA som koder for et antistoff. En nyttig transkripsjonsterminerings-

komponent er den bovine veksthormon-polyadenyleringsregion. Se WO 94/11026 og ekspresjonsvektoren som er tilkjenngjort der.

(vii) Seleksjon og transformasjon av vertsceller

5 Egnede vertsceller for kloning eller ekspresjon av DNA i vektoren her inkluderer høyere eukaryote celler som er beskrevet her, inkludert virveldyr-vertsceller. Dyrking av virveldyrceller i kultur (vevskultur) har blitt en rutinemessig prosedyre. Eksempler på nyttige pattedyrvertscellelinjer er apenyre-CV1-linjen som er transformert med SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), human embryonal nyrelinje (293- eller 293-cellesublonet for vekst i
10 suspensjonskultur, Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)), babyhamsternyrecelle (BHK, ATCC CCL 10), kinesisk hamster ovarieceller/-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)), muse-sertoliceller (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)), apenyreceller (CV1 ATCC CCL 70), nyreceller fra afrikansk grønnape (VERO-76, ATCC CRL-1587), humane cervixkarsinomceller (HELA, ATCC CCL 2), hundenyreceller
15 (MDCK, ATCC CCL 34), bøffelrotte-leverceller (BRL 3A, ATCC CRL 1442), humane lungeceller (W138, ATCC CCL 75), humane leverceller (Hep G2, HB 8065), musebryst-tumorceller (MMT 060562, ATCC CCL51), TRI-celler (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)), MRC 5-celler, FS4-celler og en human hepatomlinje (Hep G2).

Vertsceller blir transformert med de ovenfor beskrevne ekspresjons- eller klonings-
20 vektorene for antistoffproduksjon og dyrket i konvensjonelle næringsmedier som er modifisert slik at det er hensiktsmessig for å indusere promotorer, selektere transformanter eller amplifisere genene som koder for de ønskede sekvensene.

(viii) Dyrking av vertscellene

25 Vertscellene som blir benyttet for å produsere et antistoff ifølge denne oppfinnelsen kan bli dyrket i en rekke medier. Kommersielt tilgjengelig medium slik som Ham's F10 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Minimal Essential Medium (MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) og Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma) er egnet for å dyrke vertscellene. I tillegg kan ethvert av mediene som er beskrevet i Ham et al., *Meth. Enz.* 58-
30 44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), US patentskrifter nr. 4 767 704, 4 657 866, 4 927 762, 4 560 655 eller 5 122 469, WO 90/03430, WO 87/00195 eller US patent Re. 30,985 kan bli benyttet som kulturmedier for vertscellene. Ethvert av disse mediene kan suppleres om nødvendig med hormoner og/eller andre vekstfaktorer (slik som insulin, transferin eller epidermal vekstfaktor), salter (slik som natriumklorid, kalsium,
35 magnesium og fosfat), buffere (slik som HEPES), nukleotider (slik som adenosin og tymidin), antibiotika (slik som GENTAMYCIN-legemiddel), sporstoffer (definert som uorganiske forbindelser som vanligvis foreligger ved sluttkonsentrasjoner i mikromolarområdet) og glukose eller en ekvivalent energikilde. Alle andre nødvendige tilsetninger kan også bli inkludert ved passende konsentrasjoner som vil være kjent for fagfolk på området.

Dyrkningsbetingelsene, slik som temperatur, pH og lignende, er de som tidligere er blitt benyttet med vertscellen som er valgt til ekspresjon, og vil være åpenbare for fagfolk på området.

5 (ix) Rensing av antistoff

Når man benytter rekombinante teknikker kan antistoffet bli produsert intracellulært eller direkte utskilt i mediet. Hvis antistoffet blir produsert intracellulært blir, som et første trinn, det partikulære avfallet, enten vertsceller eller lyserte fragmenter, fjernet, for eksempel ved sentrifugering eller ultrafiltrering. Der antistoffet blir utskilt i mediet blir 10 supernatanter fra slike ekspresjonssystemer vanligvis først konsentrert ved å benytte et kommersielt tilgjengelig proteinkonsentreringsfilter, for eksempel en ultrafiltreringsenhet fra Amicon eller Millipore Pellicon. En proteaseinhibitor slik som PMSF kan bli inkludert i ethvert av de foregående trinnene for å inhibere proteolyse og antibiotika kan bli inkludert for å hindre veksten av skadelige kontaminanter.

15 Antistoffsammensetningen som er fremstilt fra cellene kan bli rensed ved å benytte for eksempel hydroksylapatittkromatografi, gelelektroforese, dialyse og affinitetskromatografi, der affinitetskromatografi er den foretrukne renseteknikken. Egnetheten av protein-A som en affinitetsligand avhenger av typen og isotypen av et hvilket som helst immunoglobulin Fc-domene som foreligger på antistoffet. Protein-A kan bli benyttet til å rense antistoffer 20 som er basert på humane $\gamma 1$ -, $\gamma 2$ - eller $\gamma 4$ -tunge kjeder (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). Protein-G blir anbefalt for alle muse-isotyper og for human $\gamma 3$ (Guss et al., *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). Matriksen som affinitetsliganden er koblet til er som oftest agarose, men andre matriser er tilgjengelige. Mekanisk stabile matriser slik som kontrollert poreglass eller poly(styrendivinyl)benzen muliggjør raskere strømningshastigheter og 25 kortere prosesseringstider enn det som kan bli oppnådd med agarose. Der antistoffet omfatter C_H3-domenet, er Bakerbond ABX™-resinet (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) nyttig til rensing. Andre teknikker for proteinrensing slik som fraksjonering på en ionebytterkolonne, etanolpresipitering, reversfase-HPLC, kromatografi på silika, kromatografi på heparin SEPHAROSE, kromatografi på en anion- eller kationbytterresin (slik som 30 polyasparaginsyrekolonne), kromatofokusering, SDS-PAGE, og ammoniumsulfatpresipitering er også tilgjengelig avhengig av antistoffet som skal gjenvinnes.

Etter eventuelle forutgående rensetrinn kan blandingen som omfatter antistoffet av interesse og kontaminanter bli utsatt for hydrofobinteraksjons-kromatografi med lav pH ved å benytte en elueringsbuffer med en pH på mellom omtrent 2,5-4,5, fortrinnsvis utført ved 35 lave saltkonsentrasjoner (f.eks. fra omtrent 0-0,25 M salt).

Aktivitetsanalyser

Antistoffene ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli karakterisert for deres fysiske/-kjemiske egenskaper og biologiske funksjoner ved hjelp av ulike analyser som er kjent på fagområdet.

5 De rensede immunglobulinene kan ytterligere bli karakterisert ved hjelp av en serie analyser inkludert N-terminal sekvensering, aminosyreanalyser, ikke-denaturerende størrelsesekskludering høytrykksvæske kromatografi (HPLC), massespektrometri, ionebytterkromatografi og papainspalting.

I visse utførelsesformer av oppfinnelsen blir immunglobulinene som er produsert her 10 analysert for deres biologiske aktivitet. I noen utførelsesformer blir immunglobulinene ifølge foreliggende oppfinnelse testet for deres antigenbindingsaktivitet. Antigenbindingsanalysene som er kjent på fagområdet og som kan bli benyttet her inkluderer enhver direkte eller kompetitiv bindingsanalyse ved å benytte teknikker slik som Western-blotting, radioimmunanalyse, ELISA (enzymbundet immunosorbentanalyse), "sandwich"-immunanalyse, immun- 15 presipiteringsanalyse, fluorescensimmunanalyser og protein-A-immunanalyse. En illustrerende antigenbindingsanalyse blir tilveiebrakt nedenfor i eksempeldelen.

I én utførelsesform omfatter foreliggende oppfinnelse et endret antistoff som innehar noen, men ikke alle, effektorfunksjoner, noe som gjør det til en ønsket kandidat for mange applikasjoner der halveringstiden av antistoffet *in vivo* er viktig, men likevel er visse 20 vektorfunksjoner (slik som komplement og ADCC) nødvendig eller skadelig. I visse utførelsesformer blir Fc-aktivitetene til det produserte immunglobulinet målt for å sikre at kun de ønskede egenskapene blir opprettholdt. *In vitro* og/eller *in vivo* cytotoxicitetsanalyser kan bli utført for å bekrefte reduksjonen/depleksjonen av CDC- og/eller ADCC-aktiviteter. Fc-reseptor-(FcR)-bindingsanalyse kan for eksempel bli utført for å sikre at 25 antistoffet mangler Fc γ R-binding (og mangler dermed sannsynlig ADCC-aktivitet), men opprettholder FcRn-bindingsevne. De primære cellene for å mediere ADCC, NK-celler, uttrykker kun Fc γ R1, mens monocytter uttrykker Fc γ R1, Fc γ R2 og Fc γ R3. FcR-ekspressjon på hematopoietiske celler er oppsummert i tabell 3 på side 464 i Ravetch og Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). Et eksempel på en *in vitro*-analyse for å undersøke ADCC- 30 aktivitet for et molekyl av interesse er beskrevet i US patentskrift nr. 5 500 362 eller 5 821 337. Nyttige effektorceller for slike analyser inkluderer perifere, mononukleære blodceller (PBMC) og naturlige dreperceller (NK)-celler. Alternativt, eller i tillegg, kan ADCC-aktivitet for molekylet av interesse bli undersøkt *in vivo*, for eksempel i en dyremodell slik som den som er tilkjennegjort i Clynes et al., *PNSA (USA)* 95:652-656 (1998). C1q- 35 bindingsanalyse kan også bli utført for å bekrefte at antistoffet ikke er i stand til å binde C1q og dermed mangler CDC-aktivitet. For å undersøke komplementaktivering kan en CDC-analyse, for eksempel som beskrevet i Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996), bli utført. FcRn-binding og *in vivo*-klaring/halveringstids-bestemmelser kan

også bli utført ved å benytte fremgangsmåter som er kjent på fagområdet, for eksempel de som er beskrevet i eksempeldelen.

Humaniserte antistoffer

5 Foreliggende oppfinnelse omfatter humaniserte antistoffer. Ulike fremgangsmåter for å humanisere ikke-humane antistoffer er kjent på fagområdet. For eksempel kan et humanisert antistoff ha én eller flere aminosyrerester introdusert i seg fra en kilde som er ikke-human. Disse ikke-humane aminosyrerestene blir ofte referert til som "importrester", som typisk blir tatt fra et "importvariabelt domene". Humanisering kan hovedsakelig bli
10 utført ved å følge fremgangsmåten til Winter og samarbeidspartnere (Jones et al. (1986) *Nature* 321:522-525, Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-327, Verhoeyen et al. (1988) *Science* 321:1534-1536), ved å substituere hypervariabel regionsekvenser med tilsvarende sekvenser fra et humant antistoff. Følgelig er slike "humaniserte" antistoffer kimære antistoffer (US patentskrift nr. 4 816 567) der vesentlig mindre enn et intakt humant variabelt
15 domene har blitt substituert med den tilsvarende sekvensen fra en ikke-human art. I praksis er humaniserte antistoffer typisk humane antistoffer der noen hypervariabel regionrester og muligens noen FR-rester er substituert med rester fra analoge seter i gnagerantistoffet.

Valget av humane variabeldomener, både lette og tunge, som skal bli benyttet i fremstilling av de humaniserte antistoffene er svært viktig for å redusere antigenisitet. Ifølge
20 den såkalte "best-fit"-fremgangsmåten blir sekvensen til det variable domenet for et gnagerantistoff screenet mot hele biblioteket av kjente humane variabelt domene sekvenser. Den humane sekvensen som ligger nærmest gnagersekvensen blir deretter akseptert som det humane rammeverket for det humaniserte antistoffet (Sims et al. (1993) *J. Immunol.* 15:2296, Chothia et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901. En annen fremgangsmåte benytter et
25 spesielt rammeverk som er avledet fra konsensus-sekvensen til alle humane antistoffer i en spesiell undergruppe med lette eller tunge kjeder. Det samme rammeverket kan bli benyttet til flere ulike humaniserte antistoffer (Carter et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285, Presta et al. (1993) *J. Immunol.*, 151:2623.

Det er videre viktig at antistoffer blir humanisert med opprettholdelse av høy
30 affinitet for antigenet og andre fordelaktige biologiske egenskaper. For å oppnå dette målet, ifølge én fremgangsmåte, så blir det humaniserte antistoffet fremstilt ved hjelp av en prosess med analyse av opphavssekvensene og ulike konseptmessige, humaniserte produkter ved å benytte tredimensjonale modeller av opphavssekvensene og de humaniserte sekvensene. Tredimensjonale immunglobulinmodeller er allment tilgjengelige
35 og er kjent for fagfolk på området. Dataprogrammer er tilgjengelige som illustrerer og viser mulige, tredimensjonale, konformasjonelle strukturer for valgte kandidat immunglobulinsekvenser. Inspeksjon av disse visningene muliggjør analyse av den sannsynlige rollen til restene i virkningen til kandidat-immunglobulinsekvensen, dvs. analysen av rester som påvirker evnen for kandidat-immunglobulinet til å binde sitt antigen. På denne måten kan

FR-resider bli valgt og kombinert fra mottaker- og importsekvensene slik at de ønskede antistoffkarakteristika slik som økt affinitet for målantigenet/ene, blir oppnådd. Vanligvis er hypervariabel regionrestene direkte og mest vesentlig involvert i å påvirke antigenbinding.

5 *Antistoffvarianter*

I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen antistoff-fragmenter som omfatter modifiseringer på grenseflaten til Fc-polypeptidene som omfatter Fc-regionen og hvor modifiseringene fremmer og/eller øker heterodimerisering. Disse modifiseringene omfatter introduksjon av et fremspring inn i et første Fc-polypeptid og et hulrom i et annet Fc-polypeptid, der fremspringet er posisjonerbart i hulrommet for å fremme kompleksing for det første og det andre Fc-polypeptidet. Fremgangsmåte for å fremstille antistoff med disse modifiseringene er kjent på fagområdet, for eksempel som beskrevet i US patentskrift nr. 5 731 168.

I noen utførelsesformer er aminosyresekvensmodifisering(er) av antistoffene som er beskrevet her påtenkt. For eksempel kan det være ønskelig å forbedre bindingsaffiniteten og/eller andre biologiske egenskaper for antistoffet. Aminosyresekvensvarianter av antistoffet blir fremstilt ved å introdusere passende nukleotidringer i antistoff-nukleinsyren, eller ved hjelp av peptidsyntese. Slike modifiseringer inkluderer for eksempel deleasjoner fra og/eller insersjoner i og/eller substitusjoner av rester på aminosyresekvensen til antistoffet. Enhver kombinasjon av deleasjon, insersjon og substitusjon blir gjort for å komme frem til den endelige konstruksjon, gitt at den endelige konstruksjonen innehar de ønskede karakteristika. Aminosyreendringene kan bli introdusert i antistoff-aminosyresekvensen på det tidspunktet sekvensen blir fremstilt.

En nyttig fremgangsmåte for å identifisere visse rester eller regioner i antistoffet som er foretrukne lokaliseringer for mutagenese ble kalt "alanin-skanningsmutagenese" som beskrevet av Cunningham og Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. Her blir en rest eller gruppe av målrester identifisert (f.eks. ladede rester slik som arg, asp, his, lys og glu) og erstattet med nøytrale eller negativt ladede aminosyrer (mest foretrukket alanin eller polyalanin) for å påvirke interaksjonen av aminosyrene med antigen. De aminosyrelokaliseringene som viser funksjonell sensitivitet overfor substitusjonene ble deretter foredlet ved å introdusere ytterligere eller andre varianter på, eller istedenfor, setene med substitusjon. Mens setet for å introdusere en aminosyresekvens-variasjon er forutbestemt så trenger således egenskapen til mutasjonen *per se* ikke å være forutbestemt. For eksempel for å analysere oppførselen til en mutasjon på et gitt sete blir ala-fjerning eller tilfeldig mutagenese utført på målkodonet eller regionen og de uttrykte immunoglobulinene blir screenet for den ønskede aktiviteten.

Aminosyresekvens-insersjoner inkluderer amino- og/eller karboksyterminale fusjoner som varierer i lengde fra én rest til polypeptider som inneholder 100 eller flere rester, i tillegg til intrasekvens-insersjoner av enkelte eller flere aminosyrerester. Eksempler

på terminale insersjon inkluderer et antistoff med en N-terminal metionylrest eller et antistoff som er fusjonert til et cytotoxisk polypeptid. Andre insersjonsvarianter av antistoffmolekylet inkluderer fusjonen til N- eller C-terminalen av antistoffet med et enzym (f.eks. ADEPT) eller et polypeptid som øker halveringstiden til antistoffet i serum.

- 5 En annen type variant er en aminosyre-substitusjonsvariant. Disse variantene har fått minst én aminosyrerest i antistoffmolekylet erstattet med en annen rest. Setene av størst interesse for substitusjonsmutagenese inkluderer de hypervariable regionene, men FR-endringer er også påtenkt. Konservative substitusjoner er vist i tabell 2 under overskriften "foretrukne substitusjoner). Hvis slike substitusjoner resulterer i en endring i biologisk aktivitet så kan mer vesentlige endringer, betegnet "eksempelmessige substitusjoner" i tabell 2, eller som ytterligere beskrevet nedenfor med referanse til aminosyreklasser, bli introdusert og produktene kan bli screenet.

Tabell 2

Opprinnelig rest	Eksempelmessige substitusjoner	Foretrukne substitusjoner
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucin	Leu
Leu (L)	Norleucin; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe, Ala; Norleucin	Leu

- 15 Vesentlige modifiseringer i de biologiske egenskapene til antistoffet blir oppnådd ved å velge substitusjoner som avviker signifikant i deres virkning på å opprettholde (a)

strukturen til polypeptid-rygggradstrukturen i området med substitusjonen, for eksempel som en flak-konformasjon eller heliks-konformasjon, (b) ladningen eller hydrofobisiteten til molekylet på målstedet eller (c) omfanget av sidekjeden. Aminosyrer kan bli gruppert i overenstemmelse med likheter i egenskapene til deres sidekjeder (i A.L. Lehninger, i

5 Biochemistry, andre utgave, s. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

(1) ikke-polar: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) uladete polar: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) sure: Asp (D), Glu (E)

(4) basiske: Lys (K), Arg (R), His(H)

10 Alternativt kan naturlig forekommende rester oppdeles i grupper basert på felles sidekjede-egenskaper:

(1) hydrofobe: Norleucin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) nøytrale hydrofile: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) sure: Asp, Glu;

15 (4) basiske: His, Lys, Arg;

(5) rester som påvirker kjedeorienteringen: Gly, Pro;

(6) aromatiske: Trp, Tyr, Phe.

Ikke-konservative substitusjoner vil medføre å bytte én av disse klassene med en annen klasse. Slike substituerte rester kan også bli introdusert på de konservative

20 substitusjonssetene, eller mer foretrukket, inn i de gjenværende (ikke-konserverte) setene.

En type av substitusjonsvariant omfatter å substituere én eller flere hypervariable regionrester for et opphavsantistoff (f.eks. et humanisert eller humant antistoff). Vanligvis vil den resulterende varianten som er valgt til ytterligere utvikling ha forbedrede biologiske egenskaper i forhold til opphavsantistoffet fra hvilket de er generert. En hensiktsmessig

25 måte å generere slike substitusjonsvarianter på involverer affinitetsmodning ved å benytte phage-display. Kort fortalt blir flere hypervariable regionrester (f.eks. 6-7 rester) mutert for å generere alle mulige aminosyresubstitusjoner på dette setet. Antistoffene som blir generert på denne måten blir vist på filamentøse bakteriofagpartikler som fusjoner til gen-III-

30 produktet fra M13 pakket inne i hver partikkel. De bakteriofagviste variantene blir deretter screenet for deres biologiske aktivitet (f.eks. bindingsaffinitet) som tilkjennegjort her. For å identifisere kandidat-hypervariable regionrester for modifisering kan alanin-skannings-

mutagenese bli utført for å identifisere hypervariable regionrester som bidrar vesentlig til antigenbinding. Alternativt, eller i tillegg, så kan det være fordelaktig å analysere en

35 antistoffet og antigenet. Slike kontaktrester og naborester er kandidater for substitusjon ifølge teknikkene som er utarbeidet her. Med én gang slike varianter er generert blir panelet av varianter utsatt for screening som beskrevet her og antistoffer med overlegne egenskaper i én eller flere relevante analyser kan bli valgt for ytterligere utvikling.

Nukleinsyremolekyler som koder for aminosyresekvens-varianter av antistoffet fremstilles ved en rekke forskjellige fremgangsmåter som er kjente innen faget. Disse fremgangsmåtene omfatter isolering fra en naturlig kilde (når det gjelder naturlig forekommende aminosyresekvens-varianter) eller fremstilling ved oligonukleotid-mediert (eller setestyrkt) mutagenese, PCR-mutagenese og kassettmutagenese av en tidligere fremstilt variant eller en ikke-variantversjon av antistoffet.

Det kan være ønskelig å innføre én eller flere aminosyremodifikasjoner i en Fc-region i immunoglobulin-polypeptidene ifølge oppfinnelsen, slik at det dannes en Fc-region-variant. Fc-regionvarianten kan omfatte en human Fc-regionsekvens (f.eks. en humant IgG1-, IgG2-, IgG3- eller IgG4-Fc-region) som omfatter en aminosyremodifisering (f.eks. en substitusjon) i én eller flere aminosyreposisjoner, innbefattet posisjonen for et hengsel-cystein.

I samsvar med denne beskrivelsen og læren innen teknikkens stand er det påtenkt at et antistoff anvendt i fremgangsmåter ifølge oppfinnelsen i noen utførelser kan omfatte én eller flere endringer sammenlignet med det tilsvarende villtypeantistoff, for eksempel i Fc-regionen. Disse antistoffene vil ikke desto mindre beholde vesentlig de samme karakteristika som er nødvendig for terapeutisk bruk sammenlignet med deres villtypemotpart. For eksempel er det antatt at visse endringer kan bli gjort på Fc-regionen som vil føre til endret (dvs. enten forbedret eller minsket) C1q-binding og/eller komplementavhengig cytotoxicitet (CDC), for eksempel som beskrevet i WO 99/51642. Se også Duncan & Winter *Nature* 322:738-40 (1988), US patentskrift nr. 5 648 260, US patentskrift nr. 5 624 821 og WO 94/29351 når det gjelder andre eksempler på Fc-regionvarianter.

Immunkonjugater

Oppfinnelsen gjelder også immunkonjugater eller antistoff-legemiddelkonjugater (ADC), som omfatter et antistoff konjugert til et cytotoxisk middel, slik som et kjemoterapeutisk middel, et legemiddel, et vekstinhiberende middel, et toksin (f.eks. et enzymatisk aktivt toksin med opphav fra bakterier, sopp, planter eller dyr eller fragmenter derav) eller en radioaktiv isotop (dvs. et radiokonjugat).

Anvendelse av antistoff-legemiddelkonjugater for lokal tilførsel av cytotoxiske eller cytostatiske midler, dvs. midler som dreper eller inhiberer tumorceller, i behandling av kreft (Syrgos og Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614, Niculescu-Duvaz og Springer (1997) *Adv. Drg. Del. Rev.* 26:151-172, US patentskrift 4 975 278) tillater teoretisk målstyrt tilførsel av legemiddelgruppen til tumorer og intracellulær akkumulering i disse, dersom systemisk tilførsel av disse ikke-konjugerte legemiddelmidlene kan føre til et uakseptabelt nivå av toksisitet overfor normale celler så vel som tumorcellene som man forsøker å fjerne (Baldwin et al., (1986) *Lancet* s. (mar. 15., 1986):603-05, Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", i *Monoclonal Antibodies '84: Biological And clinical Applications*, A. Pinchera et al. (red.), s. 475-506). Maksimal virkning

med minimal toksisitet er det man prøver å oppnå. Både polyklonale antistoffer og monoklonale antistoffer har blitt rapportert å være anvendbare i disse strategiene (Rowland et al., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87). Legemidler som anvendes i disse fremgangsmåtene omfatter daunomycin, doksorubicin, metotreksat og vindesin (Rowland et al., (1986), ovenfor). Toksiner som anvendes i antistoff-toksinkonjugater omfatter bakterietoksiner som difteritoksin, plantetoksiner som ricin, lavmolekylære toksiner som geldanamycin (Mandler et al. (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1572-1581; Mandler et al. (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028, Mandler et al. (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maytansinoider (EP 1391213; Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623), og calicheamicin (Lode et al. (1998) *Cancer Res.* 58:2928, Hinman et al. (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). Toksinene kan utøve sine cytotoxiske og cytostatiske virkninger ved mekanismer som omfatter tubulinbinding, DNA-binding eller topoisomeraseinhibering. Noen cytotoxiske legemidler har en tendens til å være inaktive eller mindre aktive sammenlignet med store antistoffer eller proteinreseptorligander.

ZEVALIN (ibritumomab-tiuxetan, Biogen/Idec) er et antistoff/radioisotopkonjugat sammensatt av et murint, monoklonalt IgG1 kappa-antistoff rettet mot CD20-antigenet funnet på overflaten av normale og maligne B-lymfocytter og ¹¹¹In eller ⁹⁰Y bundet via en tiourealinker-chelator (Wiseman et al. (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77, Wiseman et al. (2002) *Blood* 99(12):4336-42, Witzig et al. (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63, Witzig et al. (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69). Selv om ZEVALIN har aktivitet mot B-celle-ikke-Hodgkins lymfom (NHL) som før administrering til alvorlige og forlengede cytopenier hos de fleste pasienter. MYLOTARG (gemtuzumab-ozogamicin, Wyeth Pharmaceuticals), et antistoff-legemiddelkonjugat som består av et humant CD33-antistoff koblet til kalicheamicin, ble i 2000 godkjent for behandling av akutt myeloid leukemi ved injeksjon (*Drugs of the Future* (2000) 25(7): 686, US patentskrift nr. 4 970 198, 5 079 233, 5 585 089, 5 606 040, 5 693 762, 5 739 116, 5 767 285, 5 773 001). Kantuzumab-mertansin (Immunogen, Inc.), et antistoff-legemiddelkonjugat som består av hu242-antistoffet bundet via disulfidlinkeren SPP til maytansinoidlegemiddelenheten DM1, er på vei inn i fase-II-utredningen for behandlingen av kreftformer som uttrykker CanAg, slik som kolonkreft, pankreaskreft, magekreft og andre. MLN-2704 (Millenium Pharm., BZL Biologics, Immunogen, Inc.), et antistoff-medikamentkonjugat som består av et monoklonalt antistoff rettet mot prostataspesifikt membranantigen (PSMA), koblet til maytansinoid-legemiddelgruppen DM1, er under utvikling for mulig behandling av prostatatumorer. Auristatin-peptidene, auristatin E (AE) og monometylauristatin (MMAE), syntetiske analoger av dolastatin, ble konjugert til de kimære monoklonale antistoffene cBR96 (spesifikt for Lewis Y på karsonimer) og cAC10 (spesifikt for CD30 på hematologiske maligniteter) (Doronina et al. (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784) og Francisco, et al. (2003) *Blood*, 102, 1458-1465) og er under terapeutisk utvikling. Andre forbindelser til anvendelse som legemiddel-

konjugatcytotoksisitetsmidler inkluderer auristatin-E (AE), MMAF (en variant av auristatin-E (MMAE) med et fenylalanin på den C-terminale enden av legemidlet) og AEVB (auristatin-E-valerylbenzylhydrazon, som er en syrelabil linker gjennom C-terminalen til AE). Nyttige konjugatlinkere for å koble et legemiddel til et antistoff inkluderer uten begrensning MC (maleimidokaproyl), Val Cit (valin-sitrullin, dipeptidsete på proteasekløyvbar linker), Citrullin (2-amino-5-ureido-pentansyre), PAB (p-aminobenzylkarbamoyl, som er en "selvfrende" del av en linker), Me (N-metyl-valincitrullin der linkerpeptidbindingen har blitt modifisert for å forhindre dens kløyving ved katepsin-B), MC(PEG)6-OH (maleimidokaproyl-polyetylen glykol, bundet til antistoffcysteinet), SPP (N-suksinimidyl-4-(2-pyridyltio)pentanoat), og SMCC (N-suksinimidyl-4-(N-maleimidometyl)sykloheksan-1-karboksylat). Disse og andre nyttige legemiddelkonjugater og deres fremstilling er for eksempel tilkjennegjort i Doronina, S.O. et al., *Nature Biotechnology* 21:778-794 (2003). Spesielt foretrukne linkermolekyler inkluderer f.eks. N-suksinimidyl-3-(2-pyridyldito)propionat (SPDP) (se f.eks. Carlsson et al., *Biochem. J.*, 173, 723-737 (1978)), N-suksinimidyl-4-(2-pyridylditio)butanoat (SPDB) (se f.eks. US patentskrift nr. 4 563 304), N-suksinimidyl-4-(2-pyridylditio)pentanoat (SPP) (se f.eks. CAS registreringsnummer 341498-08-6), N-suksinimidyl-4-(N-maleimidometyl)sykloheksan-1-karboksylat (SMCC) (se f.eks. Yoshitake et al., *Eur. J. Biochem.*, 101, 395-399 (1979)) og N-suksinimidyl-4-metyl-4-[2-(5-nitro-pyridyl)-ditio]pentanoat (SMNP) (se f.eks. US patentskrift nr. 4 563 304).

Kjemoterapeutiske midler som er nyttige i fremstillingen av slike immunkonjugater har blitt beskrevet ovenfor. Enzymatisk aktive toksiner eller fragmenter derav som kan bli benyttet inkluderer difteri-A-kjede, ikke-bindende aktive fragmenter av difteritoksin, eksotoksin-A-kjede (fra *Pseudomonas aeruginosa*), ricin-A-kjede, abrin-A-kjede, modeccin-A-kjede, alfa-sarcin, *Aleurites fordii*-proteiner, diantinproteiner, *Phytolaca americana*-proteiner (PAPI, PAPII og PAP-S), momordica charantia-inhibitor, kursin, krotin, sapaonaria officinalis-inhibitorer, gelonin, mitogellin, restriktocin, fenomycin, enomycin og trikotecenene. En mengde radionuklider er tilgjengelige for fremstillingen av radiokonjugert antistoff. Eksempler inkluderer ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y og ¹⁸⁶Re. Konjugater av antistoffet og det cytotoxiske midlet blir fremstilt ved å benytte en mengde bifunksjonelle proteinkoblingsmidler slik som N-suksinimidyl-3-(2-pyridylditio)propionat (SPDP), iminotiolan (IT), bifunksjonelle derivater av imidoestere (slik som dimetyladipimidat-HCl), aktive estere (slik som disuksinimidylsuberat), aldehyder (slik som glutaraldehyd), bis-azido-forbindelser (slik som bis-(p-azidobenzoyl)heksandiamin), bis-diazoniumderivater (slik som bis-(p-diazoniumbenzoyl)-etylendiamin), diisocyanater (slik som toluen-2,6-diisocyanat) og bis-aktive fluorforbindelser (slik som 1,5-difluor-2,4-dinitrobenzen). Et ricinimmuntoksin kan f.eks. bli fremstilt som beskrevet i Vitetta et al., *Science*, 238: 1098 (1987). Karbon-14-merket-1-isotiocyanatbenzyl-3-metyldietylenetriaminpentaeddiksyre (MX-DTPA) er et eksempelmessig gelaterende middel for konjugering av radionukleid til antistoffet. Se WO 94/11026.

Konjugater av et antistoff og ett eller flere småmolekyltoksiner, slik som kalicheamycin, maytansinoider, et trikotecen og CC1065, og derivatene av disse toksinene som har toksinaktivitet, er også påtenkt her.

5 *Maytansin og maytansinoider*

I én utførelsesform blir et antistoff (fullengde eller fragment) ifølge oppfinnelsen konjugert til ett eller flere maytansinoidmolekyler.

Maytansinoider er mitotiske inhibitorer som virker ved å inhibere tubulinpolymerisering. Maytansin ble først isolert fra den øst afrikanske busken *Maytenus serrata* (US patentskrift nr. 3 896 111). Deretter ble det oppdaget at visse mikrober også produserer maytansinoider, slik som maytansinol og C-3-maytansinolestere (US patentskrift nr. 4 151 042). Syntetisk maytansinol og derivater og analoger derav f.eks. tilkjennegjort i US patentskrift nr. 4 137 230, 4 248 870, 4 256 746, 4 260 608, 4 265 814, 4 294 757, 4 307 016, 4 308 268, 4 308 269, 4 309 428, 4 313 946, 4 315 929, 4 317 821, 4 322 348, 15 4 331 598, 4 361 650, 4 364 866, 4 424 219, 4 450 254, 4 362 663 og 4 371 533.

Maytansinoid-antistoffkonjugater

I et forsøk på å forbedre den terapeutiske indeks har maytansin og maytansinoider blitt konjugert til antistoffer som spesifikt bindes til tumorcelleantigener. Immunkonjugater 20 som omfatter maytansinoider og terapeutisk anvendelse av dem beskrives for eksempel i US patentskrifter nr. 5 208 020, 5 416 064 og europeisk patentskrift EP 0 425 235 B1. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) beskrev immunkonjugater som omfattet et maytansinoid betegnet DM1 koblet til det monoklonale antistoff C242, som er rettet mot human kolorektal kreft. Konjugatet ble funnet å være svært cytotoxisk mot 25 dyrkede kolonkreftceller og viste antitumoraktivitet i en *in vivo*-tumorvekstanalyse. Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992) beskriver immunkonjugater hvori et maytansinoid var konjugert via en disulfidlinker til det murine antistoffet A7 som binder til et antigen på humane kolonkreftcellelinjer, eller til et annet murint, monoklonalt antistoff TA.1 som binder HER2-/*neu*-onkogen. Cytotoksiteteten til TA.1-maytansinoidkonjugatet ble testet *in vitro* på 30 den humane brystkreftcellelinjen SK-BR-3, som uttrykker 3×10^5 HER-2-overflateantigener pr. celle. Legemiddelkonjugatet oppnådde en cytotoksitetsgrad lignende den for fritt maytansinoidlegemiddel, som kunne bli økt ved å øke antallet maytansinoidmolekyler pr. antistoffmolekyl. A7-maytansinoidkonjugatet viste lav systemisk cytotoksitet hos mus.

35 *Antistoff-maytansinoidkonjugater (immunkonjugater)*

Antistoff-maytansinoidkonjugater blir fremstilt ved kjemisk å binde et antistoff til et maytansinoidmolekyl uten vesentlig å minske den biologiske aktiviteten til verken antistoffet eller maytansinoidmolekylet. Et gjennomsnitt på 3-4 maytansinoidmolekyler konjugert pr. antistoffmolekyl har blitt vist effektivt i å forsterke cytotoksitet for målceller uten negativt

å påvirke virkningen eller løseligheten til antistoffet, selv om til og med ett molekyl med toksin/antistoff vil være forventet å forsterke cytotoxiskitet i forhold til anvendelsen av nakent antistoff. Maytansinoider er velkjente på fagområdet og kan bli syntetisert ved hjelp av kjente teknikker eller isolert fra naturlige kilder. Passende maytansinoider er for eksempel tilkjennegjort i US patentskrift nr. 5 208 020 og i de andre patentene og ikke-patentpublikasjonene som er referert til her ovenfor. Foretrukne maytansinoider er maytansinol og maytansinolanaloger som er modifisert på den aromatiske ringen eller på andre posisjoner på maytansinolemolekylet, slik som ulike maytansinolestere.

Det er kjent mange linkergrupper på fagområdet for å fremstille antistoff-maytansinoidkonjugater, inkludert for eksempel de som er tilkjennegjort i patentskrift nr. 5 208 020 eller EP patentskrift 0 425 235 B1 og Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992). Linkergruppene inkluderer disulfidgrupper, tioetergrupper, syrelabile grupper, fotolabile grupper, peptidaselabile grupper eller esterelabile grupper, som tilkjennegjort i de ovenfor identifiserte patentene, der disulfid- og tioetergrupper er foretrukket.

Konjugater mellom antistoffet og maytansinoid kan fremstilles ved anvendelse av en rekke forskjellige bifunksjonelle proteinkoblingsmidler, slik som N-suksinimidyl-3-(2-pyridylditio)-propionat (SPDP), suksinimidyl-4-(N-maleimidometyl)-sykloheksan-1-karboksylat, iminotiolan (IT), bifunksjonelle derivater av imidoestere (slik som dimetyladiimidat-HCl), aktive estere (slik som disuksinimidylsuberat), aldehyder (slik som glutaraldehyd), bis-azido-forbindelser (slik som bis(p-azidobenzoyl)-heksandiamin), bis-diazoniumderivater (slik som bis-(p-diazoniumbenzoyl)-etylendiamin), diisocyanater (slik som toluen-2,6-diisocyanat), og bis-aktive fluorforbindelser (slik som 1,5-difluor-2,4-dinitrobenzen). Spesielt foretrukne koblingsmidler omfatter N-suksinimidyl-3-(2-pyridylditio)propionat (SPDP) (Carlsson et al., *Biochem. J.* 173:723-737 [1978] og N-suksinimidyl-4-(2-pyridyltio)-pentanoat (SPP) for dannelse av en disulfidbinding.

Linkeren kan være bundet til maytansinoidmolekylet i forskjellige posisjoner avhengig av typen binding. For eksempel kan en esterbinding dannes ved reaksjon med en hydroksylgruppe ved anvendelse av konvensjonelle koblingsteknikker. Reaksjonen kan skje i C-3-posisjonen med en hydroksylgruppe, C-14-posisjonen modifisert med hydroksymetyl, C-15-posisjonen modifisert med en hydroksylgruppe og C-20-posisjonen med en hydroksylgruppe. I en foretrukket utførelse dannes bindingen i C-3-posisjonen i maytansinol eller en maytansinolanalog.

Kalicheamicin

Et annet immunkonjugat av interesse omfatter et antistoff konjugert til ett eller flere kalicheamicinmolekyler. Kalicheamicinfamilien av antibiotika kan gi dobbelttrådede DNA-brudd i sub-pikomolare konsentrasjoner. For fremstilling av konjugater av kalicheamicinfamilien, se US patentskrifter nr. 5 712 374, 5 714 586, 5 739 116, 5 767 285, 5 770 701, 5 770 710, 5 773 001, 5 877 296 (alle tilhørende American Cyanamid Company).

Strukturanaloger av kalicheamicin som kan anvendes omfatter γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-acetyl- γ_1^I , PSAG og θ^I (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) og de ovenfor nevnte US patentskrifter tilhørende American Cyanamid). Et annet anti-tumorlegemiddel som antistoffet kan bli konjugert til er QFA som er et antifolat. Både kalicheamicin og QFA har intracellulære virkningssteder og krysser ikke enkelt plasmamembranen. Derfor øker cellulært opptak av disse midlene gjennom antistoffmediert internalisering kraftig deres cytotoxiske effekter.

Andre cytotoxiske midler

Andre antitumormidler som kan konjugeres til antistoffene ifølge oppfinnelsen omfatter BCNU, streptoicidin, vinkristin og 5-fluoruracil, familien av midler som under ett betegnes LL-E33288-kompleks, som beskrives i US patentskrifter nr. 5 053 394 og 5 770 710, så vel som esperamiciner (US patentskrift nr. 5 877 296).

Enzymatisk aktive toksiner og fragmenter derav som kan anvendes omfatter difteri A-kjede, ikke-bindende, aktive fragmenter av difteritoksin, eksotoksin A-kjede (fra *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A-kjede, abrin A-kjede, modeccin A-kjede, alfa-sarcin, *Aleurites fordii*-proteiner, diantinproteiner, *Phytolaca americana*-proteiner (PAPI, PAPII og PAP-S), momordica charantia-inhibitor, kurcin, krotin, sapaonaria officinalis-inhibitor, gelonin, mitogellin, restriktocin, fenomycin, enomycin og trikotecenene. Se for eksempel WO 93/21232, offentliggjort 28. oktober 1993.

Foreliggende oppfinnelse omfatter ytterligere et immunkonjugat som er dannet mellom et antistoff og en forbindelse med nukleolytisk aktivitet (f.eks. en ribonuklease eller en DNA-endonuklease slik som en deoksyribonuklease, DNase).

For selektiv ødeleggelse av tumoren kan antistoffet omfatte et svært radioaktivt atom. En mengde radioaktive isotoper er tilgjengelige for fremstillingen av radiokonjugerte antistoffer. Eksempler inkluderer Ar^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} og radioaktive isotoper av Lu. Når konjugatet blir benyttet til påvisning kan det omfatte et radioaktivt atom for scintigrafiske undersøkelser, f.eks. tc^{99m} eller I^{123} , eller et spinmerke for nukleærmagnetisk resonans (NMR) synliggjøring (også kjent som magnetisk resonans-synliggjøring, mri), slik som jod-123 igjen, jod-131, indium-111, fluor-19, karbon-13, nitrogen-15, oksygen-17, gadolinium, mangan eller jern.

Radiomerkene eller de andre merkene kan bli inkorporert i konjugatet på kjente måter. Peptidet kan for eksempel bli biosyntetisert eller kan bli syntetisert ved hjelp av kjemisk aminosyresyntese ved å benytte passende aminosyreforløpere som f.eks. involverer fluor-19 i stedet for hydrogen. Merker slik som tc^{99m} eller I^{123} , Re^{186} , Re^{188} og In^{111} kan bli koblet til via en cysteinrest på peptidet. Yttrium-90 kan bli koblet via en lysinrest. IODOGEN-fremgangsmåten (Fraker et al. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57) kan bli benyttet for å inkorporere jod-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) beskriver andre fremgangsmåter i detalj.

Konjugater av antistoffer og det cytotoxiske middel kan fremstilles ved anvendelse av en rekke forskjellige bifunksjonelle proteinkoblingsmidler, slik som N-suksinimidyl-3-(2-pyridylditio)propionat (SPDP), suksinimidyl-4-(N-maleimidometyl)sykloheksan-1-karboksyilat, iminotiolan (IT), bifunksjonelle derivater av imidoestere (slik som dimetyl-
 5 adipimidat-HCl), aktive estere (slik som disuksinimidylsuberat), aldehyder (slik som glutaraldehyd), bis-azidoforbindelser (slik som bis(p-azidobenzoyl)heksandiamin), bis-diazoniumderivater (slik som bis-(p-diazoniumbenzoyl)-etylendiamin), diisocyanater (slik som toluen-2,6-diisocyanat), og bis-aktive fluorforbindelser (slik som 1,5-difluor-2,4-dinitrobenzen). For eksempel kan et ricinimmuntoksin fremstilles som beskrevet i Vitetta et
 10 al., *Science* 238:1098 (1987). Karbon-14-merket 1-isotiocyanatobenzyl-3-metyldietylen-triaminpentaeddiksyre (MX-DTPA) er et eksempel på et chelateringsmiddel for konjugering av radionukleotid til antistoffet. Se WO 94/11026. Linkeren kan være en "kløyvbar linker" som fremmer frigjøring av det cytotoxiske legemidlet i cellen. For eksempel kan en syrelabil linker, peptidasesensitiv linker, fotolabil linker, dimetyl linker eller disulfidinneholdende linker
 15 (Chari et al., *Cancer Research* 52: 127-131 (1992), US patentskrift nr. 5 208 020).

Forbindelsen ifølge oppfinnelsen omfatter ADC fremstilt med krysslengerreagenser: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC og sulfo-SMPB og SVSB (suksinimidyl-(4-vinylsulfon)benzoat) som er kommersielt tilgjengelig (f.eks. fra Pierce
 20 Biotechnology, Inc., Rockford, IL., USA). Se s. 467-498, 2003-2004 Applications Handbook og katalog.

Fremstilling av antistoff-legemiddelkonjugater

I antistoff-legemiddelkonjugatene (ADC) ifølge oppfinnelsen er et antistoff (Ab)
 25 konjugert til én eller flere legemiddelenheter (D), f.eks. omtrent 1 til omtrent 20 legemiddelenheter pr. antistoff, via en linker (L). ADC med formel I kan bli fremstilt på flere måter som benytter organiske kjemireaksjoner, betingelser og reagenser som er kjent for fagfolk på området inkludert: (1) reaksjon av en nukleofil gruppe på et antistoff med et bivalent linkerreagens for å danne Ab-L, via en kovalent binding, etterfulgt av reaksjon med
 30 en legemiddelenhet (D), og (2) reaksjon med en nukleofil gruppe på en legemiddelenhet med et bivalent linkerreagens for å danne D-L, via en kovalent binding, etterfulgt av reaksjon med den nukleofile gruppen på et antistoff.



35 Nukleofile grupper på antistoffer inkluderer: (i) N-terminale aminogrupeer, (ii) sidekjedeaminogrupeer, f.eks. lysin (iii) sidekjedetiolergrupper, f.eks. cystein og (iv) sukkerhydroksyl- eller aminogrupeer der antistoffet er glykosylert. Amin-, tiol- og hydroksylgrupper er nukleofile og i stand til å reagere for å danne kovalente bindinger med elektrofile grupper på linkereneheter og linkerreagenser inkludert: (i) aktive estere slik som NHS-estere,

HOBt-estere, haloformater og syrehalider, (ii) alkyl- og benzyhalider slik som haloacetamider, (iii) aldehyder, ketoner, karboksyl- og maleimidgrupper. Visse antistoffer har reduserbare interkjededisulfider, dvs. cysteinbroer. Antistoffer kan bli gjort reaktive for konjugering med linkerreagenser ved behandling med et reduserende middel slik som DTT (ditiotreititol). Hver cysteinbro vil slik teoretisk danne to reaktive tiolnukleofiler. Ytterligere nukleofile grupper kan bli introdusert på antistoffene via reaksjonen av lysiner med 2-iminotiolat (Trauts reagens) som fører til konvertering av et amin til en tiol.

Antistofflegemiddelkonjugater ifølge oppfinnelsen kan også bli fremstilt ved modifisering av antistoffet for å introdusere elektrofile enheter, som kan reagere med de nukleofile substituentene på linkerreagiset eller legemidlet. Sukkerne på glykosylerte antistoffer kan være oksiderte, f.eks. med periodatoksiderende reagenser, for å danne aldehyd- eller ketongrupper som kan reagere med amingruppen på linkerreagiset eller legemiddelenhetene. De resulterende imin-Schiff-basegruppene kan danne en stabil binding, eller kan bli redusert, f.eks. ved hjelp av borhydridreagenser for å danne stabile aminbindinger. I én utførelsesform kan reaksjon av karbohydratdelen til et glykosylert antistoff med enten galaktoseoksidase eller natriummetaperiodat i karbonylgrupper (aldehyd- og ketongrupper) på proteinet som kan reagere med passende grupper på legemidlet (Hermanson, Bioconjugat Techniques). I en annen utførelsesform kan proteiner som inneholder N-terminale serin- eller treoninrester reagere med natriummetaperiodat, som fører til produksjon av et aldehyd istedenfor den første aminosyren (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146, US 5 362 852). Slike aldehyder kan bli reagert med en legemiddelenhet eller en linkernukleofil.

Likeledes inkluderer nukleofile grupper på en legemiddelenhet: amin-, tiol-, hydroksyl-, hydrazid-, oksim-, hydrazin-, tiosemikarbazon-, hydrazinkarboksylat- og arylhydrazidgrupper som er i stand til å reagere for å danne kovalente bindinger med elektrofile grupper på linkereneheter og linkerreagenser inkludert (i) aktive estere slik som NHS-estere, HOBt-estere, haloformater og syrehalider, (ii) alkyl- og benzyhalider slik som haloacetamider, (iii) aldehyder, ketoner, karboksyl- og maleimidgrupper.

Alternativt kan et fusjonsprotein som omfatter antistoffet og det cytotoxiske midlet bli fremstilt, f.eks. ved hjelp av rekombinante teknikker eller peptidsyntese. Lengden av DNA kan omfatte respektive regioner som koder for de to delene av konjugatet enten inntil hverandre eller separert av en region som koder for et linkerpeptid som ikke ødelegger de ønskede egenskapene til konjugatet.

I nok en annen utførelsesform kan antistoffet bli konjugert til en "reseptor" (slik som streptavidin) til anvendelse i tumorforhåndsøking der antistoffreseptorkonjugatet blir administrert til pasienten etterfulgt av fjerning av ubundet konjugat fra sirkulasjon ved å benytte et klaringsmiddel og deretter administrering av en "ligand" (f.eks. avidin) som er konjugert til et cytotoxiske middel (f.eks. et radionukleotid).

Antistoffderivater

Antistoffene ifølge foreliggende oppfinnelse kan ytterligere bli modifisert slik at de inneholder ytterligere ikke-proteininnholdende enheter som er kjent på fagområdet og som er enkelt tilgjengelige. Fortrinnsvis er enhetene som er passende til derivatisering av anti-

5 stoffet vannløselige polymerer. Ikke-begrensede eksempler på vannløselige polymerer inkluderer polyetylen glykol (PEG), kopolymerer av etylen glykol/-propylen glykol, karboksy-

metylcellulose, dekstran, polyvinylalkohol, polyvinylpyrrolidon, poly-1,3,-dioksan, poly-1,3,6-trioksan, etylen/eplesyreanhydridkopolymer, polyamino syrer (enten homopolymerer eller tilfeldige kopolymerer) og dekstran eller poly(n-vinylpyrrolidon)-polyetylen glykol,

10 propylen glykolhomopolymerer, polypropylenoksid/etylenoksid-kopolymerer, polyoksy-

etylerte polyoler (f.eks. glyserol), polyvinylalkohol og blandinger derav. Polyetylen glykol-

propionaldehyd kan ha fordeler i fremstilling på grunn av dens stabilitet i vann. Polymeren kan være av enhver molekylvekt, og kan være forgrenet eller uforgrenet. Antallet polymerer som er koblet til antistoffet kan variere, og hvis mer enn én polymer er tilkoblet kan de være

15 det samme molekylet eller ulike molekyler. Vanligvis kan antallet og/eller typen av polymerer som blir benyttet til derivatisering bli bestemt ved overveielser inkludert de spesielle egenskapene eller funksjonene til antistoffet som skal bli forbedret, uansett om antistoffderivatet vil bli benyttet i en terapi ved definerte betingelser, osv.

20 Farmasøytiske formuleringer

Terapeutiske formuleringer som omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen blir fremstilt for lagring ved å blande antistoffet som har den ønskede graden av renhet med eventuelt fysiologisk akseptable bærere, eksipienser eller stabilisatorer (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16. utgave, Osol, A. red. (1980)), i form av vandige løsninger,

25 lyofiliserte eller andre tørkede formuleringer. Akseptable bærere, eksipienser eller stabilisatorer er ikke-toksiske for mottakerne ved doseringene og konsentrasjonene som blir benyttet, og inkluderer buffere slik som fosfat, sitrat, histidin og andre organiske syrer, antioksidanter inkludert askorbinsyre og metionin, konserveringsmidler (slik som oktadecyl-

30 dimetylbenzylammoniumklorid, heksametoniumklorid, benzalkoniumklorid, benzetonium-

klorid, fenol, butyl- eller benzylalkohol, alkylparabener slik som metyl-propylparaben, katechol, resorcinol, sykloheksanol, 3-pentanol og m-kresol), lavmolekylærvektspolypeptider (mindre enn omtrent 10 rester), proteiner slik som serumalbumin, gelatin eller immun-

globuliner, hydrofile polymerer slik som polyvinylpyrrolidon, aminosyrer slik som glysin, glutamin, asparagin, histidin, arginin eller lysin, monosakkarider, disakkarider og andre

35 karbohydrater inkludert glukose, mannose eller dekstriner, gelaterende midler slik som EDTA, sukkertyper slik som sukrose, mannitol, trehalose eller sorbitol, saltdannende

motioner slik som natrium, metallkomplekser (f.eks. Zn-proteinkomplekser) og/eller ikke-

ioniske overflateaktive midler slik som TWEEN, PLURONICS eller polyetylen glykol (PEG).

Formuleringen her kan også inneholde mer enn én aktiv forbindelse slik det er nødvendig for den spesielle indikasjonen som blir behandlet, fortrinnsvis de med komplementære aktiviteter som ikke skadelig påvirker hverandre. Slike molekyler er hensiktsmessig tilstede i kombinasjon i mengder som er effektive for formålet som er påtenkt.

De aktive ingrediensene kan også bli fanget inn i mikrokapsler som for eksempel er fremstilt ved hjelp av koacerveringsteknikker eller ved grenseflatepolymerisering, for eksempel hydroksymetylcellulose eller gelatinmikrokapsler og poly-(metylmetacrylat)-mikrokapsler, i kolloidale legemiddelleveringssystemer (for eksempel liposomer, albuminmikrokuler, mikroemulsjoner, nanopartikler og nanokapsler) eller i makroemulsjoner. Slike teknikker er tilkjennegjort i *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16. utgave, Osol, A. red. (1980).

Formuleringene som skal bli benyttet til *in vivo*-administrering må være sterile. Dette kan enkelt bli oppnådd ved filtrering gjennom sterilfiltreringsmembraner.

Sammensetninger med vedvarende frigjøring kan bli fremstilt. Passende eksempler på sammensetninger med vedvarende frigjøring inkluderer halvgjennomtrengelige matriser av faste, hydrofobe polymerer som inneholder immunglobulin ifølge oppfinnelsen, der matrisene foreligger i form av formgitte artikler, f.eks. filmer eller mikrokapsler. Eksempler på matriser med vedvarende frigjøring inkluderer polyestere, hydrogeler (for eksempel poly(2-hydroksyetylmetakrylat) eller poly(vinylalkohol)), polylaktider (US patentskrift nr. 3 773 919), kopolymerer av L-glutaminsyre og γ -etyl-L-glutamat, ikke-nedbrytbart etylenvinylacetat, nedbrytbare melkesyre-glykolsyrekopolymerer slik som LUPRON DEPOT (injiserbare mikrokuler sammensatt av melkesyre-glykolsyrekopolymer og leuprolidacetat) og poly-D-(-)-3-hydroksysmørsyre. Mens polymerer slik som etylenvinylacetat og melkesyre-glykolsyre muliggjør frigjøring av molekyler i mer enn 100 dager så frigjør visse hydrogeler proteinene i kortere tidsperioder. Når innkapslede immunglobuliner forblir i kroppen i lang tid kan de denaturere eller aggregere som et resultat av eksponering for fuktighet ved 37 °C, noe som fører til et tap av biologisk aktivitet og mulige endringer i immunogenisitet. Rasjonelle strategier kan bli benyttet for stabilisering avhengig av mekanismen som er involvert. For eksempel hvis aggregeringsmekanismen blir oppdaget å være intermolekylær S-S-bindingsdannelse via tiodisulfidinterendring så kan stabilisering bli oppnådd ved å modifisere sulfhydrylrester, lyofilisere fra sure løsninger, kontrollere fuktighetsinnhold, benytte passende tilsetningsstoffer og utvikle spesifikke polymermatris-sammensetninger.

Anvendelser

Et antistoff ifølge oppfinnelsen kan for eksempel bli benyttet i *in vitro*-, *ex vivo*- og *in vivo*-terapeutiske fremgangsmåter. Antistoffer ifølge oppfinnelsen kan bli benyttet som en antagonist for delvis eller fullstendig å blokkere den spesifikke antigenaktiviteten *in vitro*, *ex*

vivo og/eller *in vivo*. Minst noen av antistoffene ifølge oppfinnelsen kan videre nøytralisere antigenaktivitet fra andre arter. Dermed kan antistoffene ifølge oppfinnelsen bli benyttet for å inhibere en spesifikk antigenaktivitet, f.eks. i en cellekultur som inneholder antigenet, hos humane individer eller i andre pattedyrindivider som har antigenet som antistoff ifølge oppfinnelsen kryssreagerer med (f.eks. sjimpanse, bavian, marmosettape, cynomolgusape og resusape, gris eller mus). I én utførelsesform kan antistoffet ifølge oppfinnelsen bli benyttet for å inhibere antigenaktiviteter ved å kontakte antistoffet med antigenet slik at antigenaktiviteten blir inhibert. Fortrinnsvis er antigenet et humant proteinmolekyl.

I én utførelsesform kan et antistoff ifølge oppfinnelsen bli benyttet i en fremgangsmåte for å inhibere et antigen hos et individ som lider av en forstyrrelse der antigenaktiviteten er skadelig, som omfatter å administrere et antistoff ifølge oppfinnelsen til individet slik at antigenaktiviteten hos individet ble inhibert. Fortrinnsvis er antigenet et humant proteinmolekyl og individet er et humant individ. Alternativt kan individet være et pattedyr som uttrykker antigenet som et antistoff ifølge oppfinnelsen binder til. Ytterligere kan individet være et pattedyr i hvilket antigenet har blitt introdusert (f.eks. ved administrering av antigenet eller ved uttrykking av et antigentransgen). Et antistoff ifølge oppfinnelsen kan bli administrert til et humant individ for terapeutiske formål. Et antistoff ifølge oppfinnelsen kan videre bli administrert til et ikke-humant pattedyr som uttrykker et antigen som immunglobulinet kryssreagerer med (f.eks. en primat, gris eller mus) for veterinærhensikter eller som en dyremodell for human sykdom. Når det gjelder det siste kan slike dyremodeller være nyttige for å evaluere den terapeutiske effektiviteten av antistoffer ifølge oppfinnelsen (f.eks. for å teste doseringer og tidsforløp ved administrering). Blokkerende antistoffer ifølge oppfinnelsen som er terapeutisk nyttige inkluderer for eksempel anti-HER2-, anti-VEGF-, anti-IgE-, anti-CD11-, anti-interferon- og anti-vevsfaktorantistoffer. Antistoffene ifølge oppfinnelsen kan bli benyttet til å behandle, inhibere, forsinke progresjon av, forhindre/forsinke tilbakekomst av, lindre, eller forhindre sykdom, forstyrrelse eller tilstander som er assosiert med unormal uttrykking og/eller aktivitet for ett eller flere antigenmolekyler, inkludert maligne og godartede tumorer, ikke-leukemier og lymfoide maligniteter, nevronforstyrrelser, gliforstyrrelser, astrocyttforstyrrelser, hypotalamusforstyrrelser og andre glandulære forstyrrelser, makrofagforstyrrelser, epitelforstyrrelser, stromaforstyrrelser og blastokolforstyrrelser, og inflammatoriske, angiogene og immunologiske forstyrrelser.

I ett aspekt er et blokkerende antistoff ifølge oppfinnelsen spesifikt for et ligand-antigen og inhiberer antigenaktiviteten ved å blokkere eller interferere med ligand-reseptorinteraksjonen som involverer ligandantigenet, for derved å inhibere den tilsvarende signalveien og andre molekulære eller cellulære hendelser. Oppfinnelsen fremmer også reseptorspesifikke antistoffer som ikke nødvendigvis forhindrer ligandbinding men som interfererer med reseptoraktivering, for derved å inhibere enhver respons som normalt vil bli satt i gang ved ligandbindingen. Oppfinnelsen omfatter også antistoffer som enten

fortrinnsvis eller eksklusivt binder til ligand-reseptorkomplekset. Et antistoff ifølge oppfinnelsen kan også virke som en agonist for en spesiell antigenreseptor, for derved å styrke, forsterke eller aktivere enten alle eller partielle aktiviteter for den ligandmedierte reseptoraktivering.

5 I visse utførelsesformer blir et immunkonjugat som omfatter et antistoff konjugert til et cytotoxisk middel administrert til pasienten. I noen utførelsesformer blir immunkonjugatet og/eller antigenet som de er bundet til internalisert av cellen, noe som fører til økt terapeutisk effektivitet for immunkonjugatet i å drepe den målsøkte cellen som det binder til. I én utførelsesform målsøker eller interfererer det cytotoxiske midlet med
10 nukleinsyre i målcellen. Eksempler på slike cytotoxiske midler inkluderer ethvert av de kjemoterapeutiske midlene som er fremlagt her (slik som et maytansinoid eller et kalicheamycin), en radioaktiv isotop eller en ribonuklease eller en DNA-endonuklease.

Antistoffer ifølge oppfinnelsen kan bli benyttet enten alene eller i kombinasjon med andre sammensetninger i en terapi. For eksempel kan et antistoff ifølge oppfinnelsen bli
15 administrert sammen med et annet antistoff, kjemoterapeutisk middel/midler (inkludert blandinger av kjemoterapeutiske midler), andre cytotoxiske midler, antiangiogene midler, cytokiner og/eller veksthemmende midler. Der et antistoff ifølge oppfinnelsen inhiberer tumorvekst kan det være spesielt ønskelig å kombinere det med ett eller flere andre terapeutiske midler som også inhiberer tumorvekst. Et antistoff ifølge oppfinnelsen kan
20 f.eks. bli kombinert med et anti-VEGF-antistoff (f.eks. AVASTIN) og/eller anti-ErbB-antistoffer (f.eks. HERCEPTIN anti-HER2-antistoff) i et behandlingsskjema, f.eks. ved behandling av enhver av sykdommene som er beskrevet her, inkludert kolorektal kreft, metastatisk brystkreft og nyrekreft. Alternativt, eller i tillegg, så kan pasienten motta kombinert strålingsterapi (f.eks. ekstern strålebestråling eller terapi med et radioaktivt
25 merket middel, slik som et antistoff). Slike kombinerte terapier som er påpekt ovenfor inkluderer kombinert administrering (der de to eller flere midlene er inkludert i den samme eller i separate formuleringer) og separat administrering, i hvilket tilfelle administreringen av antistoffet ifølge oppfinnelsen kan foregå før og/eller etter administrering av den tilhørende terapien eller terapiene.

30 Antistoffet ifølge oppfinnelsen (og det tilhørende terapeutiske midlet) blir administrert på enhver passende måte, inkludert parenteralt, subkutant, intraperitonealt, intrapulmonært og intranasalt, og, hvis ønskelig for lokalbehandling, intralesjonal administrering. Parenterale infusjoner inkluderer intramuskulær, intravenøs, intraarteriell, intraperitoneal eller subkutan administrering. I tillegg blir antistoffet hensiktsmessig
35 administrert ved hjelp av pulsinfusjon, spesielt med minskende doser av antistoffet. Dosering kan foregå på enhver passende måte, f.eks. ved injeksjoner, slik som intravenøse eller subkutane injeksjoner, delvis avhengig av hvorvidt administreringen er kort eller kronisk.

Antistoffsammensetningen ifølge oppfinnelsen vil bli formulert, dosert og administrert på en måte som er i overenstemmelse med god medisinsk utøvelse. Faktorer til overveielse i denne konteksten inkluderer den spesielle forstyrrelsen som blir behandlet, det spesielle pattedyret som blir behandlet, den kliniske tilstanden til den individuelle pasienten, årsaken til forstyrrelsen, stedet for levering av midlet, fremgangsmåten for administrering, skjemaet for administrering og andre faktorer som er kjent for medisinske utøvere. Antistoffet behøver ikke å være, men er eventuelt formulert sammen med ett eller flere midler som pr. i dag blir benyttet til å forebygge eller behandle forstyrrelsen det er snakk om. Den effektive mengden av slike og andre midler avhengig av mengden av antistoffer ifølge oppfinnelsen som foreligger i formuleringen, typen av forstyrrelse eller behandling og andre faktorer som er diskutert ovenfor. Disse blir generelt benyttet i de samme doseringene og med administreringsmåter som er benyttet her før, eller omtrent fra 1-99 % av de inntil dette benyttede doseringene.

Til forebyggingen eller behandlingen av sykdom vil den passende doseringen av et antistoff ifølge oppfinnelsen (når det blir benyttet alene eller i kombinasjon med andre midler slik som kjemoterapeutiske midler) være avhengig av sykdomstypen som skal bli behandlet, antistofftypen, alvorligheten og utviklingen av sykdommen, hvorvidt antistoffet blir administrert for preventive eller terapeutiske formål, tidligere terapi, pasientens kliniske historie og respons på antistoffet, og vurderingene til den ansvarlige legen. Antistoffet blir hensiktsmessig administrert til pasienten én gang eller over en serie behandlinger. Avhengig av typen og alvorligheten av sykdommen er omtrent 1 µg/kg til 15 mg/kg (f.eks. 0,1 mg/kg til 10 mg/kg) med antistoff en utgangskandidatdosering for administrering til pasienten, hvor dette f.eks. er ved én eller ved flere separate administreringer, eller ved kontinuelig infusjon. En typisk daglig dosering kan strekke seg fra omtrent 1 µg/kg til 100 mg/kg eller mer, avhengig av faktorene som er nevnt ovenfor. For repeterte administreringer over flere dager eller lengre, avhengig av betingelsen, så blir behandlingen opprettholdt inntil en ønsket undertrykking av sykdomssymptomene forekommer. En eksempelmessig dosering av antistoffet vil ligge i området fra omtrent 0,05 mg/kg til omtrent 10 mg/kg. Slik kan én eller flere doser på omtrent 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg eller 10 mg/kg (eller enhver kombinasjon derav) bli administrert til pasienten. Slike doser kan bli administrert avbrutt, f.eks. hver uke eller hver tredje uke (f.eks. slik at pasienten mottar fra omtrent 2 til omtrent 20, f.eks. omtrent 6 doser av antistoffet). En første høyere dose, etterfulgt av én eller flere lavere doser kan bli administrert. Et eksempelmessig doseringsregime omfatter å administrere en utgangsdose på omtrent 4 mg/kg, etterfulgt av en ukentlig opprettholdelsesdose på omtrent 2 mg/kg med antistoffet. Imidlertid kan andre doseringsregimer være nyttige. Utviklingen av denne terapien er enkel å overvåke ved hjelp av konvensjonelle teknikker og analyser.

Fremstilte artikler

I et annet aspekt av oppfinnelsen blir en fremstilt artikkel som inneholder materialer som er nyttige for behandlingen, forebyggingen og/eller diagnostiseringen av forstyrrelsen som er beskrevet ovenfor tilveiebrakt. Den fremstilte artikkelen omfatter en beholder og et merke eller pakningsvedlegg på eller assosiert med beholderen. Passende beholdere inkluderer f.eks. flasker, rør, sprøyter, osv. Beholderne kan bli utformet fra en mengde materialer slik som glass eller plastikk. Beholderne inneholder en sammensetning som i seg selv eller når det blir kombinert med et annen sammensetning er effektivt til å behandle, forebygge og/eller diagnostisere tilstanden og kan ha en steril inngangsåpning (f.eks. kan beholderen være en intravenøs løsningspose eller et rør som har en åpning som er gjennomtrengbar med en hypoderm injeksjonsnål). Minst ett aktivt middel i sammensetningen er et antistoff ifølge oppfinnelsen. Merket eller pakningsvedlegget indikerer at sammensetningen blir benyttet for å behandle tilstanden som er valgt, slik som kreft. Den fremstilte artikkelen kan videre omfatte (a) en første beholder med en sammensetning inneholdt i denne, der sammen-setningen omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen og (b) en andre beholder med en sammensetning inneholdt i denne, der sammensetningen omfatter et ytterligere cytotoxisk middel. Den fremstilte artikkelen i denne utførelsesformen av oppfinnelsen kan ytterligere omfatte et pakningsvedlegg som indikerer at det første og det andre antistoff-sammensetningen kan bli benyttet til å behandle en spesiell tilstand, f.eks. kreft. Alternativt, eller i tillegg, så kan den fremstilte artikkelen ytterligere omfatte en andre (eller tredje) beholder som omfatter en farmasøytisk akseptabel buffer, slik som bakteriostatisk vann til injeksjon (BWHI), fosfatbufret saltløsning, Ringers løsning og dekstroseløsning. Den kan ytterligere inkludere andre materialer som er ønskelige fra et kommersielt ståtsted og et brukerståsted, inkludert andre buffere, fortynningsmidler, filtre, nåler og sprøyter.

Det følgende er eksempler på fremgangsmåtene og sammensetningene ifølge oppfinnelsen.

EKSEMPLER

Eksemplene her beskriver fremstillingen av humaniserte anti-beta7-antistoffer fra et rotte-anti-museantistoff som binder til beta7-subenheten på alfa4beta7-integrinet.

Eksempel 1: Humanisering av et beta7-antagonistantistoff)

Materialer og fremgangsmåter

Restnummereringer er ifølge Kabat (Kabat et al., *Sequences of proteins of immunological interest*, 5. utgave, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Enkeltbokstav aminosyreforkortelser blir benyttet. Degenereringer i DNA blir representert ved å benytte IUB-koden (N = A/C/G/T, D = A/G/T, V = A/C/G, B = C/G/T, H = A/C/T, K = G/T, M = A/C, R = A/G, S = G/C, W = A/T, Y = C/T).

Direkte hypervariabel regiontransplanteringer på det humane akseptorkonsensusrammeverket. Fagemidlet som blir benyttet i dette arbeidet, pVO350-2b, var en monovalent Fab-g3-oppvisningsvektor som har 2 åpne leserammer under kontroll av phoA-promotoren, essensielt som beskrevet i Lee et al., *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5): 1073-93. Den første åpne
 5 leserammen består av stII-signalsekvensen fusjonert til VL- og CH1-domenene på akseptorlettkjeden og den andre består av stII-signalsekvensen fusjonert til VH- og CH1-domenene på akseptortungkjeden etterfulgt av en trunkert form av det mindre bakteriofagkappeproteinet P3 (Lowman, H. et al. (1990) *Biochemistry* 30:10832).

VL- og VH-domenene fra rotte-Fib504 (antistoff FIB504.64 produsert av hybridom
 10 ATCC HB-293, American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, USA) ble sammenstilt med de humane konsensuskappa-I (huKI) og de humane undergruppe-III-konsensus-VH (huIII)-domenene. For å fremstille hypervariabel regionen (HVR)-transplantatene ble de følgende rammeverkene benyttet: HuKI ble benyttet til lettkjedevariabeldomenerammeverket (se fig. 1A og 7). For tungkjedevariabelt domene
 15 rammeverket kan akseptor-VH-rammeverket, som er et modifisert, humant undergruppe-III (humIII)-konsensus-VH-domene som er forskjellig fra humIII-sekvensen på 3 posisjoner: R71A, N73T og L78A, bli benyttet (se Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992)) (se fig. 1B). Ved fremstilling av antistoffer ifølge foreliggende oppfinnelse blir 504K-RF-transplantaten også fremstilt fra det modifiserte, humane undergruppe-III-konsensus-
 20 VH-domene ved å innføre de følgende aminosyresubstitusjonene: A71R og A78F.

Hypervariable regioner fra rotte-Fib504-antistoff (produsert av hybridom ATCC HB-293) ble satt inn i det humane akseptorundergruppe-III-konsensus-VH-rammeverket for å generere et direkte HVR-transplantat (Fib504-transplantat) (se fig. 1B). I VL-domenet ble de følgende regionene fra rotte-Fib504 transplantert på den humane konsensusakseptoren,
 25 huKI: posisjoner 24-34 (L1), 50-56 (L2) og 89-97 (L3) (fig. 1A). På VH-domenet ble posisjonene 26-35 (H1), 49-65 (H2) og 94-102 (H3) transplantert (fig. 1B). I tillegg ble et annet HVR-transplantat, Fib504Ktransplantat, konstruert som også inkluderte VL-posisjonen 49 i HVR'en, basert på en utvidet definisjon for L2 (se MacCallum et al., *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)). MacCallum et al., har analysert antistoff og antigenkompleks-krystall-
 30 strukturer og funnet at posisjonen 49 på lettkjeden og posisjonene 49 og 94 på tungkjeden er en del av antigenkontaktregionen, og slik blir disse posisjonene inkludert i definisjonene for HVR-L2, HVR-H2 og HVR-H3 for humaniserte anti-beta7-antistoffer som er tilkjennegjort her.

De direkte transplanterte variantene ble generert ved hjelp av Kunkel-mutagenese
 35 (Kunkel et al. (1987) ovenfor) ved å benytte separat oligonukleotid for hver hypervariable region. Korrekte kloner ble undersøkt ved hjelp av DNA-sekvensering.

Myk randomisering av hypervariabel regionene:

Prosesen med "myk randomisering" (se US søknad serienr. 60/545,840) refererer til en prosedyre for ensidig mutagenese av en valgt proteinsekvens, slik som en hypervariabel region på et antistoff. Fremgangsmåten opprettholder en ensidighet mot utgangshypervariabel regionen fra mus, rotte eller annen utgangshypervariabel regionsekvens, mens man introduserer omtrent 10-50 % mutasjon på hver valgte posisjon. Denne teknikken øker kapasiteten til biblioteksscreeningen som blir benyttet og unngår en endring i antigenepitopen som blir gjenkjent av antistoffet. Ifølge denne myke randomiseringsteknikken blir sekvensdiversitet introdusert på hver hypervariabel region ved å benytte en strategi som opprettholder en gjensidighet mot den murine hypervariabel regionsekvensen. Dette ble oppnådd ved å benytte en forgiftet oligonukleotidsyntese strategi som først ble beskrevet av Gallop et al., *J. Med. Chem.* 37: 1233-1251 (1994). Andre fremgangsmåter for å opprettholde en ensidighet mot den ikke-humane hypervariabel regionrestn er likevel tilgjengelig, slik som feilutsatt PCR, DNA-ombytting, osv.

Ifølge fremgangsmåten som ble benyttet her, for en gitt posisjon innenfor en hypervariabel region som blir mutert, så blir kodonet som koder for villtypeamino syren forgiftet med en blanding (f.eks. 70-10-10-10 blanding) av nukleotider som fører til en mutasjonsrate på omtrent 50 % på hver valgte hypervariabel regionposisjon. For å oppnå dette blir kodonet som koder for villtypehypervariabel regionamino syren som skal bli mutert syntetisert med et lavt nivå av kontaminerende blanding av de andre tre nukleotidene, slik som en 70-10-10-10-blanding av nukleotider. For eksempelets del, når det gjelder myk randomisering av PRO (CCG), så er slik den første posisjonen som blir syntetisert en blanding av 70 % C og 10 % hver av G, T og A, den andre posisjonen er en blanding av 70 % C og 10 % hver av A, G og T, og den tredje posisjonen er en blanding av 70 % G og 10 % hver av A, C og T. Det er på det rene at ensidigheten kan bli justert opp eller ned avhengig av kodonet som blir syntetisert på en gitt posisjon, antallet kodon som koder for en spesiell amino syre og graden som oligonukleotidsyntese blir forgiftet ved av nukleotidsammensetningen i synteseblandingen.

Mykt randomiserte oligonukleotider kan bli gitt mønster etter utgangshypervariabel regionsekvenser for mus, rotte eller andre utgangshypervariabel regionsekvenser og omfatter de samme regionene som er definert av de direkte hypervariabel region-transplantatene. Eventuelt kan to posisjoner, amino syrer på begynnelsen av H2 og H3 i VH- domenet, bli begrenset i deres diversitet: kodonet RGC kan bli benyttet på posisjon 49 som koder for A, G, S eller T og på posisjon 94, kodonet AKG kan bli benyttet som koder for M eller R.

Fremstilling av bakteriofagbiblioteker - Randomiserte oligonukleotidsamlinger som er desinget for hver hypervariable region ble fosforylert separat i seks 20 µl reaksjoner inneholdende 600 ng med oligonukleotid (50 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 20 mM DTT og 5 U polynukleotidkinase i 1 time ved 37°C. De seks fosforylerte oligonukleotidsamlingene ble deretter kombinert med 20 µg Kunkel-templat i 50 mM Tris pH

7,5, 10 mM MgCl₂ i et sluttvolum på 500 µl som førte til et forhold mellom oligonukleotid og templat på 3. Blandingen ble anilet ved 90°C i 4 min., 50°C i 5 min. og deretter avkjølt på is. Overskudd av ikke-anilet oligonukleotid ble fjernet med et QIAQUICK PCR-rensesett (Qiagen kit 28106, Qiagen, Valencia, CA) ved å benytte en modifisert protokoll for å forhindre
 5 overdreven denaturering av det tilbundede DNA. Til de 500 µl med anilet blanding ble 150 µl Qiagen-buffer PB tilsatt og blandingen ble fordelt på to silikakolonner. Etter en vasking av hver kolonne med 750 µl Qiagen-buffer PE og en ekstra sentrifugering for å tørke kolonnene ble hver kolonne eluert med 110 µl 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8. Det tilbundet og opprensede templatet (220 µl) ble deretter fylt inn ved å tilsette 1 µl 100 mM ATP, 10 µl 25
 10 mM dNTP'er (25 mM hver av dATP, dCTP, dGTP og dTTP), 15 µl 100 mM DTT, 25 µl 10X TM-buffer (0,5 M Tris, pH 7,5, 0,1 M MgCl₂), 2400 U T4-ligase og 30 U T7-polymerase i 3 timer ved romtemperatur.

Det innfylte produktet ble analysert på Tris-acetat-EDTA/agarosegeler (Sidhu et al., *Methods in Enzymology* 328:333-363 (2000)). Tre bånd er vanligvis synlige: det nederste
 15 båndet er korrekt fylt og ligert produkt, det midtre båndet er fylt men ikke ligert og det øverste båndet er tråd som er fortrent. Det øverste båndet blir produsert av en iboende sideaktivitet for T7-polymerase og er vanskelig å unngå (Lechner et al., *J. Biol. Chem.* 258:11174-11184 (1983)), likevel transformerer dette båndet 30 ganger mindre effektivt enn det nederste båndet og bidrar vanligvis lite til biblioteket. Det midtre båndet skilles fra
 20 hverandre av en 5' fosfat for den endelige ligeringsreaksjonen, og dette båndet transformerer effektivt og gir i hovedsak villtypesekvens.

Det innfylte produktet ble deretter renset opp og elektroporert inn i SS320-celler og dyrket i nærvær av M13/KO7-hjelperbakteriefag som beskrevet av Sidhu et al., *Methods in Enzymology* 328:333-363 (2000). Bibliotekstørrelser strakk seg fra 1-2 x 10⁹ uavhengig
 25 koloni. Tilfeldige kloner fra utgangsbiblioteker ble sekvensert for å vurdere bibliotekskvalitet.

Bakteriofagseleksjon - humant fullengde-integrin-alfa4beta7 ble uttrykt i 293-celler (Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)), renset ved hjelp av Fib504-affinitets-kromatografi og benyttet som målet for bakteriofagseleksjon. For immobilisering på MaxiSorp™-mikrotiterplater (Nalge Nunc, Rochester, NY), ble 100 µl med humant integrin
 30 alfa4beta7 belagt ved 5 µg/ml i 150 mM NaCl, 50 mM ris, pH 7,5, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂ og 2 mM MnCl₂ (TBSM), over natt ved 4°C. Brønner ble blokkert i 1 time ved å benytte TBSM inneholdende 1 % BSA. I den første runden med seleksjon ble 8 brønner belagt med mål benyttet, én enkelt målbelagt brønn ble benyttet i påfølgende runder med seleksjon. Bakteriofag ble høstet fra kultursupernatant og suspendert i TBSM inneholdende 1 % BSA og
 35 0,05 % Tween-20 (TBSMBT). Etter binding til brønnene i 2 timer ble ubundne fag fjernet ved omfattende vasking med TBS inneholdende 0,05 % Tween-20 (TBST). Bundne fag ble eluert ved å inkubere brønnene med 100 mM HCl i 30 min. Fag ble amplifisert ved å benytte topp 10-celler og M13/KO7-hjelperfag og dyrket over natt ved 37°C i 2 YT, 50 µg/ml karbanacillin. Titerne av fag eluert fra en målbelagt brønn ble sammenlignet med titere for fag gjenvunnet

fra en ikke-målbelagt brønn for å vurdere anriking. Etter at fire runder med seleksjon var utført ble tilfeldige kloner valgt til sekvensanalyse.

Fab-produksjon og affinitetsbestemmelse - For å uttrykke Fab-protein til affinitetsmålinger ble et stoppkodon introdusert mellom den tunge kjeden og g3 i bakteriofagvisningsvektoren. Kloner ble transformert inn i *E. coli* 34B8-celler og dyrket i AP5-medium ved 30°C (Presta, L. et al., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). Celler ble høstet ved hjepp av sentrifugering, suspendert i 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8, og brutt åpne ved å benytte en mikrofluidiserer. Fab ble rensert med protein-G-affinitetskromatografi.

Affinitetsbestemmelser ble utført ved hjelp av surface-plasmon-resonans ved å benytte en BIAcore™-3000 (Biacore, Piscataway, NJ). Humaniserte Fib504-Fab-varianter ble immobilisert i 10 mM acetat, pH 4,5 (i området fra 250-1500 responsenheter (RU)) på en CM5-sensorbrikke og to ganger fortyndinger med humant integrin alfa4beta7 (1,5-770 nM) i TBSP inneholdende 2 % n-oktylglukosid ble injisert. Hver prøve ble analysert med 5 min. assosiering og 5-60 min. dissosieringstider. Etter hver injeksjon ble brikken regenerert ved å benytte tre 1 min. injeksjoner med 8 M urea. Bindingsrespons ble korrigert ved å trekke RU-verdien fra en nullprøvestrømningscelle. En 1:1 Langmuir-modell med samtidig tilpasning av k_{on} og k_{off} ble benyttet for kinetikkanalyser.

Resultater og diskusjon

Humanisering av rotte-Fib504 - Det humane akseptorrammeverket som ble benyttet til humanisering er basert på rammeverket som er benyttet for HERCEPTIN® og består av det humane konsensus-kappa-I (huKI)-VL-domenet og en variant av det humane undergruppe-III (humIII)-konsensus-VH-domenet. Dette variant-VH-domenet har tre endringer i forhold til den humane konsensusen: R71A, N73T og L78A. VL- og VH-domenene i rotte-Fib504 ble hver sammenstilt med de humane kappa-I- og undergruppe-III-domenene, hver hypervariabel region (HVR) ble identifisert og transplantert på det humane akseptorrammeverket for å generere et HVR-transplantat (504-transplantat) som kunne bli oppvist som en Fab på bakteriofag (fig. 1A og 1B).

Basert på analysen av tilgjengelige antistoff- og antigenkomplekskrystallstrukturer foreslå MacCallum et al. (MacCallum et al., *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)) HVR-definisjoner basert på variabeldomenerester som hyppig kontakter antigener. Slik ble posisjonene 49G og 94M i tungkjeden inkludert i HVR-transplantatet Fig504 (fig. 1B). I tillegg ble en annen HVR-transplantat, Fib504K-transplantat, også generert som inkluderte posisjonen 29K på lettkjeden, fordi denne posisjonen også ligger innenfor kontakt-definisjonen i HVR-L2 og kan virke som en antigenkontakt (fig. 1A). Når en hvilken som helst av Fib504- eller Fib504K-transplantatene ble oppvist på bakteriofag og testet for binding til immobilisert alfa4beta7 ble ingen binding observert.

Biblioteker ble generert ved å benytte både Fib504- og Fib504-K-HVR-transplantatene der hver av HVR-regionene ble mykt randomisert samtidig. Hvert HVR-

transplantatbibliotek ble panert mot immobilisert alfa4beta7 i fire runder med seleksjon. Ingen anrikning ble observert og kloner som ble plukket for DNA-sekvensanalyse oppviste kun tilfeldige sekvensendringer rettet mot de seks HVR-regionene.

To ytterligere VH-rammeverksekvenser, "RL" og "RF" ble undersøkt som akseptorrammeverk og inneholdt endringene på posisjon 71 og 78. Posisjon 71 ble endret til et arginin som i den humane undergruppe-III-konsensusen, og posisjon 78 ble endret til et leucin som i den humane undergruppe-III-konsensusen (akseptorrammeverk "RL") eller et fenylalanin som i den humane undergruppe II-konsensusen og rotte-Fib504-VH-rammeverket (akseptorrammeverk "RF") (fig. 10A). Når en hvilken som helst av Fib504- eller Fib504K-transplantatet på "RL" (Fib504-RL og Fib504K-RL) eller "RF" (Fib504-RF og Fib504K-RF)-akseptorrammeverk ble oppvist på bakteriofag og testet for binding til mobilisert alfa4beta7. Spesifikk bakteriofagbinding ble kun observert for Fib504K-transplantatet ved å benytte "RF"-rammeverket (fig. 10B). Den moderate bindingen av bakteriofag som oppviser Fib504-RF-transplantatet i forhold til andre transplantater som mangler i Y49K (lettkjede) og L78F (tungkjede) viser viktigheten til disse posisjonene i å velge et nyttig akseptorrammeverk.

Biblioteket ble generert som før ved å benytte en myk randomiseringsstrategi samtidig på hver av de seks HVR'ene for Fib504K-RL og Fib504K-RF-transplantatene og sortert på immobilisert alfa4beta7 i fire runder med seleksjon som beskrevet ovenfor. Anrikning ble kun observert for biblioteker basert på Fib504K-RF-transplantatet. Kloner fra runde fire i Fib504K-RF-biblioteket ble valgt til sekvensanalyse og avslørte aminosyreendringer rettet mot HVR-L1. De løste kloner inneholdt endringen Y32L, i tillegg var posisjon 31 hyppig endret til D, S, P eller N (fig. 1C). I tillegg til utgangstransplantatet, Fib504K-RF, så ble tre kloner uttrykt og rensset som Fab-protein og ytterligere analysert ved hjelp av Biacore som beskrevet ovenfor. Klonene hu504-5, hu504-16 og hu504-32 (varianter av SEKV. ID nr. 1 inneholdende substitusjonene T31S pluss Y32L (variant hu504.5), Y32L (variant hu504.16) eller T31D pluss Y32L (variant hu504.32), se fig. 1C) viste uovertruffen binding til alfa4beta7 i forhold til Fib504K-RF-transplantatet og imøtekom eller overskred affiniteten til den kimære Fib504-Fab for binding til alfa4beta7. Resultatene av Biacore-analysen er vist i tabell 3 nedenfor og indikerer at valgt variasjon i HVR'ene og/eller rammeverksregionene, som er tilkjenngjort her, genererte antagonististoffer mot alfa4beta7 som hadde forbedret affinitet i forhold til utgangsantistoffet. Resultatene i tabell 3 indikerer at humanisert variant 504.32 viste den største økningen i affinitet i forhold til utgangsrotteantistoffet ved å binde tre ganger tettere til alfa4beta7.

Tabell 3

Fab (BIAcore™-analyse)	Affinitet mot alfa4beta7 (nM)
Fib504	11
Variant 504.5	9

Variant 504.16	23
Variant 504.32	3

Resultatene i tabell 3 indikerer også at redesigningen av HVR-L1 var viktig for gjenopprettelsen av høyaffinitetsantigenbinding. Spesielt var mutasjonen Y32L mest hyppig blant de ulike klonene. Andre endringer på posisjon 31 og utallige andre substitusjoner i HVR-H1 ser ut til å være godt tolererte og kan tilveiebringe ytterligere forbedring. Ut fra disse resultatene er det klart at det foreligger flere sekvensendringer som kan forbedre affiniteten til Fib504 som er transplantert på et humant rammeverk for å generere affiniteter som imøtegår eller overskrider affiniteten til det opprinnelige rotteantistoffet.

Ved å starte fra transplanteringen av de seks rotte Fib504-HVR'ene inn i det humane akseptorrammeverket ble utvidelsen av HVR-L2 for å inkludere posisjon 49 (lysin), utvidelsen av HVR-H2 for å inkludere posisjon 49 (glysin) og utvidelsen av HVR-94 for å inkludere posisjon 94 (metionin) i tillegg til aminosyreendringer på posisjon 32 i VHR-L1 (der L eller I erstatter Y) og eventuelt på posisjon 31 i VHR-L1 (der T blir erstattet med D eller S, f.eks.) utført. Nyttige rammeverksaminosyreendringer ble gjort på posisjonene 71 (A71R) og 78 (L78F) på VH-omenet. Slike aminosyreendringer fører til et fullt humant antistoff, variant hu504.32 f.eks., med tre ganger forbedret bindingsaffinitet for alfa4beta7-integrinet. Videre har valgte humaniserte antistoffer som er beskrevet her blitt bestemt å ha minst sammenlignbar biologisk aktivitet med opphavs-rotte-Fib504-antistoffet (se eksempel 3 her).

Eksempel 2: Ytterligere, humaniserte Fib504-HVR-varianter

HVR-aminosyresekvensene til humanisert variant Fib504.32 ble ytterligere modifisert for å generere ytterligere varianter som var i stand til å antagonisere aktiviteten til beta7-integrinsubenheten og/eller integriner som inneholder beta7-subenheten.

Fremstilling av et bredt aminosyreskanningsbibliotek - Et bibliotek for å skanne valgte HVR-posisjoner for andre aminosyrerester som er i stand til å generere beta7-binding varianter av variant hu504.32 ble generert ved å benytte tre oligonukleotider: 504-L1, designet for å mykt randomisere en del av HVR-L1 med en helning mot hu504.32-HVR-L1-sekvensen (dvs. sekvensen ASESVDLLH (SEKV. ID nr. 47, for relative posisjoner A2-A11) ble mykt randomisert som beskrevet ovenfor) og HVR-L3 504-N96 og HVR-H3 504-M94 som introduserer NNS på posisjoner HVR-L3 posisjon 96 på lett kjeden og HVR-H3 posisjon 94 på tungkjeden, for slik å tillate alle 20 aminosyrer på disse posisjonene. Med disse tre oligonukleotidene ble det brede aminosyreskanningsbiblioteket generert som beskrevet ovenfor ved å benytte et templat inneholdende tre stoppkodon på lett kjeden (posisjonene 31 og 32 i HVR-L1 og posisjon 96 i HVR-L3) og et stoppkodon på tungkjeden (posisjon 94 i HVR-H3).

Bred aminosyreskanning av hu504-32 - For mer inngående å utforske de foretrukne sekvensene som er tillatt i HVR-L1 og for å forsterke stabiliteten til 504-32 designet i et bakteriofagbibliotek som a) mykt randomiserte HVR-L1 i 504-32 på regionen der endringer ble observert (dvs. ASESVDDLLH (SEKV. ID nr. 47, for relative posisjoner A2-
 5 A11) i løpet av humanisering (fig. 1C) og b) tillot alle mulige aminosyrer på N96 i HVR-L3 og M94 i HVR-H3. Etter fire runder med seleksjon mot immobilisert, humant fullendeintegrin alfa4beta7 som beskrevet ovenfor ble 96 tilfeldige kloner valgt til sekvensanalyse. Hyppigheten ved hvilken aminosyrene ble funnet på hver posisjon i det brede aminosyreskanningsbiblioteket tyder på at HVR-L1-sekvensen som foreligger i hu504-32 og
 10 metioninet på posisjon 94 på tungkjeden er optimalt for høyaffinitetsbinding (fig. 12). De mest foretrukne aminosyrene fremskaffet ved seleksjonene ved å starte fra variant 504.32 (fig. 12) er vist i gult. Selv om asparagin foreligger på posisjon 96 i lettkjeden i hu504-32 tyder i motsetning til dette den høye hyppigheten av leucin observert på denne posisjonen i den brede aminosyreskanningen på at mutasjonen N96L ytterligere kunne forbedre
 15 affiniteten til humanisert Fib504-varianter for alfa4beta7 og også eliminere alle mulige deamidierungsproblemer på denne posisjonen. Informasjonen i fig. 12 tyder også på at et antall erstatningsaminoasyrer sannsynligvis vil bli tolerert på de fleste posisjoner uten vesentlig tap i affinitet. For å eliminere oksidering av M94 på HVR-H3 kan f.eks. glutamin eller arginin sannsynligvis bli substituert.

20 *Fremstilling av de begrensede aminosyreskanningsbibliotekene* - Seks biblioteker for en begrenset aminosyreskanning benyttet seks ulike Kunkel-templater, der hvert inneholdt et stoppkodon lokalisert innenfor én av de seks HVR'ene. Hvert bibliotek ble generert ved å benytte et enkelt oligonukleotid som koder for én enkelt HVR og ved å benytte de kodonene som er fremlagt i fig. 11A ("kodon"-kolonne) for å endre aminosyrerester for påfølgende
 25 testing av binding til beta7 eller alfa4beta7. Den samme prosedyren som ble benyttet for å endre aminosyrerester for anti-beta7-antistoffer og teste dem for binding til alfaEbeta7-integrinet.

Begrenset aminosyreskanning av hu504-32 - Den begrensede aminosyreskanningen av hu504-16 ble designet for å gjøre hu504-16 enda mer lik den
 30 humane lettkjede- og tungkjedekonsensussekvensen og i prosessen identifisere de minimale sekvensenelementene for rotte-Fib504 som er nødvendig for binding. Seks biblioteker ble generert og målsøkt på hver HVR på posisjoner som var forskjellige mellom hu504-16 og de humane konsensus-kappa-I-lettkjede eller undergruppe-II-tungkjedene (fig. 1A og 1B), enten rotteaminoasyrer eller den humane aminosyren ble tillatt på disse posisjonene i
 35 biblioteket (fig. 11A). For å tilpasse koding for begge aminosyrer i løpet av oligonukleotidsyntesen og mutagenesen ble ytterligere aminosyrer også introdusert i noen tilfeller (se kodede aminosyrer, fig. 11A). De begrensede aminosyreskanningsbibliotekene ble selektert mot immobilisert, humant fullendeintegrin alfa4beta7 som beskrevet ovenfor

og omtrent 32 tilfeldige kloner ble sekvensert for hvert bibliotek etter runde 3. Hyppigheten av hver aminosyre som ble funnet på hver posisjon er vist i fig. 11B og 11C.

Slik som for den brede aminosyreskanningen kan den begrensede aminosyreskanningen også tilveiebringe informasjon omkring hvilke endringer som er tolerert på mange posisjoner i humanisert Fib504. Ulikt den brede aminosyreskanningen var likevel diversiteten som er tillatt på hver posisjon som er randomisert i den begrensede aminosyreskanningen begrenset til noen få aminosyrer. Mangelen på enhver observert substitusjon på en gitt posisjon indikerer slik ikke at en spesiell rest ikke kan bli endret og heller ikke indikerer den høye hyppigheten av enhver spesiell aminosyre på en gitt posisjon at den er den beste løsningen for høy affinitet.

På noen posisjoner (posisjonene 27, 29, 30, 53, 54 i lettkjeden og 50, 54, 58, 60, 61 og 65 på tungkjeden) blir den humane konsensusaminosyren valgt ganske hyppig, noe som tyder på at en tilbakemutasjon til den humane konsensusen ikke dramatisk ville endre binding til human alfa4beta7. På posisjon 54 av lettkjeden (i HVR-L2) ble faktisk den humane konsensusaminosyren valgt hyppigere enn aminosyren fra rotte-Fib, noe som tyder på at denne endringen som er innført i 504-32 tilveiebringer et nyttig beta7-bindingsantistoff.

Som et resultat av bibliotekutformingen blir ytterligere aminosyrer som ikke er avledet fra verken den humane konsensusen eller rotte-Fib504 valgt hyppigere på noen posisjoner og tilveiebringer potensielle substitusjoner for å forbedre affiniteten til humaniserte Fib504-varianter. Disse inkluderer uten begrensning D30A og I55V på lettkjeden og Y50F på tungkjeden. Resultatene fra disse to bibliotekene tyder på at mange HVR-posisjoner tolererer andre aminosyresubstitusjoner og de opprettholder fremdeles sammenlignbar biologisk aktivitet.

Oppsummeringer av observerte aminosyreendringer er vist i fig. 13 og 15. Fig. 15 oppsummerer de ulike aminosyrene som nyttige på hver av posisjonene i CDR'ene på antistoffvarianten ifølge oppfinnelsen på posisjoner nummerert ifølge Kabat-nummerering eller et relativt nummereringssystem. Hvert av de ytterligere antistoffene som er omfattet av variantene som er avbildet i fig. 13 og 15 er en utførelsesform av oppfinnelsen.

Eksempel 3: Celleadhesjonsanalyser

Evnen til noen av de humaniserte Fib504-variantene ifølge oppfinnelsen til å binde ligander som er uttrykt på en celleoverflate ble testet ved hjelp av celleadhesjonsanalyse. Binding til alfa4beta7 og et annet beta7-integrin, alfaEbeta7, ble testet ved evnen for de humaniserte variantene til å ødelegge binding av integrinet til sin naturlige reseptor. Binding av de humaniserte Fib504-varianter til alfa4beta7-subenhet alene uttrykt på en celleoverflate ble tilsvarende testet. Prosedyrene og resultatene er beskrevet nedenfor.

IgG-produksjon - Humaniserte Fib504-IgG-varianter ble uttrykt transient i 293-celler (Graham et al. (1977) ovenfor) ved å benytte en separat vektor for lettkjeden og

tungkjeden. Vektorene ble konstruert ved å subklone lettkjede- og tungkjededomenene inn i passende ekspresjonsvektorer for hver av lettkjeden og tungkjeden. Supernatant fra 1.1 L CHO-cellekultur for en humanisert Fib504-variant ble filtrert gjennom et filter på 0,45 µm og påsatt en ny 1 ml HiTrap-protein-A-HP-kolonne (Amersham/Pharmacia) balansert i buffer-A (10 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl). Prøver ble påsatt ved 0,8 ml/min. over natt, 4°C. Hver kolonne ble deretter vasket og balansert med 30 ml buffer-A. Eluering av antistoff ble utført ved hjelp av kromatografi ved romtemperatur på en FPLC (Amersham/Pharmacia) ved å benytte en lineær gradient ved 14 min. ved 1 ml/min. fra 0-100 % buffer-B (100 mM glysin, pH 3,0). Resulterende fraksjoner på 1 ml ble straks nøytralisert ved tilsetningen av 75 µl 1 M Tris, pH 8. Eluert protein ble påvist ved absorpsjon ved 280 nm, og toppfraksjonene ble slått sammen og avsaltet i PBS på PD10-G-25-sefadekskolonner (Amersham/Pharmacia). Protein ble påvist ved hjelp av OD280 og toppfraksjonene slått sammen. Antistoffet i PBS ble filtrert gjennom 0,22 µm og lagret ved 4°C. Aminosyreanalyser ble benyttet for å kvantifisere konsentrasjonene av disse rensede antistoffene, og verdier ble tilordnet fra gjennomsnittet av to separate bestemmelser.

BCECF-merking:

I hver av analysene som er vist i eksempel 3 ble celler merket i overenstemmelse med den følgende prosedyren. Alle celler som ble benyttet i adhesjonsanalysene ble merket med 2', 7'-bis-(2-karboksyletyl)-5-(og-6)-karboksylfluorescein, acetoksymetylester (BCECF) ved 10 µM i RPMI1640-medium inneholdende 10 % FBS for RPMI8866-celler og 38C13-celler transfektert med beta7-subenhet (38C13-beta7-celler) og i F-12:DMEM-blanding (50:50) inneholdende 10 % FBS for alfaEbeta7-transfekteerte 293-celler (alfaEbeta7-293-celler). Celler ble merket i 30 min. og vasket to ganger med analysemedium. Celletetthet ble justert til 3×10^6 celler/ml for RPMI8866- og 38C13beta7-celler og $2,2 \times 10^6$ celler/ml for alfaEbeta7-293-celler.

Humaniserte Fib504-varianter ødelegger alfa4beta7-binding til MAdCAM

RPMI8866/MAdCAM-1-Ig-celleadhesjon: RPMI8866-celler uttrykker alfa4beta7 på sin overflate (Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, NY). Humaniserte Fib504-varianter (hu504-varianter) ble kontaktet med en blanding av RPMI8866-celler og MAdCAM fusjonert til IgG belagt på en fast bærer. Konsentrasjoner av humanisert Fib504-variant som fører til 50 % inhibering (IC_{50}) av bindingen av RPMI8866-celler til MAdCAM ble målt ved å belegge Nunc Maxisorp™ 96-brønners plater med 2 µg/ml i PBS, 100 µl/brønn MAdCAM-1-Ig (Genentech, Inc., der Ig refererer til fusjon av MAdCAM-1 til en Fc-region) over natt ved 4°C. Etter å ha blokkert platene med 200 µl/brønn med 5 mg/ml BSA i 1 time ved romtemperatur ble 50 µl humaniserte Fib504-varianter i analysemedium (RPMI1640-medium, Hyclone®, Logan Utah, USA, tilsatt 5 mg/ml BSA) tilsatt til hver brønn og 15000 BCECF-merkede celler (BCECF, Molecular Probes, Eugene, OR) i 50 µl analysemedium ble

tilsatt til hver brønn og inkubert i 15 min. ved 37°C. Brønnene ble vasket to ganger med 150 µl analysemedium for å fjerne ubundne celler. De bundne cellene ble løseliggjort med 100 µl 0,1 % FBS i 50 mM Tris/HCl, pH 7,5. Mengden av fluorescens som ble frigjort fra lyserte celler ble målt ved hjelp av SPECTRAMax GEMINI™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) ved 485 nm eksitasjons-530 nm emisjonsbølgelengder. Fluorescensverdiene ble analysert som en funksjon av konsentrasjonene for de humaniserte Fib504-variantene som er tilsatt i hver analyse ved å benytte en fire-parameters, ikke-lineær minste kvadrats tilpasning for å oppnå IC₅₀-verdiene for hver humaniserte Fib504-variant i analysen. IC₅₀- og IC₉₀-verdier ble beregnet fra fire-parameterstilpasningen. Fig. 14 er et eksempelmessig plott av resultatene. IC₉₀- og IC₅₀-verdiene for hver av variantene som ble testet er vist nedenfor i tabell 4.

Tabell 4

Antistoffbinding til human MAdCAM-1

Antistoff testet: Fib504- og hu504-varianter	IC ₅₀ (nM) Eksp. 1/eksp. 2*	IC ₉₀ (nM) Eksp. 1/eksp. 2*
Rotte-Fib504	0,098/0,197	0,483/0,703
Variant hu504.5	0,067/0,248	0,361/0,880
Variant hu504.16	0,0768/0,206	0,244/0,551
Variant hu504.32	0,036/0,119	0,150/0,396
6B11 (ikke-blokkerende kontroll)	>100	>100

*Eksp. 1/eksp. 2 refererer til resultatene i gjentatte analyser.

Humanisert Fib504-variant ødelegger alfa4beta7-binding til VCAM

RPMI8866/7dVCAM-1-celleadhesjon: RPMI8866/7dVCAM-1-analysen er lignende i format med RPMI8866/MAdCAM-1-Ig bortsett fra at 7dVCAM-1 (ADP5, R&D Systems, Minneapolis, MN) ble benyttet ved 2 µg/ml for å belegge plater. Resultatene ble analysert som beskrevet ovenfor for MadCAM-bindingeksperimentene. IC₅₀-verdiene for hver av variantene som ble testet er vist nedenfor i tabell 5.

Tabell 5

Antistoffbinding til human VCAM

Antistoff testet: Fib504- og hu504-varianter	IC ₅₀ (nM) Eksp. 1/eksp. 2*	IC ₉₀ (nM) Eksp. 1/eksp. 2*
Rotte-Fib504	0,107/0,193	0,396/0,580
Variant hu504.5	0,088/0,270	0,396/0,726
Variant hu504.16	0,098/0,223	0,261/0,774
Variant hu504.32	0,059/0,110	0,183/0,337

6B11 (ikke-blokkerende kontroll)	>100	>100
----------------------------------	------	------

*Eksp. 1/eksp. 2 refererer til resultatene i gjentatte analyser.

Humanisert Fib504-variant ødelegger alfaEbeta7-binding til humant E-kadherin

AlfaEbeta7-293/huE-kadherincelleadhesion: 293-celler (Graham et al. (1977)

5 ovenfor) ble transfektert med alfaE og beta7 (Genentech, Inc.). Analyseformatet er lignende RPMI8866/MAdCAM-1-Ig-analysen bortsett fra at huE-kadherin (648-EC, R&D Systems, Minneapolis, MN) ble benyttet ved 2 µg/ml for å belegge platene. Plater ble deretter blokkert med 5 mg/ml BSA som nevnt ovenfor og 50 µl Fib504-varianter i analysemedium (F-12:DMEM (50:50) tilsatt 5 mg/ml BSA) ble tilsatt til hver brønn og 110000 BCECF-merkede
10 celler i 50 µl analysemedium tilsatt til hver brønn og inkubert i 15 min. ved 37°C. Brønnene ble vasket to ganger med 150 µl analysemedium og mengden av fluorescens som ble frigjort av de lyserte cellene ble målt og analysert som beskrevet ovenfor. Analyseresultatene fra tre eksperimenter er vist i tabell 6.

15 Tabell 6

Antistoffbinding til humant E-kadherin

Antistoff testet: Fib504- og hu504-varianter	IC ₅₀ (nM)	IC ₉₀ (nM)
Rotte-Fib504	2,047/89/4,19	8,80/24,5/9,95
Variant hu504.5	2,132/10,18/4,77	7,99/28,7/10,19
Variant hu504.16	1,957/10,05/4,58	7,03/33,7/13,51
Variant hu504.32	1,814/6,99/3,47	8,8/24,5/11,73
HP2/1 (anti-alfa4, kontroll)	>100/>100/>100	>100/>100/>100

Humanisert Fin504-variant ødelegger beta7-binding til MAdCAM

20 38C13beta7/muMAdCAM-1-Ig-celleadhesjonsanalyse: 38C13beta7/muMAdCAM-1-Ig-analysen var lignende i format med RPMI8866/MAdCAM-1-Ig bortsett fra at muMAdCAM-1-Ig (Genentech, Inc.) ble benyttet ved 2 µg/ml for å belegge plater. 38C13-alfa4+ murine lymfoceller (Crowe, D.T. et al., J. Biol. Chem. 269:14411-14418 (1994) ble transfektert med DNA som koder for integrin beta7 slik at alfa4beta7 ble uttrykt på celleoverflaten.
25 Evnen for antistoffvariantene til å ødelegge interaksjon mellom cellemembranassosiert alfa4beta7 og MAdCAM ble utført som ovenfor. Analyseresultatene er vist i tabell 7. Analyseresultater er vist i tabell 7. (IC₅₀- og IC₉₀-verdier for 2 eksperimenter er vist).

Tabell 7

30 Aktivitet for hu504-variantantistoffer i 38C13-beta7-uttrykkende celler

Binding til murint MAdCAM

Antistoff testet: Fib504- og hu504-varianter	IC ₅₀ (nM)	IC ₉₀ (nM)
Rotte-Fib504	0,682/0,306	2,869/1,51
Variant hu504.5	0,8587/0,466	2,322/2,61
Variant hu504.16	0,998/0,610	3,717/4,08
Variant hu504.32	0,718/0,458	4,08/1,51

5 Humanisert Fib504-variant ødelegger beta7-binding til murin VCAM

38C13beta7/muVCAM-1-Ig-celleadhesjonsanalyse: 38C13beta7/muVCAM-1-Ig-analysen utført i overenstemmelse med den murine MAdCAM-1-Ig/RPMI8866-cellebindingsanalysen ovenfor, bortsett fra at muVCAM-1-Ig (Genentech, Inc.) ble benyttet ved 2 µg/ml for å belegge plater. Resultater av analysen er vist i tabell 8. (IC₅₀- og IC₉₀-verdier for 2 eksperimenter er vist).

Tabell 8

Aktivitet for hu504-variantantistoffer i 38C13-beta7-uttrykkende celler

Binding til muring VCAM-1-Ig

Antistoff testet: Fib504- og hu504-varianter	IC ₅₀ (nM)	IC ₉₀ (nM)
Rotte-Fib504	0,845/0,447	2,903/2,30
Variant hu504.5	0,763/0,407	3,074/2,30
Variant hu504.16	0,835/0,584	2,857/1,84
Variant hu504.32	0,562/0,330	2,004/1,84

15

Resultatene av bindingsundersøkelsene for humanisert Fib504-variant viste at det humaniserte antistoffet ifølge oppfinnelsen binder sitt mål, beta7-integrinsubenhet, i tillegg til alfa4beta7- og alfaEbeta7-integrin med omtrent affiniteten til utgangsrotteantistoffet, og i noen tilfeller med høyere affinitet. Slik har et humanisert anti-beta7-antistoff ifølge oppfinnelsen anvendelser i anti-beta7-integrinoterapier, spesielt humane terapier.

20

Relativ aktivitet for hu504.32-varianter ifølge oppfinnelsen

Ulike aminosyrevarianter av hu504.32-antistoffet ble testet i humane celleadhesjonsanalyser og musecelleadhesjonsanalyser for deres evne til å inhibere beta7-inneholdende reseptorbinding til sin ligand i overenstemmelse med celleadhesjonsanalysefremgangsmåten som er tilkjennegjort her. RPMI8866/MAdCAM-1-Fc-analysen ble utført som beskrevet her ovenfor. AlfaEbeta7-293/hu-E-kadherinanalysen ble modifisert ved

25

anvendelsen av humant E-kadherin-Fc som liganden (humant E-kadherin-Fc, 648-EC, R&D Systems, Minneapolis, MN). Den relative evnen for hu504.32-varianten i å inhibere interaksjon av humant fibronektin (huFN40) med human alfa4beta7-reseptor på RPMI8866-celler ble også undersøkt. RPMI8866/hu-fibronektin (huFN40)-analysen som ble benyttet i disse undersøkelsene var lignende i format med RPMI8866/MAdCAM-1-Ig-analysen som er tilkjennegjort her bortsett fra at humant fibronektin-alfa-chymotryptisk fragment 40 kDa (F1903, Chemicon Internationa. Temecula, CA) ble benyttet ved 2 µg/ml for å belegge plater.

Evnen for hu504.32-variantene i å inhibere interaksjon for murine beta7-inneholdende reseptorer med murint MAdCAM-1 eller murint VCAM-1 ble undersøkt. Muring MAdCAM-1-Fc og murint VCAM-1-Fc ble inhibert fra å interagere med murine lymfom-alfa4+-celler som uttrykker murine beta7 (38C13beta7-celler) ved hu504.32-variantene. De murine MAdCAM-1-Fc- og VCAM-1-Fc-celleadhesjonsanalysene ble utført lignende med de som er beskrevet her ovenfor for human MAdCAM og VCAM. Der ligandene var fusjonert til Fc-regioner ble Fc-reseptorene på cellene blokkert med 0,5 µg anti-CD16/32-antistoff (anti-Fcγ-III/II-reseptorantistoff, katalog nr. 553142, BD Biosciences, San Jose, CA) pr. 1 million celler i 5 min. ved romtemperatur. 150000 mekede celler i 50 µl analysemedium ble tilsatt til hver brønn og inkubert i 13 min. ved 37°C. Cellene ble vasket og mengden av fluorescens ble frigjort fra lyserte celler ble målt som tilkjennegjort her ovenfor. Kontrollantistoffet for de humane celleadhesjonsanalysene var det monoklonale museantistoffet mot human serumalbumin, 6B11 (katalog nr. ab10244, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA). Kontrollantistoffet for de murine celleadhesjonsanalysene var rotte-anti-museintegrin-beta7-antistoffet M293 (BD Biosciences, San Jose, CA), som ikke konkurrerer med ligand eller med Fib504 for binding til integrin-beta7.

Resultatene av triplikatanalyser for de humane og de murine celleadhesjonsanalysene er tilveiebrakt i tabellene 9 og 10.

Tabell 9

Aktivitet for hu504.32-variantantistoffer i humane celleadhesjonsanalyser

Antistoffvariant	IC ₅₀ Ave ± SD			
	RPMI8866/ huMAdCAM-1-Fc	RPMI866/ hu7dVCAM-1	αEβ7-293/ huE-kadherin-Fc	RPMI8866/ huFN40
hu504.32	0,088 ± 0,035	0,101 ± 0,021	3,970 ± 1,664	0,100 ± 0,046
hu504.32 M94Q	0,090 ± 0,045	0,111 ± 0,035	4,130 ± 1,212	0,124 ± 0,056
hu504.32M94R	0,075 ± 0,034	0,089 ± 0,009	3,963 ± 1,776	0,119 ± 0,056
Kontroll (6B11)	>100	>100	>100	>100

Tabell 10

Aktivitet for hu504.32-variantantistoffer i murine celleadhesjonsanalyser

Antistoffvariant	IC ₅₀ Ave \pm SD	
	38C13beta7/muMAdCAM-1-Fc	38C13beta7/mu7dVCAM-1-Fc
hu504.32	0,270 \pm 0,041	0,228 \pm 0,065
hu504.32M94Q	0,370 \pm 0,102	0,264 \pm 0,083
hu504.32M94R	0,391 \pm 0,112	0,228 \pm 0,081
Kontroll (M293)	>100	>100

hu504.32-antistoffet har et metionin på posisjon 94 på tungkjede-CDR3. Variantene M94Q (eller hu504.32Q) og M94R eller hu504.32R) har henholdsvis glutamin og arginin på posisjon 94 i hu504.32-antistoffvarianten. hu504.32M-, Q- og R-antistoffene reduserte vesentlig integrin-beta7-reseptorligandinteraksjon i hver av analysene og er slik sterke inhibitorer av beta7-mediert celleadhesjon.

10 hu504.32R-antistoffaktivitet in vivo

hu504.32R-antistoffvarianten ble testet in vivo for dens evne til å redusere integrin-beta7-reseptorligandinteraksjon og redusere lymfocyttrekruttering til inflammet kolon i en murin in vivo-inflammatorisk tarmsykdomsmodell. BALB/c-mus og CB17-SCID-mus ble fremskaffet fra Charles River Laboratories International, Inc. (Wilmington, MA, USA). CD4⁺CD45Rb-high-T-cellerekonstituerte SCID-kolittmus ble klargjort ved å isolere CD4⁺CD45Rb-high-T-celler fra BALB/c-donormus og overfører 3 x 10⁵ celler til 100 μ l PBS intravenøst. SCID-kontrollmus mottok ikke CD4⁺CD45Rb-high-T-celler. Rekonstituerte CD4⁺-mus som oppfylte behandlingsgruppeinrullingskriteriene med 10 % vekttap fra baselinje eller 15 % fra toppvekt ved uke 4 ble ansett å ha fått induert inflammatorisk tarmsykdom og ble valgt for behandling.

På dagen med behandling med testantistoffer ble mesenteriske lymfeknyteceller (MLN) fra BALB/c-donormus høstet og radiomerket med Cr⁵¹. Behandling involverte tidligere administrering av anti-GP120-antistoff, hu504.32-anti-beta7-antistoff, hu504.32R-anti-beta7-antistoff eller ikke noe antistoff (kontroll) intravenøst, 200 μ g/100 μ l PBS. 30 min. etter antistoffadministrering ble Cr⁵¹-merkede MLM-celler injisert, 4 x 10⁶ celler/100 μ l. 1 time etter injeksjon av merkede celler ble mus avlivet og milt, kolon og peyers plakk samlet inn, veid og total Cr⁵¹-radioaktivitet pr. organ ble bestemt. Fig. 16 er stolpediagram og resultatene fra disse testene som viser den relative evnen til antistoffene i å blokkere målretting av de radiomerkede T-cellene til kolon i mus som opplever inflammatorisk tarmsykdom. Styring av T-celler til inflammet kolon ble inhibert ved hu504.32- og hu504.32R-anti-beta7-antistoffer i forhold til negativ kontroll, anti-GP120-antistoff. Fordeling til milt var lignende for alle antistoffene. hu504.32 og hu504.32R-anti-beta7-antistoffene inhiberer slik effektivt styring av T-celler til inflammet kolon in vivo.

Antistoffglykosylering påvirker ikke evnen for hu504.32R-varianten i å blokkere MAdCAM-1-binding til alfa4beta7-reseptor.

Glysering, som er den ikke-enzymatiske glykosyleringen av proteiner, kan ramme antistoff-ligandinteraksjonen (se f.eks. Kennedy, D. M. et al., Clin Exp Immunol. 98(2):245-51 (1994)). Glysering av lysin på posisjon 49 i 504.32R. Glysering på lysinet på lett-kjedeposisjon 49 i hu504.32R-varianten (HVR-L2 med relativ posisjon B1) ble observert men hadde ingen vesentlig effekt på evnen til antistoffvarianten i å blokkere binding av MAdCAM-1 til alfa4beta7-reseptoruttrykkende RPMI8866-celler. Bestemmelse av glysering og glyseringsnivåer ble utført ved å benytte standard elektrospayionisering- massespektroskopi (ESI-MS) og boronataffinitetskromatografi. Boronataffinitets-HPLC-fremgangsmåter som er nyttig for å teste glysering blir f.eks. funnet i Quan C.P. et al., Analytical Chemistry 71(20):4445-4454 (1999) og Li Y.C. et al., J. Chromatography A, 909:137-145 (2001). Celleadhesjonsanalysen blir utført i overenstemmelse med RPMI8866/MAdCAM-1-Fc-celleadhesjonsanalysen som er tilkjenngjort her.

I alternative utførelsesformer av oppfinnelsen blir glysering på posisjon 49 redusert eller eliminert der posisjon 49 omfatter en aminosyre som er forskjellig fra lysin. Polypeptidet eller antistoffet ifølge oppfinnelsen omfatter som en aminosyre på posisjon 49 (HVR-L2 relativ posisjon B1) enhver av aminosyrene A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W eller Y, der hver bokstav refererer til en aminosyre ifølge standard énbokstavs aminosyrebetegnelsen. Alternativt er aminosyren på posisjon 49 og lett-kjeden til en 504.32R-variant (eller annen 504-variant) valgt fra gruppen som består av R, N, V, A, F, Q, H, P, I eller L. En aminosyre som er nyttig på posisjon 49 er f.eks. valgt ved å oppvise (frembringe et bakteriofagbibliotek av) hu504.32R-Fab på bakteriofag (variant) og substituere separat, på kodonet for posisjon 49, et kodon for hver av de 20 naturlig forekommende aminosyrene. Bakteriofag som uttrykker 504.32R-variantene som er endret på posisjon 49 blir testet for binding til integrin-beta7 og/eller en reseptor som omfatter integrin-beta7, slik som alfa4beta7- eller alfaEbeta7-reseptorer. De variantene som binder beta7-integrin eller alfa4beta7- eller alfaEbeta7-reseptorene blir ytterligere screenet for evnen til å inhibere integrin-beta7-reseptor-ligandbinding og in vivo-effektivitet som beskrevet her. Alternativt kan naturlige eller ikke-naturlig forekommende aminosyrer bli substituert på posisjon 49 ved hjelp av standard mutageneseteknikker og testet i celleadhesjons- og in vivo-analysene som er beskrevet her. Alternativt er aminosyren på posisjon 49 i lett-kjeden en aminosyre som er forskjellig fra lysin (K), og aminosyrer på enhver annen HVR- eller rammeverksposisjon eller posisjoner på lett-kjeden og/eller tungkjeden blir endret for å velge et variant-anti-beta7-bindingspolypeptid eller antistoff som oppviser bindingsaffinitet, in vitro og in vivo biologisk aktivitet, farmakokinetikk, legemiddeluttømming og immunogenisitet nyttig for reduksjon av inflammasjon ved å redusere den biologiske aktiviteten til integrin-beta7. Mutagenese og seleksjon av et slikt polypeptid eller antistoffvariant blir utført som tilkjenngjort her og ifølge andre

standardteknikker. Et slikt variant-anti-beta7-bindingspolypeptid eller -antistoff oppviser integrin-beta7-bindingsaffinitet innenfor 10000 ganger, 1000 ganger, alternativt innenfor 100 ganger, alternativt innenfor 10 ganger, alternativt innenfor 5 ganger, alternativt innenfor 2 ganger av bindingsaffiniteten som er oppvist av enhver av de humaniserte
5 Fib504-variantene som er tilkjenngjort her.

Den foregående skrevne beskrivelsen er ansett for å være tilstrekkelig for å muliggjøre en fagperson på området å utøve oppfinnelsen.

P a t e n t k r a v

1. En isolert nukleinsyre som koder for et humanisert anti-beta7 antistoff som
5 omfatter:
en HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, hvor hver, i rekkefølge omfatter
RASESVDDLLH (SEKV. ID Nr.: 9), KYASQSIG (SEKV. ID Nr.: 2), QQGNSLPNT (SEKV. ID Nr.:
3), GFFITNNYWG (SEKV. ID Nr.: 4), GYISYSGSTSYNPSLKS (SEKV. ID Nr.: 5), og
ARTGSSGYFDF (SEKV. ID Nr.: 64).
- 10
2. En isolert nukleinsyre som koder for et humanisert anti-beta7 antistoff som
omfatter:
en HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, hvor hver, i rekkefølge omfatter
RASESVDDLLH (SEKV. ID Nr.: 9), KYASQSIG (SEKV. ID Nr.: 2), QQGNSLPNT (SEKV. ID Nr.:
15 3), GFFITNNYWG (SEKV. ID Nr.: 4), GYISYSGSTSYNPSLKS (SEKV. ID Nr.: 5), og
MTGSSGYFDF (SEKV. ID Nr.: 6).
3. En isolert nukleinsyre som koder for et humanisert anti-beta7 antistoff som
omfatter:
20 en HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, hvor hver, i rekkefølge omfatter
RASESVDDLLH (SEKV. ID Nr.: 9), KYASQSIG (SEKV. ID Nr.: 2), QQGNSLPNT (SEKV. ID Nr.:
3), GFFITNNYWG (SEKV. ID Nr.: 4), GYISYSGSTSYNPSLKS (SEKV. ID Nr.: 5), og
AMTGSSGYFDF (SEKV. ID Nr.: 63).
- 25
4. En isolert nukleinsyre som koder for et humanisert anti-beta7 antistoff som
omfatter:
en HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, hvor hver, i rekkefølge omfatter
RASESVDDLLH (SEKV. ID Nr.: 9), KYASQSIG (SEKV. ID Nr.: 2), QQGNSLPNT (SEKV. ID Nr.:
3), GFFITNNYWG (SEKV. ID Nr.: 4), GYISYSGSTSYNPSLKS (SEKV. ID Nr.: 5), og
30 RTGSSGYFDF (SEKV. ID Nr.: 66).
5. En isolert nukleinsyre som koder for et humanisert anti-beta7 antistoff som
omfatter:
en HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, hvor hver, i rekkefølge omfatter
35 RASESVDSLH (SEKV. ID Nr.: 7), SEKV. ID Nr.: 2, SEKV. ID Nr.: 3, SEKV. ID Nr.: 4, SEKV.
ID Nr.: 5, og SEKV. ID Nr.: 64.
6. En isolert nukleinsyre som koder for et humanisert anti-beta7 antistoff som
omfatter:

en HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 og HVR-H3, hvor hver, i rekkefølge omfatter RASESVDSLH (SEKV. ID Nr.: 7), SEKV. ID Nr.: 2, SEKV. ID Nr.: 3, SEKV. ID Nr.: 4, SEKV. ID Nr.: 5 og SEKV. ID Nr.: 6.

5 7. En isolert nukleinsyre som koder for et humanisert anti-beta7 antistoff som omfatter:

en HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, og HVR-H3, hvor hver, i rekkefølge omfatter RASESVDTLLH (SEKV. ID Nr.: 8), SEKV. ID Nr.: 2, SEKV. ID Nr.: 3, SEKV. ID Nr.: 4, SEKV. ID Nr.: 5, og SEKV. ID Nr.: 64.

10

8. En isolert nukleinsyre som koder for et humanisert anti-beta7 antistoff som omfatter:

en HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, og HVR-H3, hvor hver, i rekkefølge omfatter RASESVDTLLH (SEKV. ID Nr.: 8), SEKV. ID Nr.: 2, SEKV. ID Nr.: 3, SEKV. ID Nr.: 4, SEKV.

15 ID Nr.: 5, og SEKV. ID Nr.: 6.

9. En vektor som omfatter nukleinsyren ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 8.

10. En vertscelle som omfatter vektoren ifølge krav 9.

20

11. Vertscellen ifølge krav 10, hvor vertscellen er en prokaryotisk celle.

12. Vertscellen ifølge krav 11, hvor vertscellen is E. coli.

25 13. Vertscellen ifølge krav 10, hvor vertscellen er en eukaryotisk celle.

14. Vertscellen ifølge krav 13, hvor vertscellen er en pattedyr celle.

15. Vertscellen ifølge krav 14, hvor vertscellen er en kinesisk hamster ovariecelle.

30

16. En fremgangsmåte for fremstilling av et humanisert anti-beta7 antistoff, nevnte fremgangsmåte omfatter å utrykke i en vertscelle ifølge et hvilket som helst av kravene 10 til 15 en rekombinant vektor ifølge krav 9, og gjenvinne nevnte antistoff.

Sequence Listing

<110> GENENTECH, INC.

5 <120> HUMANIZED ANTI-BETA7 ANTAGONISTS AND USES THEREFOR

<130> SMN/FP6974992

<140>

10 <141> 2005-09-02

<140> EP10177407.3

<141> 2005-09-02

<150> EP05810856.4

15 <151> 2005-09-02

<150> PCT/US2005/031401

<151> 2005-09-02

<150> US 60/607,377

20 <151> 2004-09-03

<160> 68

<210> 1

25 <211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

30 <400> 1

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr Leu His

5 10

<210> 2

35 <211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sequence is synthesized

40 <400> 2

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser

5

<210> 3

45 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

50 <223> sequence is synthesized

<400> 3

Gln Gln Gly Asn Ser Leu Pro Asn Thr

5

55 <210> 4

<211> 10

<212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

5 <400> 4
 Gly Phe Phe Ile Thr Asn Asn Tyr Trp Gly
 5 10

10 <210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

15 <220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 5
 Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 1 5 10 15

20 Lys Ser

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

25 <220>
 <223> sequence is synthesized

30 <400> 6
 Met Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Phe
 5 10

35 <210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

40 <220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 7
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Leu Leu His
 5 10

45 <210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

50 <220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 8
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Leu Leu His
 5 10

55 <210> 9
 <211> 11

	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Ile	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys			
					65					70					75			
5	Asn	Gln	Phe	Phe	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Thr	Glu	Asp	Thr			
					80					85					90			
	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Met	Thr	Gly	Ser	Ser	Gly	Tyr	Phe	Asp			
					95					100					105			
10	Phe	Trp	Gly	Pro	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
					110					115								
	<210> 12																	
	<211> 174																	
	<212> PRT																	
15	<213> Artificial sequence																	
	<220>																	
	<223> sequence is synthesized																	
20	<400> 12																	
	Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Val	Thr	Pro			
	1				5					10					15			
	Gly	Glu	Arg	Ile	Ser	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp			
25					20					25					30			
	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asn	Glu	Ser	Pro	Arg			
					35					40					45			
	Leu	Leu	Ile	Lys	Tyr	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser			
30					50					55					60			
	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile			
					65					70					75			
35	Asn	Gly	Val	Glu	Leu	Glu	Asp	Leu	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln			
					80					85					90			
	Gly	Asn	Ser	Leu	Pro	Asn	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu			
					95					100					105			
40	Leu	Lys	Arg	Ala	Asp	Ala	Ala	Pro	Thr	Val	Ser	Ile	Phe	Pro	Pro			
					110					115					120			
	Ser	Met	Glu	Gln	Leu	Thr	Ser	Gly	Gly	Ala	Thr	Val	Val	Cys	Phe			
					125					130					135			
45	Val	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Asp	Ile	Ser	Val	Lys	Trp	Lys	Ile			
					140					145					150			
	Asp	Gly	Ser	Glu	Gln	Arg	Asp	Gly	Val	Leu	Asp	Ser	Val	Thr	Asp			
50					155					160					165			
	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser									
					170													
	<210> 13																	
	<211> 146																	
55	<212> PRT																	
	<213> Artificial sequence																	

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 13

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

 Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Phe Phe Ile Thr
 20 25 30

10 Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Met
 35 40 45

 Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn
 50 55 60

15 Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys
 65 70 75

 Asn Gln Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr
 80 85 90

20 Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Met Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp
 95 100 105

 Phe Trp Gly Pro Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Glu Thr
 110 115 120

25 Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Thr Ala Leu Lys
 125 130 135

 Ser Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val
 140 145

<210> 14
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

35

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 14

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

 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 20 25 30

45 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 35 40 45

 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 50 55 60

50 Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
 65 70 75

 Lys Val Glu Ile Lys
 80

55

<210> 15
<211> 79

<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

5

<400> 15
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

10

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
35 40 45

15

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
50 55 60

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys
65 70 75

20

Val Glu Ile Lys

<210> 16
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

25

<220>
<223> sequence is synthesized

30

<400> 16
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro
1 5 10 15

35

Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
20 25 30

Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
35 40 45

40

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val
50 55 60

Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75

45

Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 17
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

50

<220>
<223> sequence is synthesized

55

<400> 17
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
1 5 10 15

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 20 25 30

5 Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 35 40 45

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu
 50 55 60

10 Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
 65 70 75

Lys Val Glu Ile Lys
 80

15 <210> 18
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

20 <220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 18
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
 1 5 10 15

25 Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 20 25 30

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 35 40 45

30 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 50 55 60

35 Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
 65 70 75

Lys Val Glu Ile Lys
 80

40 <210> 19
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

45 <220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 19
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 1 5 10 15

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

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

55 Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 50 55 60

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 65 70 75

Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 5 80 85

<210> 20
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

10
 <220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 20
 15 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30

20 Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
 35 40 45

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
 50 55 60

25 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
 65 70 75

Leu Val Thr Val Ser Ser
 30 80

<210> 21
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

35
 <220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 21
 40 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30

45 Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
 35 40 45

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
 50 55 60

50 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 65 70 75

Val Thr Val Ser Ser
 80

55
 <210> 22
 <211> 79

<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

5

<400> 22

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

10

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
35 40 45

15

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75

20

Thr Val Ser Ser

<210> 23
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial sequence

25

<220>
<223> sequence is synthesized

30

<400> 23

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

35

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

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

40

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

45

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

50

Ile Lys Arg

<210> 24
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial sequence

55

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 24

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

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

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

 Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
 50 55 60

15 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 65 70 75

 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

20 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 95 100 105

 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110

<210> 25
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 25

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

 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp
 20 25 30

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

 Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90

50 Gly Asn Ser Leu Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

 Ile Lys Arg

<210> 26
<211> 117

<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

5

<400> 26

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

10

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

Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

15

Glu Trp Val Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn
50 55 60

Pro Ser Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
65 70 75

20

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
80 85 90

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Met Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp
95 100 105

25

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 27
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

35

<400> 27

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

40

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

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

45

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

50

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

55

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
110 115 120

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 125 130 135

5 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 140 145 150

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 155 160 165

10 Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 170 175 180

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 185 190 195

15 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 200 205 210

Arg Gly Glu Cys

20 <210> 28
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

25 <220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 28

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

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

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

Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
 50 55 60

40 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

45 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Met Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe
 95 100 105

Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 110 115 120

50 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 125 130 135

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 140 145 150

55 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 155 160 165

	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	170	175	180
5	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	185	190	195
	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	200	205	210
10	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	215	220	225
	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	230	235	240
15	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	245	250	255
	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	260	265	270
20	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	275	280	285
	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	290	295	300
25	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	305	310	315
	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	320	325	330
30	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	335	340	345
	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	350	355	360
35	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	365	370	375
	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	380	385	390
40	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	395	400	405
	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	410	415	420
45	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	425	430	435
50	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	440	445			
55	<210>	29	<211>	214	<212>	PRT	<213>	Artificial sequence										

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 29

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

45 <210> 30
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial sequence

50 <220>
<223> sequence is synthesized

<400> 30

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
55 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Phe Ile Thr
20 25 30

	Asn	Asn	Tyr	Trp	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	
					35					40					45	
5	Glu	Trp	Val	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Ser	Tyr	Asn	
					50					55					60	
	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	
					65					70					75	
10	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	
					80					85					90	
	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Met	Thr	Gly	Ser	Ser	Gly	Tyr	Phe	Asp	
					95					100					105	
15	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	
					110					115					120	
	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	
					125					130					135	
20	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	
					140					145					150	
	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
					155					160					165	
25	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	
					170					175					180	
	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	
30					185					190					195	
	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	
					200					205					210	
35	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	
					215					220					225	
	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	
					230					235					240	
40	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
					245					250					255	
	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	
					260					265					270	
45	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
					275					280					285	
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
					290					295					300	
50	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	
					305					310					315	
	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	
					320					325					330	
55	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	
					335					340					345	

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 350 355 360

5 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 365 370 375

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 380 385 390

10 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 395 400 405

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 410 415 420

15 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 425 430 435

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 440 445

20 <210> 31
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

25 <220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 31

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp
 20 25 30

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

Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90

45 Gly Asn Ser Leu Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 110 115 120

50 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 125 130 135

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 140 145 150

55 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 155 160 165

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 170 175 180
 Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 5 185 190 195
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 200 205 210
 Arg Gly Glu Cys
 10
 <210> 32
 <211> 447
 <212> PRT
 15 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> sequence is synthesized
 <400> 32
 20 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Phe Ile Thr
 20 25 30
 Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn
 50 55 60
 Pro Ser Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys
 65 70 75
 Asn Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 80 85 90
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Met Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp
 95 100 105
 Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 110 115 120
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 125 130 135
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 140 145 150
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 155 160 165
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 170 175 180
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 185 190 195
 55 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 200 205 210

	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	
					215					220					225	
5	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	
					230					235					240	
	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
					245					250					255	
10	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	
					260					265					270	
	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
					275					280					285	
15	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
					290					295					300	
	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	
					305					310					315	
20	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	
					320					325					330	
	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	
					335					340					345	
25	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	
					350					355					360	
	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	
					365					370					375	
30	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	
					380					385					390	
	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
					395					400					405	
35	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	
					410					415					420	
	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	
					425					430					435	
40	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
					440					445						
45	<210>	33														
	<211>	214														
	<212>	PRT														
	<213>	Artificial sequence														
	<220>															
50	<223>	sequence is synthesized														
	<400>	33														
	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	
	1				5					10					15	
55	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	
					20					25					30	

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

35 Arg Gly Glu Cys

<210> 34
 <211> 23
 <212> PRT
 40 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

45 <400> 34
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

50 <210> 35
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

55 <220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 35
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 5 10

5

<210> 36
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

10

<400> 36
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 1 5 10 15

15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 20 25 30

Tyr Cys

20

<210> 37
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

25

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 37
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 5 10

30

<210> 38
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

35

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 38
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15

40

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

45

<210> 39
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sequence is synthesized

50

<400> 39
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 5 10

55

<210> 40
 <211> 31

<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 40
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 41
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 41
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 42
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 42
Arg Phe Thr Ile Ser Xaa Asp Xaa Ser Lys Asn Thr Xaa Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 43
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 43
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 44
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

5

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 44
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 1 5 10 15
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

15

Ala

<210> 45
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

20

<220>
 <223> sequence is synthesized

25

<400> 45
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Phe Tyr Leu
 1 5 10 15
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

30

Ala

<210> 46
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

35

<220>
 <223> sequence is synthesized

40

<400> 46
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Phe Tyr Leu
 1 5 10 15
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

45

Ala

50

<210> 47
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

55

<220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 47
Ala Ser Glu Ser Val Asp Asp Leu Leu His
5 10

5 <210> 48
<211> 87
<212> PRT
<213> Artificial sequence

10 <220>
<223> sequence is synthesized

<400> 48
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15
15 Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
20 25 30
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg
35 40 45
20 Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
50 55 60
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
25 65 70 75
Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

30 <210> 49
<211> 81
<212> PRT
<213> Artificial sequence

35 <220>
<223> sequence is synthesized

<400> 49
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15
40 Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
35 40 45
45 Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
50 55 60
Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75
50 Leu Val Thr Val Ser Ser
80

55 <210> 50
<211> 80
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 50

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

20 <210> 51
<211> 79
<212> PRT
<213> Artificial sequence

25 <220>
<223> sequence is synthesized

<400> 51

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

45 <210> 52
<211> 87
<212> PRT
<213> Artificial sequence

50 <220>
<223> sequence is synthesized

<400> 52

55 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg
 35 40 45
 5 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 50 55 60
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 65 70 75
 10 Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 80 85
 <210> 53
 <211> 81
 <212> PRT
 15 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> sequence is synthesized
 <400> 53
 20 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30
 25 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 35 40 45
 Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 50 55 60
 30 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
 65 70 75
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 80
 35 <210> 54
 <211> 80
 <212> PRT
 40 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> sequence is synthesized
 <400> 54
 45 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30
 50 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 35 40 45
 Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 50 55 60
 55 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 65 70 75

Val Thr Val Ser Ser
80

5 <210> 55
<211> 79
<212> PRT
<213> Artificial sequence

10 <220>
<223> sequence is synthesized

<400> 55
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
15 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
35 40 45
20 Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60
25 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75
Thr Val Ser Ser

30 <210> 56
<211> 87
<212> PRT
<213> Artificial sequence

35 <220>
<223> sequence is synthesized

<400> 56
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
40 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg
35 40 45
45 Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
50 55 60
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
65 70 75
50 Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

55 <210> 57
<211> 81
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 57

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

 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30

10 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
 35 40 45

 Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 50 55 60

15 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gln Gly Thr
 65 70 75

 Leu Val Thr Val Ser Ser
 80

20 <210> 58
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

25 <220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 58

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

 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30

35 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
 35 40 45

 Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 50 55 60

40 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 65 70 75

 Val Thr Val Ser Ser
 80

45 <210> 59
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

50 <220>
 <223> sequence is synthesized

<400> 59

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

 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
 20 25 30

Val Thr Val Ser Ser
80

5 <210> 62
<211> 79
<212> PRT
<213> Artificial sequence

10 <220>
<223> sequence is synthesized

<400> 62
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

15 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45

20 Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75

25 Thr Val Ser Ser

30 <210> 63
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sequence is synthesized

35 <400> 63
Ala Met Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Phe
5 10

40 <210> 64
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

45 <220>
<223> sequence is synthesized

<400> 64
Ala Arg Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Phe
5 10

50 <210> 65
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

55 <220>
<223> sequence is synthesized

<400> 65
Ala Gln Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Phe
5 10

5
<210> 66
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

10
<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 66
Arg Thr Gly Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Phe
5 10

15
<210> 67
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial sequence

20
<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 67
Arg Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
5

25
<210> 68
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial sequence

30
<220>
<223> sequence is synthesized

<400> 68
Xaa Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
5

35
40
31

Kabat # 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35

huKI D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S N Y L A W

Fib504 D V V M T Q S P A T L S V T P G E R I S L S C R A S E S V D T Y L L E W

504K graft D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R R V T I T C R A S E S V D T Y L L E W

hu504-5 S L

hu504-16 L

hu504-32 D L

HVR1

R A S Q S I S N Y L A W
 R A S E S V D T Y L L E W
 R A S E S V D T Y L L E W

Kabat # 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75

HVR2

huKI Y Q Q K P G K A P K L L L I I Y A A S S L E S G V P S R R F S G S G S G T D F T L T I

Fib504 Y Q Q K P N E S P R L L L I I K Y A S Q S I S G I P S R R F S G S G S G T D F T L E I

504K graft Y Q Q K P G K A P K L L L I I K Y A S Q S I S G V P S R R F S G S G S G T D F T L T I

Kabat # 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 a 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108

HVR3

huKI S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S L P W T F G Q G T K V E I K R (SEQ ID NO.: 23)

Fib504 N G V E L E D L S I Y Y C Q Q G N S L P N T F G A G T K L E K R (SEQ ID NO.: 10)

504K graft S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q G N S L P N T F G G Q G T K V E I K R (SEQ ID NO.: 25)

FIG. 1A

Kabat # 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42

hum III E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R Q A P G
 Fib504 E V Q L Q E S G P G L V K P S Q S L S L T C S V T G F I T N N Y W G W I R R K F P G
 504K graft E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F I T N N Y W G W V R Q A P G

HVR1

Kabat # 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 a 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 a

hum III K G L E W V S V I S G D G G S T Y Y A D S S V K G R F T I S R R D N S K N T L Y L Q M N
 Fib504 N K M E W M G Y I S Y S G S T S Y N P S L K S R R I S I R D T S K N Q F F L Q L N
 504K graft K G L E W V G Y I S Y S G S T S Y N P S L K S R R I S I R D T S K N T A Y L Q M N
 hu504-5
 hu504-16 R R R
 hu504-32

HVR2

Kabat # b c 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 a k 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113

hum III S L R A E D T A V Y Y C A R G F D Y W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO.: 24)
 Fib504 S V T T E D T A T Y Y C A M T G S S G Y F D F W G P G T M V T V S S (SEQ ID NO.: 11)
 504K graft S L R A E D T A V Y Y C A M T G S S G Y F D F W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO.: 26)

HVR3

FIG. 1B

Humaniserte varianter av Fib504

HVR-L1- og L2-substitueringer Fib504 K RF rammeverk		BIAcore Affinitets- analyse (nM)	
504K-RF Residues	L1 R A S E S V D T Y L H	L2 K Y A S Q S I S	11
<u>Variant</u>			
68	R A S E S V D D T L L H	K Y A S S Q S I S	3.5
74	R A S E S V D D L L V L L H	K Y A S S Q S I S	
504-32	R A S E S V D D L L L L L H	K Y A S S Q S I S	
51	R A S E S V D D N L L L L H	K Y A S S Q S I S	
59	R A S E S V D D P L L L L H	K Y A S S Q S I S	
504-5	R A S E S V D D S L L L L H	K Y A S S Q S I S	9
60	R S S S S V D S L L V L L H	K Y A S S Q S I S	
96	R A S E S V D D T L L L L H	K Y A S S Q S I S	
83	R A S E S V D D T L L L L H	K Y A S S Q S I S	
504-16 (8)	R A S E S V D D T L L L L H	K Y A S S Q S I S	23.4
504-RF (29)	R A S E S V D D T L L L L H	K Y A S S Q S I S	132

FIG. 1C

Human Consensus**Light Chain (kappa I)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLES
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCOYNSLPWTFGQGTKVEIKRTVA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNRFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 27)

FIG. 2A**Human Consensus****Heavy Chain (subgroup III)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVISGDGG
 STYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCMTGSSGYFDFWGQGT
 LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKT
 HTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO: 28)

FIG. 2B**Fib504 Graft****Light Chain**

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASESVDTYLHWYQQKPGKAPKLLIYYASQIS
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCOQNSLPNTFGQGTKVEIKRTVA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNRFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 29)

FIG. 3A**Fib504 Graft****Heavy Chain**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFITNNYWGVRQAPGKGLEWVGYISYSGS
 TSYNPSLKSRTTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCMTGSSGYFDFWGQGT
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTH
 TCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO: 30)

FIG. 3B

Fib504K Graft**Light Chain**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTICRASESVDTYLHWYQOKPGKAPKLLIKYASQSIS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCOOGNSLENTFGOGTKVEIKRTVAA
 PSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 31)

FIG. 4A**Fib504K Graft****Heavy Chain**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFITNNYWGWVRQAPGKGLEWVGYISYSGS
TSYNPSLKSRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAMTGSSGYDFDFWGQGT
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPFVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO: 30)

FIG. 4B**Fib504K-RF Graft****Light Chain**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTICRASESVDTYLHWYQOKPGKAPKLLIKYASQSIS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCOOGNSLENTFGOGTKVEIKRTVAA
 PSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 31)

FIG. 5A**Fib504K-RF Graft****Heavy Chain**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFITNNYWGWVRQAPGKGLEWVGYISYSGS
TSYNPSLKSRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAMTGSSGYDFDFWGQGT
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPFVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO: 32)

FIG. 5B

Humanized Variant 504.32**Light Chain**

DIQMTQSPSSLSASVGRVTTITCRASESVDDLHWYQOKPGKAPKLLIKYASOSIS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCOGNSLPNTFGQGTKVEIKRTVAA
 PSVFIFFPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYSLSSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 33)

FIG. 6A**Humanized Variant 504.32****Heavy Chain**

EVQLVESGGGLVQPFGSLRLSCAASGFFITNNYWGWRQAPGKGLEWVGYISYSGS
TSYNPSLKSRTTISRDTSKNTFYLOMNSLRAEDTAVYYCMTGSSGYDFDQWQGT
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTH
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPFVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO: 32)

FIG. 6B**Rat Anti-Mouse Fib504 Variable Domains****Variable Light Chain**

DVVMTQSPATLSVTPGERISLSCRASESVDTYLHWYQOKPNESPRLLIKYASOSIS
GIPSRFSGSGSGTDFTLSSINGVELDLSIYYCOGNSLPNTFGAGTKLELKRADAA
 PTVSIFPPSMEQLTSGGATVVCVNNIFYPRDISVKWKIDGSEQRDGVLDVTDQDS
 KDSTYS (SEQ ID NO: 12)

FIG. 9A**Rat Anti-mouse Fib504 Variable Domains****Variable Heavy Chain**

EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGFFITNNYWGWRKFPGNKMEWVGYISYSGS
TSYNPSLKSRISTRDTSKNQFFLQLNSTTETDATTYYCAMTGSSGYDFDQWPGTM
 VTVSSAETTAPSVYPLAPGTALKNSMVTLGCLV (SEQ ID NO: 13)

FIG. 9B

kv1 Z DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC -L1- WYQQKPGKAPKLLIY -L2- GVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQP
 kv1 X DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC -L1- WYQQKPGKAPKLLI -L2- GVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQP
 kv2 DIVMTQSPPLSLPVTGPGEPAISIC -L1- WYLQKPGQSPQLLIY -L2- GVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEA
 kv3 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC -L1- WYQQKPGQAPRLLIY -L2- GIPDRFSGSGGTDFTLTISSLRLEP
 kv4 DIVMTQSPDLSLAVSLGERATINC -L1- WYQQKPGQPPKLLIY -L2- GVPDRFSGSGGTDFTLTISSLQA

FIG. 7A

kv1 Z EDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 14
 kv1 X EDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 15
 kv2 EDVGVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 16
 kv3 EDFAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 17
 kv4 EDVAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 18

FIG. 7B

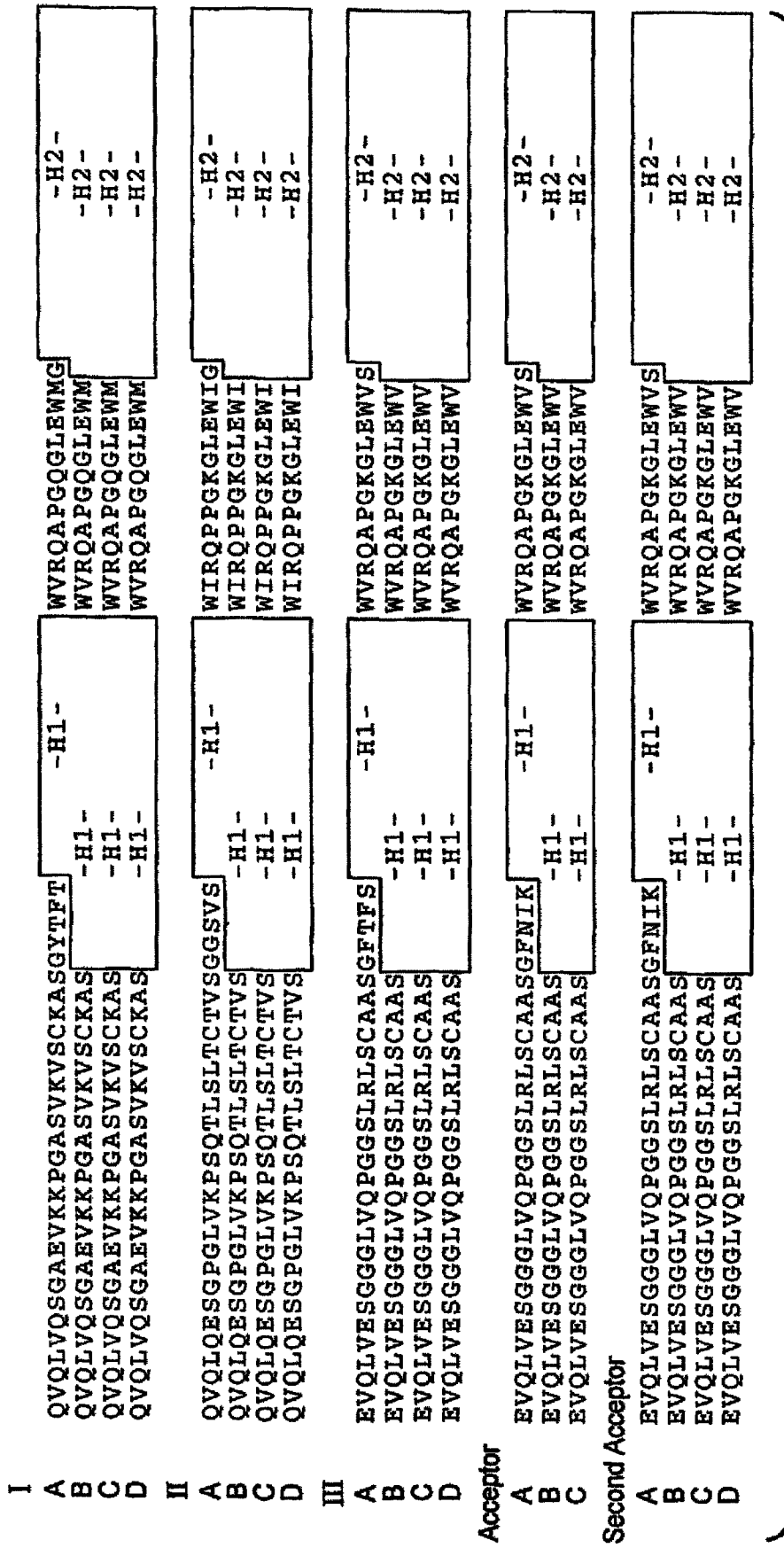


FIG. 8A

I	A	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 19
	B	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 20
	C	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 21
	D	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 22
II	A	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAD	TAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 48
	B	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAD	TAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 49
	C	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAD	TAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 50
	D	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAD	TAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 51
III	A	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 52
	B	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 53
	C	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 54
	D	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 55
Acceptor						
	A	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 56
	B	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 57
	C	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 58
Second Acceptor						
	A	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 59
	B	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 60
	C	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 61
	D	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 62

FIG. 8B

Sammenligning av VH-rammeverksekvenser

	Rammeverk region H3							
	71	72	73	74	75	76	77	78
hu undergruppe I	A	D	T	S	T	S	T	A
hu undergruppe II	V	D	T	S	K	N	Q	F
hu undergruppe III	R	D	N	S	K	N	T	L
Herceptin	A	D	T	S	K	N	T	A
Fib504	R	D	T	S	K	N	Q	F
Fib504-RL	R	D	T	S	K	N	T	L
Fib404-RF	R	D	T	S	K	N	T	F

FIG. 10A

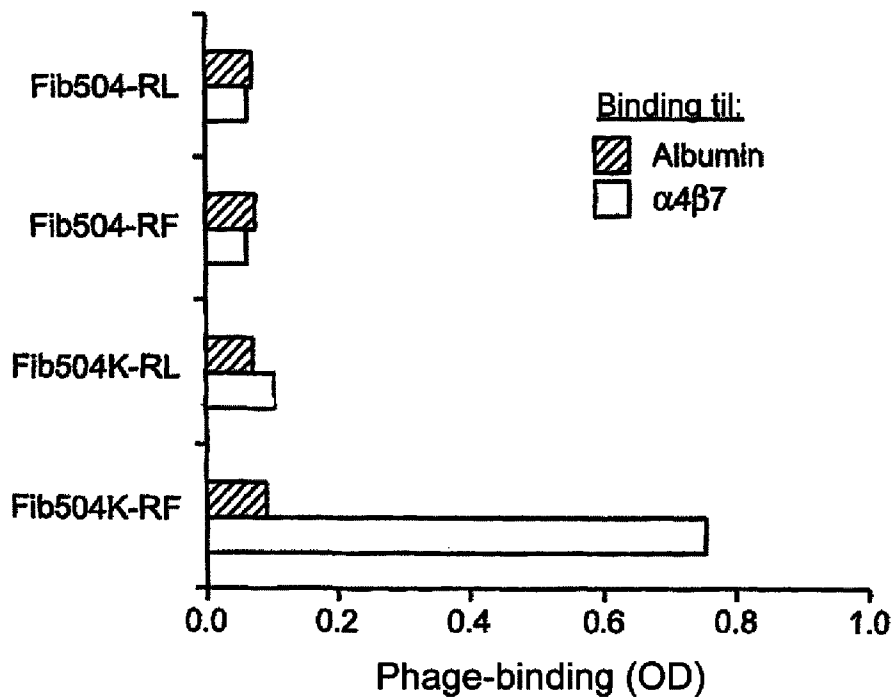
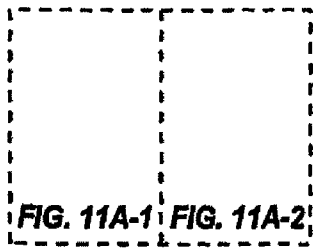


FIG. 10B

FIG. 11A

 FIG. 11A-1 FIG. 11A-2
FIG. 11A-1

504.16		Human	Codon	Aminosyrer	Aminosyrer					
		Konsensus		Kodet	Observert					
HVR-L1		R	R							
	<u>25</u>	A	A							
		S	S							
	<u>27</u>	E	Q	SAA	EQ	E	Q			
		S	S							
	<u>29</u>	V	I	RTT	VI	V	I			
		D	S	KMT	DSAY	D	S	A		
	<u>31</u>	T	N	RAC	DN	D	N			
	L	Y	YWC	LYFH	L					
<u>33</u>	L	L								
	H	A	SMC	HADP	H					
HVR-L2	<u>49</u>	K	Y	WAW	KYNZ	K	N			
		Y	A	KMC	YADS	Y				
	<u>51</u>	A	A							
		S	S							
	<u>53</u>	Q	S	YMG	QSPZ	Q	S			
		S	L	TYG	SL	S	L			
	<u>55</u>	I	E	RWA	IEKV	I	E	K	V	
	S	S								
HVR-L3	<u>89</u>	Q	Q							
		Q	Q							
	<u>91</u>	G	Y	KRT	GYDC	G				
		N	N							
	<u>93</u>	S	S							
		L	L							
	<u>95</u>	P	P							
	N	W	WRS	NWYRSZ	N	W	Y	R	S	
<u>97</u>	T	T								

NB: Z er et stopp-codon. Den hyppigst observerte aminosyren er innbokset.

504.16		Human	Codon	Aminosyrer	Aminosyrer				
		Konsensus		Kodet	Observert				
HVR-H1	<u>26</u>	G	G						
		F	F						
	<u>28</u>	F	T	WYC	FITS	F			
		I	F	WTC	IF	I			
	<u>30</u>	T	S	ASC	TS	T			
		N	S	ARC	NS	N			
	<u>32</u>	N	Y	WAC	NY	N			
		Y	A	KMT	YADS	Y			
<u>34</u>	W	M	WKG	WMRL	W				
	G	S	RGC	GS	G				
HVR-H2	<u>49</u>	G	S	RGC	GS	G			
		Y	V	KWT	YVDF	Y	V	D	F
	<u>51</u>	I	I						
		S	S						
	<u>53</u>	Y	G	KRT	YGCD	Y			
		S	G	RGC	SG	S	G		
	<u>55</u>	G	G						
		S	S						
	<u>57</u>	T	T						
		S	Y	TMT	SY	S	Y		
	<u>59</u>	Y	Y						
		N	A	RMC	NADT	N	A	D	T
	<u>61</u>	P	D	SMT	PDAH	P	D	A	H
		S	S						
<u>63</u>	L	V	STG	LV	L	V			
	K	K							
<u>65</u>	S	G	RGC	SG	S	G			
HVR-H3	<u>93</u>	A	A						
		M	R	AKG	MR	M			
	<u>95</u>	T	G	RSC	TGAS	T			
		G							
	<u>97</u>	S							
		S							
	<u>99</u>	G							
		Y							
	F	F							
<u>101</u>	D	D							
	F	Y	TWC	FY	F	Y			

FIG. 11A-2

Begrenset aminosyreskanning - lettjede-HVR

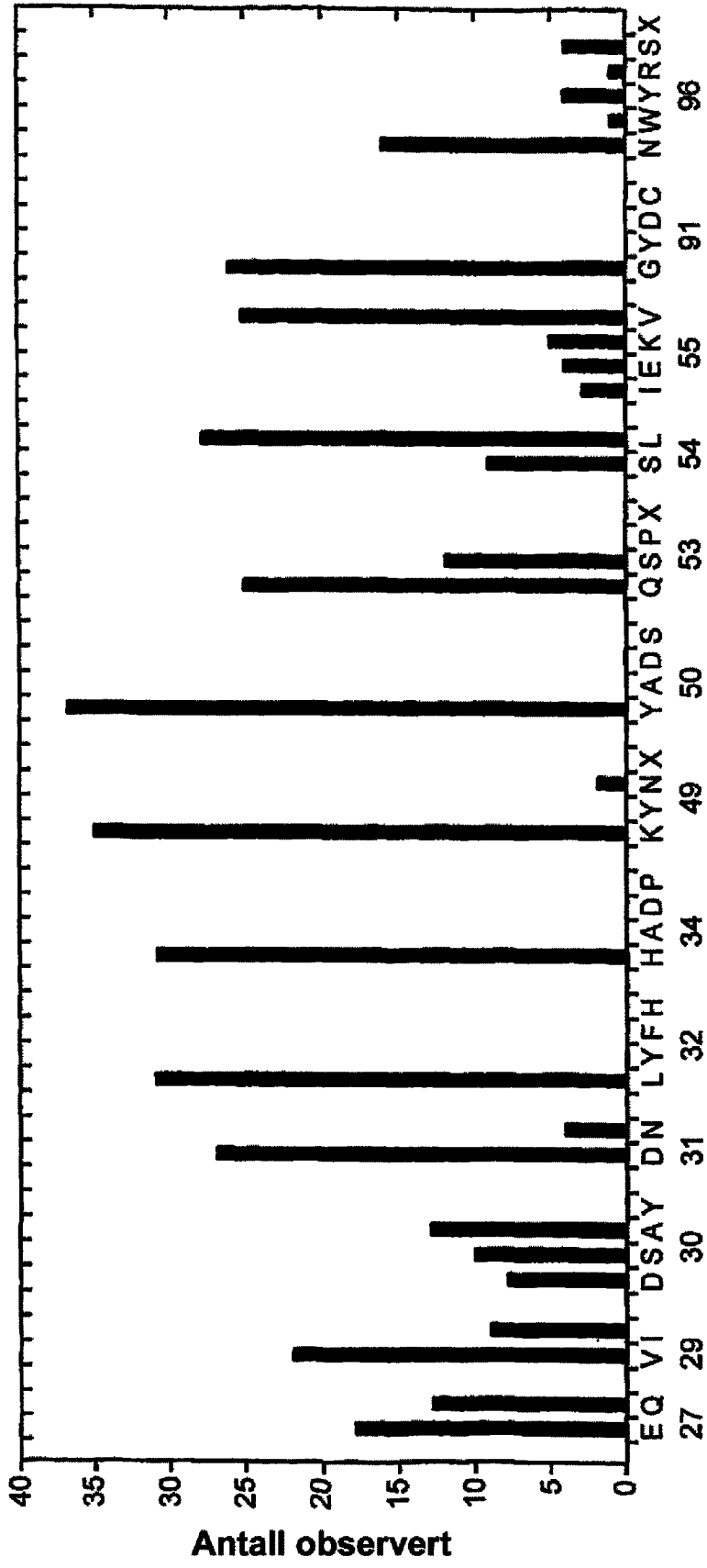


FIG. 11B

Aminosyre- stilling	Aminosyre													
	Antall ganger observert													
HVR-L1	A25	$\frac{\boxed{A}}{64}$	$\frac{G}{2}$	$\frac{S}{11}$	$\frac{I}{7}$	$\frac{Y}{9}$								
	S26	$\frac{G}{4}$	$\frac{I}{2}$	$\frac{K}{3}$	$\frac{N}{8}$	$\frac{P}{1}$	$\frac{Q}{1}$	$\frac{R}{7}$	$\frac{\boxed{S}}{61}$	$\frac{I}{6}$				
	E27	$\frac{A}{6}$	$\frac{D}{8}$	$\frac{\boxed{E}}{60}$	$\frac{G}{2}$	$\frac{H}{1}$	$\frac{I}{1}$	$\frac{K}{4}$	$\frac{L}{1}$	$\frac{N}{2}$	$\frac{Q}{5}$	$\frac{R}{1}$	$\frac{V}{2}$	
	S28	$\frac{A}{1}$	$\frac{D}{1}$	$\frac{G}{7}$	$\frac{H}{1}$	$\frac{I}{1}$	$\frac{K}{1}$	$\frac{N}{9}$	$\frac{P}{3}$	$\frac{R}{7}$	$\frac{\boxed{S}}{56}$	$\frac{T}{4}$	$\frac{V}{1}$	$\frac{Y}{1}$
	V29	$\frac{A}{11}$	$\frac{G}{6}$	$\frac{I}{3}$	$\frac{K}{1}$	$\frac{L}{9}$	$\frac{M}{6}$	$\frac{Q}{1}$	$\frac{R}{1}$	$\frac{\boxed{V}}{55}$				
	D30	$\frac{A}{3}$	$\frac{\boxed{D}}{59}$	$\frac{E}{9}$	$\frac{G}{3}$	$\frac{H}{3}$	$\frac{I}{1}$	$\frac{K}{1}$	$\frac{L}{1}$	$\frac{N}{6}$	$\frac{P}{1}$	$\frac{S}{1}$	$\frac{T}{2}$	$\frac{V}{3}$
	D31	$\frac{\boxed{D}}{77}$	$\frac{E}{13}$	$\frac{G}{2}$	$\frac{N}{1}$									
	L32	$\frac{I}{1}$	$\frac{\boxed{L}}{88}$	$\frac{M}{4}$										
	L33	$\frac{A}{1}$	$\frac{I}{5}$	$\frac{\boxed{L}}{64}$	$\frac{M}{1}$	$\frac{V}{22}$								
H34	$\frac{F}{1}$	$\frac{\boxed{H}}{87}$	$\frac{Y}{4}$	$\frac{S}{1}$										
HVR-L3	N96	$\frac{A}{2}$	$\frac{F}{6}$	$\frac{H}{1}$	$\frac{I}{3}$	$\frac{\boxed{L}}{47}$	$\frac{M}{3}$	$\frac{N}{2}$	$\frac{R}{2}$	$\frac{S}{2}$	$\frac{T}{4}$	$\frac{V}{2}$	$\frac{W}{16}$	$\frac{Y}{3}$
HVR-H3	M94	$\frac{A}{1}$	$\frac{E}{3}$	$\frac{G}{1}$	$\frac{\boxed{M}}{48}$	$\frac{Q}{10}$	$\frac{R}{24}$	$\frac{S}{8}$						

NB: Den hyppigst observerte aminosyre er innbokset.

FIG. 12

FIG. 13

FIG. 13A

FIG. 13B

FIG. 13A

	Alle observerte endringer Rat Fib504	Human konsensus	Alle observerte aminosyrer	Begrenset skanning	Aminosyrer observert bred skanning	Soft Random (endringer til 504)
CDR-L1	25	R	R		A	S
		A	S	AGSTV	G	
	27	S	S	GIKNPQRST	G I K N P Q R S T	
		E	Q	ADEGHIKLNQRV	A D E G H I K L N Q R V	D
	29	S	S	ADGHIKNPRSTVY	A D G H I K N P R S T V Y	DN
		V	I	AGIKLMQRV	A G I K L M Q R V	
CDR-L2	31	D	S	ADEGHIKLNPNSTV	A D E G H I K L N P N S T V	
		F	N	DEGN	D E G N	S P N D
	33	Y	Y	ILM	I L M	I L
		L	L	AILMV	A I L M V	V
		H	A	PHYS	P H Y S	
CDR-L3	49	K	Y	KN	K N	
		Y	A	Y	Y	
	51	A	A			
	53	S	S	QS	Q S	
CDR-L3	55	S	S	SLR	S L R	R
		I	E	EIKTV	I E K V	T
CDR-L3	89	Q	Q			
		Q	Q	G	G	
	91	G	Y			
	93	N	N			
	95	S	S			
CDR-L3	97	F	F	AFHILMNRSTVWY	A F H I L M N R S T V W Y	
		F	F		N W Y R S A F H I L M N R S T V W Y	

	Alle observerte endringer Rat Fib504	Human konsensus	Alle observerte aminosyrer	Begrenset skanning	Aminosyrer observert bred skanning
CDR-H1	<u>26</u>	G	G		
	<u>28</u>	F F	F F		
	<u>30</u>	H H	F S	F I	F I
	<u>32</u>	N N	S S	F N	N N
	<u>34</u>	K Y W M G	A Y M S	N N Y W G	N N Y W G
CDR-H2	<u>49</u>	G	S	G	G
	<u>51</u>	Y	V	DFVY	Y V D F
	<u>53</u>	H	I		
	<u>55</u>	S Y S S G G	S G G G	Y GS	Y S G
	<u>57</u>	S	S		
	<u>59</u>	S H S Y	S T Y Y	SY	S Y
	<u>61</u>	S Y N P	Y A D A	ADNT ADHP	N A D T P D A H
	<u>63</u>	S L K K	S V K K	LV	L V
	<u>65</u>	S	G	GS	S G
	CDR-H3	<u>93</u>	A	A	
<u>95</u>		M T	R G	AEGMQRS T	M T
<u>97</u>		G			
<u>99</u>		S S G Y F F	S S Y F		
#		D F	D Y	F Y	F Y

FIG. 13B

Aktivitet av Fib504-varianter i RPMI8866-celler
som binder til human MAdCAM-1-Ig

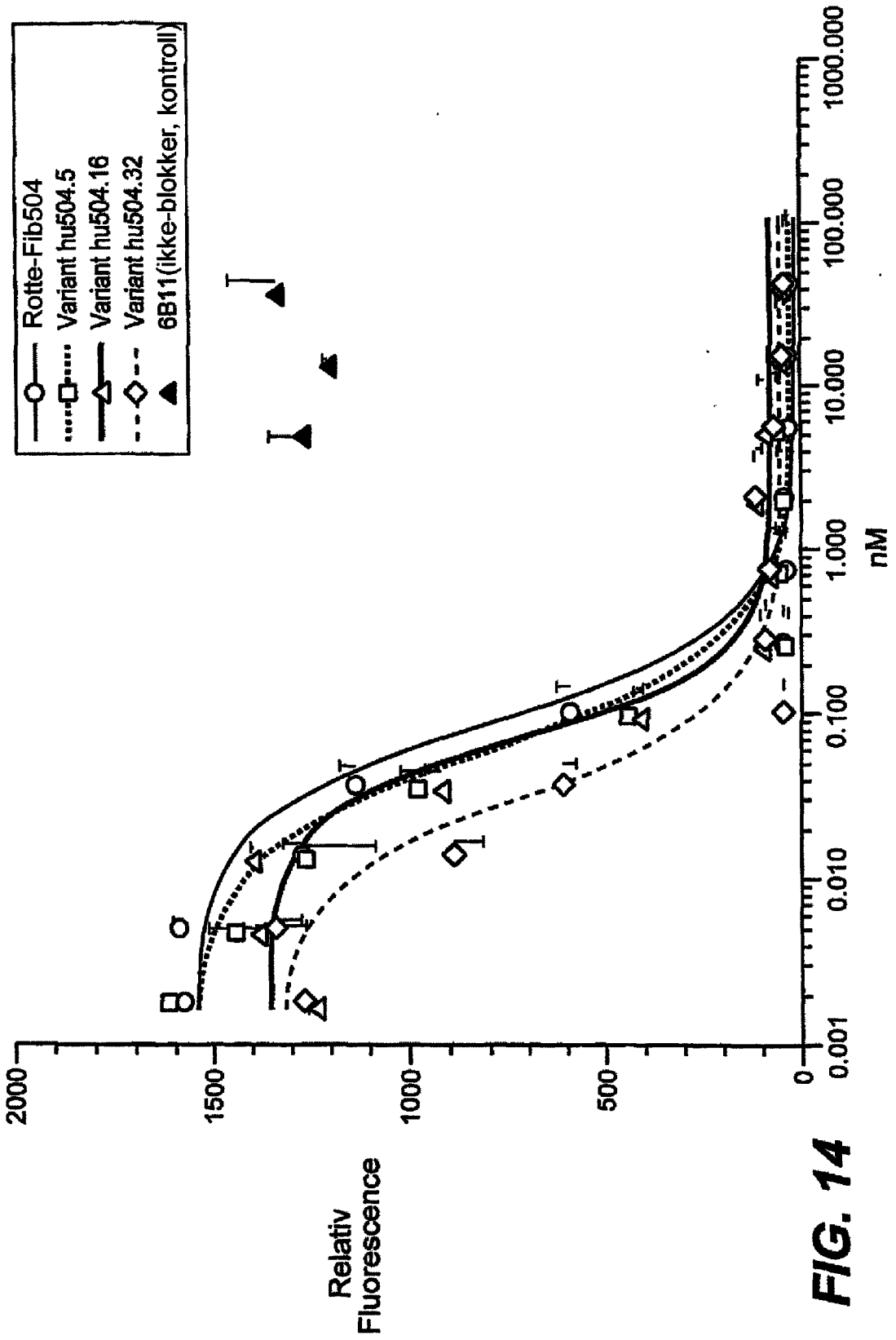


FIG. 14

FIG. 15

FIG. 15A

FIG. 15B

FIG. 15A

	Stilling	504.32R	Aminosyre-
	Kabat #	Relativ #	Aminosyre
	24	A1	R
	25	A2	A
	26	A3	S
	27	A4	E
HVR-L1	28	A5	S
	29	A6	V
	30	A7	D
	31	A8	D
	32	A9	L
	33	A10	L
	34	A11	H
	49	B1	K
	50	B2	Y
	51	B3	A
HVR-L2	52	B4	S
	53	B5	Q
	54	B6	S
	55	B7	I
	56	B8	S
	89	C1	Q
	90	C2	Q
	91	C3	G
HVR-L3	92	C4	N
	93	C5	S
	94	C6	L
	95	C7	P
	96	C8	N
	97	C9	T

Aminosyre-	substitueringer
GSTV	
G I K N P Q R T	
V Q A D G H I K L N R	
Y A D G H I K N P R T V	
R I A G K L M Q	
V S A E G H I K L N P S T	
G N E T P S	
Y I M	
A I M V	
Y F S	
Y N	
D	
S	
D L R	
V E K T	
V W Y R S T A F H I L M	

	Stilling		504.32R	Aminosyre-
	Kabat #	Relativ #	Aminosyre	substitueringer
HVR-H1	26	D1	G	
	27	D2	F	
	28	D3	F	
	29	D4	I	
	30	D5	T	
	31	D6	N	
	32	D7	N	
	33	D8	Y	
	34	D9	W	
	35	D10	G	
HVR-H2	49	E1	G	
	50	E2	Y	FVD
	51	E3	I	
	52	E4	S	
	53	E5	Y	
	54	E6	S	G
	55	E7	G	
	56	E8	S	
	57	E9	T	
	58	E10	S	Y
	59	E11	Y	
	60	E12	N	TAD
	61	E13	P	HDA
	62	E14	S	
	63	E15	L	V
	64	E16	K	
	65	E17	S	G
HVR-H3	93	F1	A	
	94	F2	R	MAEGQS
	95	F3	T	
	96	F4	G	
	97	F5	S	
	98	F6	S	
	99	F7	G	
	100	F8	Y	
	k	F9	F	
	101	F10	D	
	102	F11	F	Y
Tung- kjede- FR3	71		R	AT
	73		T	N
	78		F	AFL



FIG. 15B

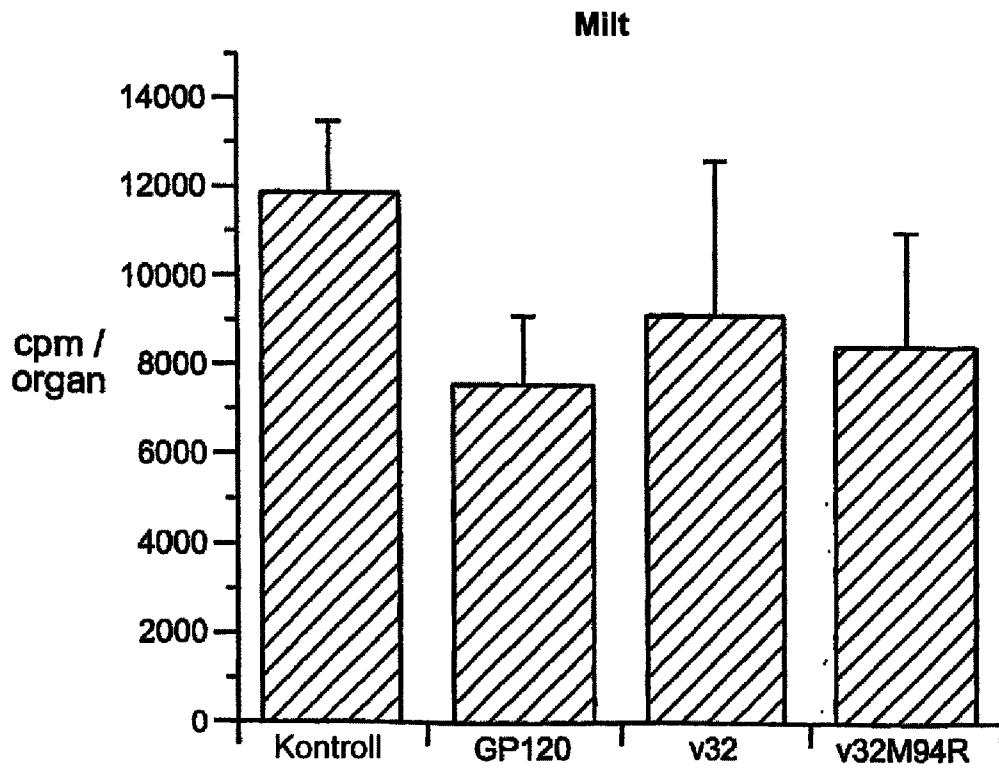
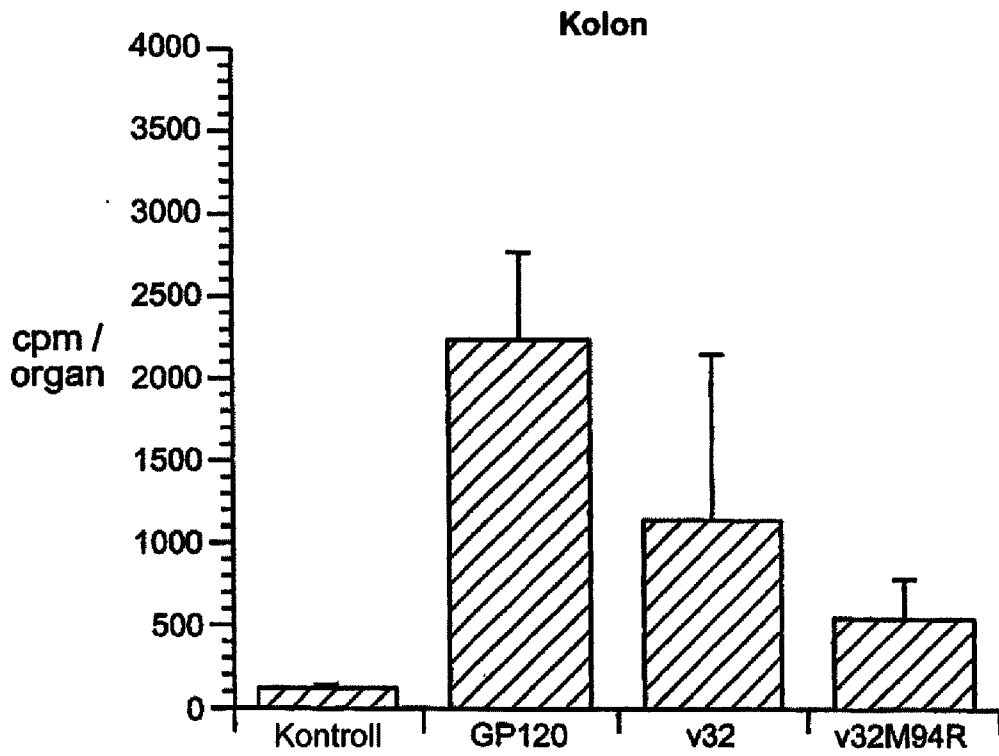


FIG. 16