(12) **SØKNAD**

(11) **20220263** (13) **A1**

(19) NO

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 16/18 (2006.01)	***A61P 35/02 (2006.01)***
C07K 16/28 (2006.01)	***A61P 37/00 (2006.01)***
C12N 9/10 (2006.01)	***A61P 37/02 (2006.01)***
C12N 15/63 (2006.01)	***A61P 37/06 (2006.01)***
C12N 5/10 (2006.01)	***A61P 19/02 (2006.01)***
A61P 35/00 (2006.01)	*A61K 39/00 (2006.01)*

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20220263	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2004.11.05 PCT/IB2004/003896
(22)	Inng.dag	2022.03.02	(85)	Videreføringsdag	2022.03.02
(24)	Løpedag	2004.11.05	(30)	Prioritet	2003.11.05, US, 60/517,096
(41)	Alm.tilgj	2006.08.03			
(62)	Avdelt fra	20171989, 2017.12.13			

(71) Innehaver: Roche GlycArt AG, Wagistrasse 18, 8952 SCHLIEREN-ZÜRICH, Sveits

(72) Oppfinner: Peter Brünker, Burgwiesenstrasse 3C, 8335 HITTNAU, Sveits
Claudia Ferrara, Hallwylstrasse 27, 8004 ZÜRICH, Sveits
Tobias Suter, Weite Gasse 13, 5400 BADEN, Sveits
Pablo Umaña, Freistrasse 159, 8032 ZÜRICH, Sveits
Ursula Püntener, Weite Gasse 13, 5400 BADEN, Sveits
Ekkehard Mössner, Zeppelinstrasse 13, 8280 KREUZLINGEN, Sveits

(74) Fullmektig: BRYN AARFLOT AS, Stortingsgata 8, 0161 OSLO, Norge

(54) Benevnelse: **Humanisert, glykoomkonstruert Type II anti-CD20 antistoff og anvendelse derav, samt vertscelle og farmasøytisk sammensetning**

(57) Sammendrag

Foreliggende oppfinnelse angår antigenbindende molekyler (ABM). Ved spesielle utførelsesformer angår foreliggende oppfinnelse rekombinante monoklonale antistoffer, innbefattende kimæriske, primatiserte eller humaniserte antistoffer som er spesifikke for humant CD20. Dessuten angår foreliggende oppfinnelse nukleinsyremolekyler som koder for slike ABM, og vektorer og vertsceller omfattende slike nukleinsyremolekyler. Oppfinnelsen angår videre fremgangsmåter for frembringelse av ABM ifølge oppfinnelsen, samt fremgangsmåter for anvendelse av disse ABM ved behandling av sykdom. Dessuten angår foreliggende oppfinnelse ABM med modifisert glykosylering med forbedrede terapeutiske egenskaper, innbefattende antistoffer med øket Fc-reseptorbinding og øket effektorfunksjon.

[0001] Foreliggende oppfinnelse angår antigenbindende molekyler (ABM). Ved spesielle utførelsesformer angår foreliggende oppfinnelse rekombinante monoklonale antistoffer, innbefattende kimæriske, primatiserte eller humaniserte antistoffer som er spesifikke for humant CD20. Foreliggende oppfinnelse angår dessuten nukleinsyremolekyler som koder for slike ABM, samt vektorer og vertsceller omfattende slike nukleinsyremolekyler. Oppfinnelsen angår videre fremgangsmåter for fremstilling av ABM ifølge oppfinnelsen, samt fremgangsmåter for anvendelse av disse ABM ved behandling av sykdom. Dessuten angår foreliggende oppfinnelse ABM med modifisert glykosylering med forbedrede terapeutiske egenskaper, innbefattende antistoffer med økt Fc-reseptorbinding og økt effektorfunksjon.

Immunsystemet og anti-CD20-antistoffer

[0002] Immunsystemet hos virveldyr, innbefattende mennesker, består av en rekke organer og celletyper, som er blitt utviklet til nøyaktig og spesifikt å gjenkjenne, binde og ødelegge inntrengende fremmende mikroorganismer ("antigener"). Lymfocytter er avgjørende for fyllestgjørende funksjon av immunsystemet. Disse celler dannes i thymus, milt og benmarg (voksne) og representerer ca. 30% av den totale mengde hvite blodlegemer som finnes i sirkulasjonssystemet hos voksne mennesker. Det er to hoved-subpopulasjoner av lymfocytter: T-celler og B-celler. T-celler er ansvarlige for cellemediert immunitet, mens B-celler er ansvarlige for antistoffdannelse (humoral immunitet). I en typisk immunrespons funksjonerer imidlertid T-celler og B-celler i gjensidig avhengighet av hverandre: T-celler aktiveres når T-cellereseptoren bindes til fragmenter av et antigen som er bundet til vevstypekompleks-("MHC")-glykoproteiner på overflaten av en antigen-presenterende celle; slik aktivering gir frigjøring av biologiske mediatorer ("interleukiner"), som stimulerer B-celler til å differensiere og danne antistoffer ("immunglobuliner") overfor antigenet.

[0003] Hver B-celle i verten uttrykker et antistoff av én spesiell type og spesifisitet, og forskjellige B-celler uttrykker antistoffer som er spesifikke for forskjellige antigener. B-celleproliferasjon og antistoffdannelse skyter fart som reaksjon på et fremmed antigen, og begge opphører typisk (eller opphører i det vesentlige) straks det fremmede antigen er blitt nøytralisert. Leilighetsvis vil

imidlertid proliferasjon av en spesiell B-celler fortsette med uforminsket styrke; slik proliferasjon kan resultere i en krefttype som omtales som "B-cellelymfom".

[0004] Både T-celler og B-celler omfatter celleoverflateproteiner som kan anvendes som "markører" for differensiering og identifisering. Én slik human B-cellemarkør er det humane B-lymfocytt-begrensede differensieringsantigen Bp35, omtalt som "CD20". CD20 uttrykkes under tidlig pre-B-celleutvikling og vedvarer inntil plasmacelledifferensiering. Spesifikt kan CD20-molekylet regulere et trinn i aktiveringsprosessen som er nødvendig for cellesyklusinitiering og -differensiering, og uttrykkes vanligvis i meget høye nivåer på neoplastiske ("tumor"-) B-celler. På grunn av at CD20 er til stede i høye nivåer på "maligne" B-celler, dvs. B-celler hvis uforminskede proliferasjon kan føre til B-celle-lymfom, har CD20-overflate-antigenet potensial til å tjene som en kandidat for "målsøking" av B-cellelymfomer.

[0005] Slik målsøking kan hovedsakelig generaliseres som følger: antistoffer som er spesifikke for CD20-overflateantigenet på B-celler, innføres i en pasient, for eksempel ved injeksjon. Disse anti-CD20-antistoffer bindes spesifikt til CD20-celleoverflateantigenet på (øyensynlig) både normale og maligne B-celler; anti-CD20-antistoffet som er bundet til CD20-overflateantigenet, kan føre til ødeleggelse og uttømming av neoplastiske B-celler. Dessuten kan kjemiske midler eller radioaktive merkesubstanser med potensial til å ødelegge tumoren konjugeres til anti-CD20-antistoffet slik at midlet spesifikt "avgis" til f.eks. de neoplastiske B-celler. Uansett fremgangsmåte er det et primært mål å ødelegge tumoren: den spesifikke fremgangsmåte kan bestemmes ved det spesielle anti-CD20-antistoff som anvendes, og således kan de tilgjengelige fremgangsmåter for målsøking av CD20-antigenet variere i betydelig grad.

[0006] Ukonjugerte monoklonale antistoffer (mAb) kan være anvendelige medisiner for behandling av kreft, som vist ved U.S. Food and Drug Administrations godkjennelse av Rituximab (Rituxan™; IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA, og Genetech Inc., San Francisco, CA), for behandling av CD20-positiv B-celle, lavgradig eller follikulær ikke-Hodgkins lymfom, Trastuzumab (Herceptin™; Genentech Inc.) for behandling av fremskreden brystkreft (Grillo-Lopez, A.-J., et al., *Semin. Oncol.* 26:66-73 (1999); Goldenberg, M. M., *Clin. Ther.* 21:309-18 (1999)), Gemtuzumab (Mylotarg™, Celltech/Wyeth-Ayerst) for behandling av tilbakefall av myeloid leukemi, samt Alemtuzumab (CAMPATH™, Millenium Pharmaceuticals/Schering AG) for behandling av kronisk B-celle-

lymfocyttleukemi. Suksessen med disse produkter er ikke bare basert på deres effektivitet, men også på deres utmerkede sikkerhetsprofiler (Grillo-Lopez, A.-J., et al., *Semin. Oncol.* 26:66-73 (1999); Goldenberg, M. M., *Clin. Ther.* 21:309-18 (1999)). Til tross for oppnåelse av disse medikamenter, er det for tiden stor interesse for oppnåelse av høyere spesifikk antistoffaktivitet enn det som typisk fås ved ukonjugert mAb-terapi. Det monoklonale museantistoff, B-Ly1, er et annet antistoff som er kjent for å være spesifikt for humant CD20. (Poppema, S. og Visser, L., *Biotest Bulletin 3:* 131-139 (1987)).

[0007] Resultatene av en rekke undersøkelser tyder på at Fc-reseptor-avhengige mekanismer i vesentlig grad bidrar til virkningen av cytotoksiske antistoffer overfor tumorer, og tyder på at et optimalt antistoff mot tumorer vil bindes preferensielt til aktiverings-Fc-reseptorer og minimalt til den inhiberende partner FcγRIIB. (Clynes, R. A., et al., *Nature Medicine* 6(4):443-446 (2000); Kalergis, A.M. og Ravetch, J. V., *J Exp. Med.* 195(12):1653-1659 (juni 2002). Resultatene av minst én undersøkelse tyder for eksempel på at FcγRIIIa-reseptoren spesielt er sterkt forbundet med effektiviteten av antistoffterapi. (Cartron, G., et al., *Blood* 99(3):754-757 (februar 2002)). Denne undersøkelse viste at pasienter som er homozygote for FcγRIIIa, har bedre respons overfor Rituximab enn heterozygote pasienter. Forfatterne konkluderte med at den overlegne respons skyldtes bedre in vivo-binding av antistoffet til FcγRIIIa, noe som resulterte i bedre ADCC-aktivitet overfor lymfomceller. (Cartron, G., et al., *Blood* 99(3):754-757 (februar 2002)).

[0008] Forskjellige forsøk på å målsøke CD20-overflateantigenet er rapportert. Monoklonalt museantistoff 1F5 (et anti-CD20-antistoff) ble ifølge rapport administrert ved kontinuerlig intravenøs infusjon til pasienter med B-cellelymfom. Meget høye nivåer (>2 gram) 1F5 var ifølge rapport nødvendig for å uttømme sirkulerende tumorceller, og resultatene ble beskrevet som "forbigående". Press et al., "Monoclonal Antibody 1F5 (Anti-CD20) Serotherapy of Human B-Cell Lymphomas." *Blood* 69/2:584-591 (1987). Et potensielt problem med denne fremgangsmåte er at ikke-humane monoklonale antistoffer (f.eks. monoklonale museantistoffer) typisk mangler human effektorfunksjonalitet, dvs. at de ikke er i stand til blant annet å formidle komplementavhengig lyse, eller til å lysere humane målceller via antistoffavhengig cellulær toksisitet eller Fc-reseptor-

mediert fagocytose. Videre kan ikke-humane monoklonale antistoffer gjenkjennes av menneskeverten som et fremmed protein; gjentatte injeksjoner av slike fremmede antistoffer kan derfor føre til induksjon av immunresponser som fører til skadelige hypersensitivitetsreaksjoner. Når det gjelder musebaserte monoklonale antistoffer, omtales dette ofte som human anti-mus-antistoffrespons, eller "HAMA"-respons. Disse "fremmede" antistoffer kan dessuten angripes av vertens immunsystem slik at de egentlig nøytraliseres før de når sitt målsted.

[0009] En annen rapportert fremgangsmåte til forbedring av evnen hos monoklonale museantistoffer til å være effektive ved behandling av B-celle-forstyrrelser har vært å konjugere en radioaktiv merkesubstans eller toksin til antistoffet slik at merkesubstansen eller toksinet lokaliseres på tumorstedet. For eksempel er det ovenfor angitte 1F5-antistoff blitt "merket" med jod-131 ("^{131}I") og er ifølge rapport evaluert for biofordeling i to pasienter. Se Eary, J. F. et al., "Imaging and Treatment of B-Cell Lymphoma" *J. Nuc. Med.* 31/8:1257-1268 (1990); se også Press, O. W. et al., "Treatment of Refractory Non-Hodgkin's Lymphoma with Radiolabeled MB-1 (Anti-CD37) Antibody" *J. Clin. Onc.* 7/8:1027-1038 (1989) (indikasjon om at én pasient behandlet med ^{131}I-merket IF-5 oppnådde en "delvis respons"); Goldenberg, D. M. et al., "Targeting, Dosimetry and Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphomas with Iodine-131-Labeled LL2 Monoclonal Antibody" *J. Clin. Onc.* 9/4:548-564 (1991) (tre av åtte pasienter som fikk multiple injeksjoner, rapporterte å ha utviklet en HAMA-respons); Appelbaum, F. R. "Radiolabeled Monoclonal Antibodies in the Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma" *Hem./Onc. Clinics of N. A.* 5/5:1013-1025 (1991) (oversiktsartikkel); Press, O. W. et al "Radiolabeled-Antibody Therapy of B-Cell Lymphoma with Autologous Bone Marrow Support." *New England J. Med.* 329/17: 1219-1223 (1993) (iodine-131 labeled anti-CD20 antibody IFS and B1); og Kaminski, M. G. et al "Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphoma with ^{131}I Anti-B1 (Anti-CD20) Antibody". *New England J. Med.* 329/7(1993) (jod-131-merket anti-CD20-antistoff B1; i det følgende "Kaminski"). Toksiner (dvs. kjemoterapeutiske midler så som doksorubicin eller mitomycin C) er også blitt konjugert til antistoffer. Se for eksempel publisert PCT-patentsøknad WO 92/07466 (publisert 14. mai 1992).

[0010] Kimæriske antistoffer omfattende deler av antistoffer fra to eller flere forskjellige arter (f.eks. mus og menneske) er blitt utviklet som alternativ til "konjugerte" antistoffer. For eksempel beskriver Liu, A. Y. et al i "Production of a

Mouse-Human Chimeric Monoclonal Antibody to CD20 with Potent Fc-Dependent Biologic Activity" J. Immun. 139/10:3521-3526 (1987) et kimærisk muse/humant-antistoff rettet mot CD20-antigenet. Se også PCT-publikasjon nr. WO 88/04936. For eksempel er rituximab (RITUXAN®), et kimærisk anti-CD20, blitt godkjent for behandling av ikke-Hodgkins lymfom.

[0011] På bakgrunn av ekspresjonen av CD20 ved B-cellelymfomer kan dette antigen tjene som kandidat for "målsøking" av slike lymfomer. Slik målsøking kan hovedsakelig generaliseres som følger: antistoffer som er spesifikke for CD20-overflateantigen på B-celler, administreres til en pasient. Disse anti-CD20-antistoffer bindes spesifikt til CD20-antigenet på (tilsynelatende) både normale og maligne B-celler, og antistoffet bundet til CD20 på celleoverflaten resulterer i ødeleggelse og uttømming av tumorigene B-celler. Dessuten kan kjemiske midler, cytotoksiner eller radioaktive midler festes direkte eller indirekte til anti-CD20-antistoffet slik at midlet selektivt "avgis" til de CD20-antigen-uttrykkende B-celler. Med begge disse fremgangsmåter er det primære mål å ødelegge tumoren. Den spesifikke fremgangsmåte vil avhenge av det spesielle anti-CD20-antistoff som anvendes. Det fremgår således at de forskjellige fremgangsmåter for målsøking av CD20-antigenet kan variere betraktelig.

[0012] Rituximab- (RITUXAN®) antistoffet er et genteknologisk konstruert kimærisk humant konstant gamma 1-musedoméne inneholdende monoklonalt antistoff rettet mot det humane CD20-antigen. Dette kimæriske antistoff inneholder humane konstante gamma 1-doméner og identifiseres ved navnet "C2B8" i US-patent nr. 5 736 137 utstedt 17. april 1998, overdradd til IDEC Pharmaceuticals Corporation. RITUXAN® er godkjent for behandling av pasienter med tilbakevendt eller refraktært ("refracting") lavgradig eller follikulært, CD20-positivt ikke-Hodgkins B-cellelymfom. In vitro-virkningsmekanisme-undersøkelser har vist at RITUXAN® viser human komplementavhengig cytotoksisitet (CDC) (Reff et. al, *Blood* 83(2): 435-445 (1994)). Det viser dessuten betydelig aktivitet i analyser som måler antistoffavhengig cellulær cytotoksisitet (ADCC). RITUXAN® er blitt vist å ha antiproliferativ aktivitet i thymidin-inkorporeringsanalyser og en begrenset evne til å indusere apoptose direkte, mens CD20-antistoffer ikke har dette (Maloney *et. al, Blood* 88 (10): 637a (1996)).

Antistoffglykosylering

[0013] Oligosakkaridkomponenten kan i betydelig grad påvirke egenskaper som angår effektiviteten av et terapeutisk glykoprotein, innbefattende fysisk stabilitet, motstandsdyktighet overfor proteaseangrep, interaksjoner med immunsystemet, farmakokinetikk og spesifikk biologisk aktivitet. Slike egenskaper kan avhenge ikke bare av tilstedeværelse eller fravær, men også av de spesifikke strukturer, av oligosakkarider. Det kan gjøres noen generaliseringer mellom oligosakkaridstruktur og glykoproteinfunksjon. For eksempel medierer visse oligosakkaridstrukturer hurtig fjerning av glykoproteinet fra blodstrømmen via interaksjoner med spesifikke karbohydratbindende proteiner, mens andre kan bindes av antistoffer og trigge uønskede immunreaksjoner (Jenkins *et al., Nature Biotechnol.* 14:975-81 (1996)).

[0014] Pattedyrceller er de foretrukne verter for dannelse av terapeutiske glykoproteiner på grunn av sin evne til å glykosylere proteiner i den mest kompatible form for human anvendelse (Cumming *et al., Glycobiology 1*:115-30 (1991); Jenkins et al., *Nature Biotechnol.* 14:975-81 (1996)). Bakterier glykosylerer proteiner meget sjelden, og gir, i likhet med andre typer vanlige verter, så som gjærsopp, filamentøse sopp, insekt- og planteceller, glykosyleringsmønstre forbundet med hurtig fjerning fra blodstrømmen, uønskede immun-interaksjoner, og i noen spesifikke tilfeller redusert biologisk aktivitet. Blant pattedyrceller har kinesisk hamster-ovarie- (CHO)-celler vært mest alminnelig anvendt i de siste to tiår. I tillegg til at disse celler gir egnede glykosylerings-mønstre, muliggjør de konstant generering av genetisk stabile, meget produktive klonale cellelinjer. De kan dyrkes til høye tettheter i enkle bioreaktorer ved anvendelse av serumfrie medier, og muliggjøre utvikling av sikre og reproduserbare bioprosesser. Andre vanlig anvendte dyreceller innbefatter baby-hamsternyre (BHK)-celler, NS0- og Sp2/0-musemyelomceller. I den senere tid er dannelse ut fra transgene dyr også blitt testet. (Jenkins et al., *Nature Biotechnol.* 14:975-81 (1996)).

[0015] Alle antistoffer inneholder karbohydratstrukturer i konserverte stillinger i de konstante tungkjederegioner, og hver isotype har en særlig rekke N-bundne karbohydratstrukturer, som variabelt påvirker proteinsammensetning, -utskillelse og funksjonell aktivitet. (Wright, A., og Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15:26-32 (1997)). Strukturen av det tilknyttede N-bundne karbohydrat varierer i betydelig grad, avhengig av graden av prosessering, og kan innbefatte komplekse oligosakkarider med høyt innhold av mannose, med multiple grener og med to

antenner ("biantennary"). (Wright, A., og Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15:26-32 (1997)). Det er typisk en heterogen prosessering av kjerne-oligosakkarid-strukturene tilknyttet på et spesielt glykosyleringssted, slik at til og med monoklonale antistoffer finnes som multiple glykoformer. Det er likeledes vist at hovedforskjeller i antistoff-glykosyleringen finnes mellom cellelinjer, og enda mindre forskjeller sees for en gitt cellelinje dyrket under forskjellige dyrkningsbetingelser. (Lifely, M. R. et al., *Glycobiology 5(8):813-22* (1995)).

[0016] Én måte til å oppnå store økninger i potens, mens det opprettholdes en enkel produksjonsprosess og potensielt unngås betydelige, uønskede bivirkninger, er å forsterke de naturlige, cellemedierte effektorfunksjoner hos monoklonale antistoffer ved omarbeiding av deres oligosakkaridkomponent som beskrevet i Umaña, P. *et al., Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999) og US-patent nr. 6 602 684, og hele innholdet i disse er herved i sin helhet medtatt her i dokumentet som referanse. Antistoffer av IgG1-typen, de mest alminnelig anvendte antistoffer ved kreft-immunterapi, er glykoproteiner som har et konservert N-bundet glykosyleringssete ved Asn297 i hvert CH2-doméne. De to komplekse toantenne-oligosakkarider knyttet til Asn297 er begravet mellom CH2-doménene og danner utstrakte kontakter med polypeptidskjelettet, og deres tilstedeværelse er essensiell for at antistoffet skal mediere effektorfunksjoner så som antistoffavhengig cellulær cytotoksisitet (ADCC) (Lifely, M. R., et al., *Glycobiology* 5:813-822 (1995); Jefferis, R., et al., *Immunol Rev.* 163:59-76 (1998); Wright, A. og Morrison, S. L., *Trends Biotechnol.* 15:26-32 (1997)).

[0017] De nærværende oppfinnere har tidligere vist at overekspresjon i kinesisk hamster-ovarie- (CHO)-celler av β(1,4)-N-acetylglukosaminyltransferase III ("GnTIII"), en glykosyltransferase som katalyserer dannelsen av todelte ("oligosakkarider, i betydelig grad øker ADCC-aktiviteten in vitro av et kimærisk monoklonalt anti-neuroblastom-antistoff (chCE7) dannet av de omarbeidede CHO-celler (se Umaña, P. et al., *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999); og internasjonal publikasjon nr. WO 99/54342, idet hele innholdet i disse er medtatt her i dokumentet som referanse). Antistoffet chCE7 hører til en stor klasse ukonjugerte mAb som har høy tumoraffinitet og -spesifisitet, men har for liten potens til å være klinisk anvendelige ved fremstilling i industrielle standard-cellelinjer som mangler GnTIII-enzymet (Umaña, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999)). Denne undersøkelse var den første som viste at store

økninger i ADCC-aktivitet kan oppnås ved at de antistoffproduserende celler omarbeides til å uttrykke GnTIII, noe som også førte til en økning i andelen av todelte ("bisected") oligosakkarider som er knyttet til den konstante region (Fc), innbefattende todelte, ikke-fukosylerte oligosakkarider, over nivåene som finnes i naturlig forekommende antistoffer.

[0018] Det er et stadig behov for forbedrede terapeutiske fremgangsmåter rettet mot CD20-antigenet for behandling av B-celle-lymfomer i primater, innbefattende, men ikke begrenset til, mennesker.

[0019] Idet man er klar over det voldsomme terapeutiske potensial hos antigenbindende molekyler (ABM) som har bindingsspesifisitet som hos muse-B-Ly1-antistoffet, og som er blitt glyko-omarbeidet til å forsterke Fc-reseptor-bindende affinitet og -effektorfunksjon, har de nærværende oppfinnere utviklet en fremgangsmåte for fremstilling av slike ABM. Denne fremgangsmåte innbefatter blant annet frembringelse av rekombinante, kimæriske antistoffer eller kimæriske fragmenter derav. Effektiviteten av disse ABM blir ytterligere forsterket ved omarbeiding av glykosyleringsprofilen for antistoff-Fc-regionen.

[0020] Ved ett aspekt er oppfinnelsen følgelig rettet mot et isolert polynukleotid omfattende: (a) en sekvens valgt fra en gruppe bestående av: SEKV ID NR:5, SEKV ID NR: 6 og SEKV ID NR:7. (CDR V_{H-1}); (b) en sekvens valgt fra en gruppe bestående av: SEKV ID NR:21, SEKV ID NR:22 og SEKV ID NR:23. (CDR V_{H-2}); og SEKV ID NR:24. Ved et annet aspekt er oppfinnelsen rettet mot et isolert polynukleotid omfattende SEKV ID NR:8, SEKV ID NR:9 og SEKV ID NR:10. (CDR V_L). Ved én utførelsesform koder hvilke som helst av disse polynukleotider for et fusjonspolypeptid.

[0021] Ved et ytterligere aspekt er oppfinnelsen rettet mot et isolert polynukleotid omfattende SEKV ID NR:3. Ved et annet aspekt er oppfinnelsen rettet mot et isolert polynukleotid omfattende SEKV ID NR:4. Ved et ytterligere aspekt er oppfinnelsen rettet mot et isolert polynukleotid omfattende en sekvens valgt fra gruppen bestående av SEKV ID NR:29; SEKV ID NR:31; SEKV ID NR:33; SEKV ID NR:35; SEKV ID NR:37; SEKV ID NR:39; SEKV ID NR:41; SEKV ID NR:43; SEKV ID NR:45; SEKV ID NR:47; SEKV ID NR:49; SEKV ID NR:51; SEKV ID NR:53; SEKV ID NR:55; SEKV ID NR:57; SEKV ID NR:59; SEKV ID NR:61; SEKV ID NR:63; SEKV ID NR:65; SEKV ID NR:67; SEKV ID NR:69; og SEKV ID NR:71. Ved et annet aspekt er oppfinnelsen rettet mot et isolert polynukleotid

omfattende SEKV ID NR:75. Ved én utførelsesform koder slike polynukleotider for fusjonspolypeptider.

[0022] Oppfinnelsen er videre rettet mot et isolert polynukleotid omfattende en sekvens med minst 80% identitet med SEKV ID NR:3, hvor det isolerte polynukleotid koder for et fusjonspolypeptid. Ved et ytterligere aspekt er oppfinnelsen rettet mot et isolert polynukleotid omfattende en sekvens med minst 80% identitet med SEKV ID NR: 4, hvor det isolerte polynukleotid koder for et fusjonspolypeptid. Oppfinnelsen er videre rettet mot et isolert polynukleotid omfattende en sekvens med minst 80% identitet med en sekvens valgt fra gruppen bestående av SEKV ID NR:29; SEKV ID NR:31; SEKV ID NR:33; SEKV ID NR:35; SEKV ID NR:37; SEKV ID NR:39; SEKV ID NR:41; SEKV ID NR:43; SEKV ID NR:45; SEKV ID NR:47; SEKV ID NR:49; SEKV ID NR:51; SEKV ID NR:53; SEKV ID NR:55; SEKV ID NR:57; SEKV ID NR:59; SEKV ID NR:61; SEKV ID NR:63; SEKV ID NR:65; SEKV ID NR:67; SEKV ID NR:69; og SEKV ID NR:71, hvor det isolerte polynukleotid koder for et fusjonspolypeptid. Ved et ytterligere aspekt er oppfinnelsen rettet mot et isolert polynukleotid omfattende en sekvens med minst 80% identitet med SEKV ID NR:75, hvor det isolerte polynukleotid koder for et fusjonspolypeptid.

[0023] Oppfinnelsen er videre rettet mot et polynukleotid omfattende SEKV ID NR:11 (hel tung kjede), eller polynukleotider med 80%, 85%, 90%, 95% eller 99% identitet med SEKV ID NR:11. Oppfinnelsen er også rettet mot et polynukleotid omfattende SEKV ID NR:12 (hel lett kjede), eller to polynukleotider med 80%, 85%, 90%, 95% or 99% identitet med SEKV ID NR:12.

[0024] Oppfinnelsen er også rettet mot et isolert polynukleotid som koder for et kimærisk polypeptid med sekvensen SEKV ID NR:1. Ved én utførelsesform omfatter polynukleotidet en sekvens som koder for et polypeptid med sekvensen SEKV ID NR: 1, og en sekvens som koder for et polypeptid med sekvensen for en antistoff-Fc-region, eller et fragment derav, fra en annen art enn mus. Oppfinnelsen er også rettet mot et isolert polynukleotid som koder for et kimærisk polypeptid med en sekvens valgt fra gruppen bestående av SEKV ID NR:30; SEKV ID NR:32; SEKV ID NR:34; SEKV ID NR:36; SEKV ID NR:38; SEKV ID NR:40; SEKV ID NR:42; SEKV ID NR:44; SEKV ID NR:46; SEKV ID NR:48; SEKV ID NR:50; SEKV ID NR:52; SEKV ID NR:54; SEKV ID NR:56; SEKV ID NR:58; SEKV ID NR:60; SEKV ID NR:62; SEKV ID NR:64; SEKV ID NR:66;

SEKV ID NR:68; SEKV ID NR:70; og SEKV ID NR:72. Ved én utførelsesform omfatter polynukleotidet en sekvens som koder for et polypeptid med en sekvens valgt fra gruppen bestående av SEKV ID NR:30; SEKV ID NR:32; SEKV ID NR: 34, SEKV ID NR:36; SEKV ID NR:38; SEKV ID NR:40; SEKV ID NR:42; SEKV ID NR:44; SEKV ID NR:46; SEKV ID NR:48; SEKV ID NR:50; SEKV ID NR:52; SEKV ID NR:54; SEKV ID NR:56; SEKV ID NR:58; SEKV ID NR:60; SEKV ID NR:62; SEKV ID NR:64; SEKV ID NR:66; SEKV ID NR:68; SEKV ID NR:70; og SEKV ID NR:72; og en sekvens som koder for et polypeptid med sekvensen som hos en antistoff-Fc-region, eller et fragment derav, fra en annen art enn mus.

[0025] Ved enda et annet aspekt er oppfinnelsen rettet mot et isolert polynukleotid som koder for et kimærisk polypeptid med sekvensen SEKV ID NR: 2. Ved én utførelsesform omfatter polynukleotidet en sekvens som koder for et polypeptid med sekvensen SEKV ID NR: 2, og en sekvens som koder for et polypeptid med sekvensen som hos en antistoff-Fc-region, eller et fragment derav, fra en annen art enn mus. Ved enda et annet aspekt er oppfinnelsen rettet mot et isolert polynukleotid som koder for et kimærisk polypeptid med sekvensen SEKV ID NR:76. Ved én utførelsesform omfatter polynukleotidet en sekvens som koder for et polypeptid med sekvensen SEKV ID NR:76; og en sekvens som koder for et polypeptid med sekvens som for en antistoff-Fc-region, eller et fragment derav, fra en annen art enn mus.

[0026] Oppfinnelsen er også rettet mot et isolert polynukleotid omfattende en sekvens som koder for et polypeptid med V_H-regionen som hos muse-B-Ly1-antistoffet, eller funksjonelle varianter derav, og en sekvens som koder for et polypeptid med sekvens som for en antistoff-Fc-region, eller et fragment derav, fra en annen art enn mus. Ved et annet aspekt er oppfinnelsen rettet mot et isolert polynukleotid omfattende en sekvens som koder for et polypeptid med V_L-regionen av muse- B-Ly1-antistoffet, eller funksjonelle varianter derav, og en sekvens som koder for et polypeptid med sekvens som for en antistoff-Fc-region, eller et fragment derav, fra en annen art enn mus.

[0027] Oppfinnelsen er videre rettet mot en ekspresjonsvektor omfattende hvilke som helst av de isolerte polynukleotider beskrevet ovenfor, og en vertscelle som omfatter en slik ekspresjonsvektor. Ved et ytterligere aspekt er oppfinnelsen rettet mot en vertscelle omfattende hvilke som helst av de isolerte polynukleotider beskrevet ovenfor.

[0028] Ved ett aspekt er oppfinnelsen rettet mot et isolert polypeptid omfattende: (a) en sekvens valgt fra en gruppe bestående av: SEKV ID NR:15, SEKV ID NR: 16 og SEKV ID NR:17. (CDR V_{H-1}); (b) en sekvens valgt fra en gruppe bestående av: SEKV ID NR:25, SEKV ID NR:26 og SEKV ID NR:27 (CDR V_{H-2}); og SEKV ID NR:28, hvor polypeptidet er et fusjonspolypeptid. Ved et annet aspekt er oppfinnelsen rettet mot et isolert polypeptid omfattende SEKV ID NR:18, SEKV ID NR: 19 og SEKV ID NR:20. (CDR V_L), hvor polypeptidet er et fusjonspolypeptid.

[0029] Oppfinnelsen er også rettet mot et kimærisk polypeptid omfattende sekvensen SEKV ID NR:1 eller en variant derav. Oppfinnelsen er videre rettet mot et kimærisk polypeptid omfattende sekvensen SEKV ID NR:2 eller en variant derav. Ved én utførelsesform omfatter hvert av disse polypeptider videre en human Fc-region. Oppfinnelsen er også rettet mot et kimærisk polypeptid omfattende en sekvens valgt fra gruppen bestående av SEKV ID NR:30; SEKV ID NR:32; SEKV ID NR:34; SEKV ID NR:36; SEKV ID NR:38; SEKV ID NR:40; SEKV ID NR:42; SEKV ID NR:44; SEKV ID NR:46; SEKV ID NR:48; SEKV ID NR:50; SEKV ID NR:52; SEKV ID NR:54; SEKV ID NR:56; SEKV ID NR:58; SEKV ID NR:60; SEKV ID NR:62; SEKV ID NR:64; SEKV ID NR:66; SEKV ID NR:68; SEKV ID NR:70; og SEKV ID NR:72, eller en variant derav. Oppfinnelsen er videre rettet mot et kimærisk polypeptid omfattende sekvensen SEKV ID NR:76 eller en variant derav. Ved én utførelsesform omfatter hvert av disse polypeptider videre en human Fc-region.

[0030] Ved et annet aspekt er oppfinnelsen rettet mot et polypeptid omfattende en sekvens som stammer fra muse-B-Ly1-antistoffet, og en sekvens som stammer fra et heterologt polypeptid, samt et antigenbindende molekyl omfattende et slikt polypeptid. Ved én utførelsesform er det antigenbindende molekyl et antistoff. Ved en foretrukket utførelsesform er antistoffet kimærisk. Ved en annen foretrukket utførelsesform er antistoffet humanisert eller primatisert.

[0031] Ved et ytterligere aspekt er oppfinnelsen rettet mot et isolert polypeptid omfattende SEKV ID NR: 13 eller en variant derav. Ved et annet aspekt er oppfinnelsen rettet mot et isolert polypeptid omfattende SEKV ID NR: 14.

[0032] Ved et annet aspekt er oppfinnelsen rettet mot et ABM som er i stand til å konkurrere med muse-B-Ly1-antistoffet med hensyn til binding til CD20,

og som er kimærisk. Ved én utførelsesform er ABM et antistoff eller et fragment derav. Ved en ytterligere utførelsesform er ABM et rekombinant antistoff omfattende en V_H-region med en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEKV ID NR:1; SEKV ID NR:30; SEKV ID NR:32; SEKV ID NR:34; SEKV ID NR:36; SEKV ID NR:38; SEKV ID NR:40; SEKV ID NR:42; SEKV ID NR:44; SEKV ID NR:46; SEKV ID NR:48; SEKV ID NR:50; SEKV ID NR:52; SEKV ID NR:54; SEKV ID NR:56; SEKV ID NR:58; SEKV ID NR:60; SEKV ID NR:62; SEKV ID NR:64; SEKV ID NR:66; SEKV ID NR:68; SEKV ID NR:70; og SEKV ID NR:72. Ved en annen utførelsesform er ABM is et rekombinant antistoff omfattende en V_L-region med en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEKV ID NR: 2 og SEKV ID NR:76. Ved en ytterligere utførelsesform er ABM et rekombinant antistoff som er primatisert. Ved enda en ytterligere utførelsesform er ABM et rekombinant antistoff som er humanisert. Ved en annen utførelsesform er ABM et rekombinant antistoff omfattende en human Fc-region. Ved en ytterligere utførelsesform kan hvilke som helst av ABM omtalt ovenfor være konjugert til en del så som et toksin eller en radiomerkesubstans.

[0033] Oppfinnelsen angår videre et ABM ifølge foreliggende oppfinnelse, hvilket ABM har modifiserte oligosakkarider. Ved én utførelsesform har de modifiserte oligosakkarider redusert fukosylering sammenliknet med ikke-modifiserte oligosakkarider. Ved andre utførelsesformer er de modifiserte oligosakkarider hybride eller komplekse. Ved en ytterligere utførelsesform har ABM en økt andel av ikke-fukosylerte oligosakkarider eller todelte ikke-fukosylerte oligosakkarider i Fc-regionen av molekylet. Ved én utførelsesform er de todelte, ikke-fukosylerte oligosakkarider hybride. Ved en ytterligere utførelsesform er de todelte, ikke-fukosylerte oligosakkarider komplekse. Ved én utførelsesform er minst 20% av oligosakkaridene i Fc-regionen av polypeptidet ikke-fukosylerte eller todelte, ikke-fukosylerte. Ved mer foretrukne utførelsesformer er minst 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% eller 75% eller mer av oligosakkaridene ikke-fukosylerte eller todelte, ikke-fukosylerte.

[0034] Oppfinnelsen angår videre et polynukleotid som koder for hvilke som helst av ABM omtalt ovenfor, samt ekspresjonsvektorer og celler omfattende et slikt polynukleotid.

[0035] Oppfinnelsen angår videre en fremgangsmåte for fremstilling av et ABM som er i stand til å konkurrere med muse-B-Ly1-antistoffet om binding til

CD20, og hvor nevnte ABM er kimærisk; hvilken fremgangsmåte omfatter: (a) dyrking av en vertscelle omfattende et polynukleotid som koder for et ABM ifølge foreliggende oppfinnelse i et medium under betingelser som muliggjør ekspresjon av polynukleotidet som koder for dette ABM; og (b) gjenvinning av dette ABM fra den resulterende kultur.

[0036] Ved et annet aspekt angår oppfinnelsen et farmasøytisk preparat omfattende ABM ifølge oppfinnelsen. Det er påtenkt at det farmasøytiske preparat videre kan omfatte en farmasøytisk akseptabel bærer, en adjuvans eller en kombinasjon derav.

[0037] Ved et ytterligere aspekt angår oppfinnelsen en fremgangsmåte for behandling av en sykdom som kan behandles med B-celle-uttømming. Fremgangsmåten omfatter administrering av en terapeutisk effektiv mengde av ABM ifølge foreliggende oppfinnelse til et menneske som trenger det. Ved en foretrukket utførelsesform behandles sykdommen ved administrering av et ABM som er et kimærisk antistoff, eller et kimærisk fragment av et antistoff.

[0038] Ved enda et annet aspekt angår oppfinnelsen en vertscelle som er omarbeidet til å uttrykke minst én nukleinsyre som koder for et polypeptid med GnTIII-aktivitet i en mengde tilstrekkelig til å modifisere oligosakkaridene i Fc-regionen dannet av vertscellen, hvor ABM er i stand til å konkurrere med muse-B-Ly1-antistoffet med hensyn til binding til CD20, og hvor ABM er kimærisk. Ved én utførelsesform er polypeptidet med GnTIII-aktivitet et fusjonspolypeptid. Ved en annen utførelsesform er ABM dannet av vertscellen et antistoff eller et antistoff-fragment. Ved en ytterligere utførelsesform omfatter ABM en region ekvivalent med Fc-regionen av et humant IgG.

[0039] Oppfinnelsen er også rettet mot et isolert polynukleotid omfattende minst én komplementaritetesbestemmende region av muse-B-Ly1-antistoffet, eller en variant eller avkortet form derav inneholdende minst de spesifisitets-bestemmende rester for den komplementaritetsbestemmende region, hvor det isolerte polynukleotid koder for et fusjonspolypeptid. Slike isolerte polynukleotider koder fortrinnsvis for et fusjonspolypeptid som er et antigenbindende molekyl. Ved én utførelsesform omfatter polynukleotidet tre komplementaritetsbestemmende regioner av muse-B-Ly1-antistoffet, eller varianter eller avkortede former derav inneholdende minst de spesifisitets-bestemmende rester for hver av de tre komplementaritetsbestemmende regioner. Ved en annen utførelsesform koder

polynukleotidet for hele den variable region av den lette eller tunge kjede av et kimærisk (f.eks. humanisert) antistoff. Oppfinnelsen er videre rettet mot polypeptidene som kodes for av slike polynukleotider.

[0040] Ved en annen utførelsesform er oppfinnelsen rettet mot et antigenkombinerende molekyl omfattende minst én komplementaritets-bestemmende region av muse-B-Ly1-antistoffet, eller en variant- eller avkortet form derav inneholdende minst de spesifisitetsbestemmende rester for den komplementaritetsbestemmende region, og omfattende en sekvens som stammer fra et heterologt polypeptid. Ved én utførelsesform omfatter det antigenbindende molekyl tre komplementaritetsbestemmende regioner av muse-B-Ly1-antistoffet, eller varianter eller avkortede former derav inneholdende minst de spesifisitetsbestemmende rester for hver av de tre komplementaritets-bestemmende regioner. Ved et annet aspekt omfatter det antigenbindende molekyl den variable region av en lett eller tung antistoffkjede. Ved én spesielt anvendelig utførelsesform er det antigenbindende molekyl et kimærisk, f.eks. humanisert, antistoff. Oppfinnelsen er også rettet mot fremgangsmåter for frembringelse av slike antigenbindende molekyler, og anvendelse av disse ved behandling av sykdom, innbefattende B-celle-lymfomer.

[0041] Foreliggende oppfinnelse er det første kjente tilfelle hvor et type II-anti-CD20-antistoff er blitt omarbeidet til å ha økte effektorfunksjoner så som ADCC, mens det fremdeles bibeholder potent apoptoseevne. Foreliggende oppfinnelse er følgelig rettet mot et omarbeidet anti-CD20-antistoff type II med øket ADCC som resultat av denne omarbeidelse og uten tap av vesentlig evne til å indusere apoptose. Ved én utførelsesform er anti-CD20-antistoffene type II blitt omarbeidet til å ha forandret glykosyleringsmønster i Fc-regionen. Ved en spesiell utførelsesform omfatter den forandrede glykosylering et øket nivå av todelte komplekse rester i Fc-regionen. Ved en annen spesiell utførelsesform omfatter den forandrede glykosylering et redusert nivå av fukoserester i Fc-regionen. Ved en annen utførelsesform har anti-CD20-antistoffene type II gjennomgått polypeptidomarbeiding. Oppfinnelsen er videre rettet mot fremgangsmåter for fremstilling av slike omarbeidede type II-antistoffer, og fremgangsmåter for anvendelse av slike antistoffer ved behandling av forskjellige B-celle-forstyrrelser, innbefattende B-celle-lymfomer.

[0042] Vertscellen ifølge foreliggende oppfinnelse kan velges fra gruppen

som innbefatter, men som ikke er begrenset til, en CHO-celle, en BHK-celle, en NSO-celle, en SP2/0-celle, en YO-myelomcelle, en P3X63-musemyelomcelle, en PER-celle, en PER.C6-celle eller en hybridomcelle. Ved én utførelsesform omfatter vertscellen ifølge oppfinnelsen videre et transfektert polynukleotid omfattende et polynukleotid som koder for V_L-regionen av muse-B-Ly1-antistoffet eller varianter derav og en sekvens som koder for en region ekvivalent til Fc-regionen av et humant immunglobulin. Ved en annen utførelsesform omfatter vertscellen ifølge oppfinnelsen videre et transfektert polynukleotid omfattende et polynukleotid som koder for V_H-regionen av muse-B-Ly1-antistoffet eller varianter derav, og en sekvens som koder for en region ekvivalent til Fc-regionen av et humant immunglobulin.

[0043] Ved et ytterligere aspekt er oppfinnelsen rettet mot en vertscelle som danner et ABM som oppviser øket Fc-reseptorbindingsaffinitet og/eller øket effektorfunksjon som resultat av modifikasjonen av dets oligosakkarider. Ved én utførelsesform er den økte bindingsaffinitet til en Fc-reseptor, spesielt FcγRIIIA-reseptoren. Effektorfunksjonen som er påtenkt i det foreliggende, kan velges fra gruppen som innbefatter, men som ikke er begrenset til, øket Fc-mediert cellulær cytotoksisitet; øket binding til NK-celler, øket binding til makrofager, øket binding til polymorfonukleære celler; øket binding til monocytter; øket direkte signalisering som induserer apoptose; øket dendrittcelleutvikling; og øket T-celle-priming.

[0044] Ved en ytterligere utførelsesform omfatter vertscellen ifølge foreliggende oppfinnelse minst én nukleinsyre som koder for et polypeptid med GnTIII-aktivitet, som er operabelt knyttet til et konstitutivt promoterelement.

[0045] Ved et annet aspekt er oppfinnelsen rettet mot en metode for frembringelse av et ABM i en vertscelle, omfattende: (a) dyrking av en vertscelle som er omarbeidet til å uttrykke minst ett polynukleotid som koder for et fusjonspolypeptid med GnTIII-aktivitet, under betingelser som muliggjør frembringelse av nevnte ABM, og som muliggjør modifisering av oligosakkaridene som finnes på Fc-regionen av dette ABM; og (b) isolering av nevnte ABM; hvor nevnte ABM er i stand til å konkurrere med muse-B-Ly1-antistoffet med hensyn til binding til CD20, og hvor nevnte ABM er kimærisk. Ved én utførelsesform er polypeptidet med GnTIII-aktivitet et fusjonspolypeptid, fortrinnsvis omfattende det katalytiske doméne av GnTIII og Golgi-lokalisasjonsdomènet av et heterologt Golgi-residerende polypeptid valgt fra gruppen bestående av lokalisasjons-

domenet av mannosidase II, lokalisasjonsdomenet av β(1,2)-N-acetylglukosaminyltransferase I ("GnTI"), lokalisasjonsdomenet av mannosidase I, lokalisasjonsdomenet av β(1,2)-N-acetylglukosaminyltransferase II ("GnTII") og lokalisasjonsdomenet av α1-6-kjerne-fukosyltransferase. Golgi-lokalisasjons-domenet er fortrinnsvis fra mannosidase II eller GnTI.

[0046] Ved et ytterligere aspekt er oppfinnelsen rettet mot en fremgangsmåte for modifisering av glykosyleringsprofilen for et anti-CD20-ABM frembrakt av en vertscelle, omfattende innføring i vertscellen av minst én nukleinsyre eller ekspresjonsvektor ifølge oppfinnelsen. Ved én utførelsesform er ABM et antistoff eller et fragment derav; fortrinnsvis omfattende Fc-regionen av et IgG. Alternativt er polypeptidet et fusjonsprotein som innbefatter en region ekvivalent til Fc-regionen av et humant IgG.

[0047] Ved ett aspekt angår oppfinnelsen et rekombinant, kimærisk antistoff, eller et fragment derav, som kan konkurrere med muse-B-Ly1-antistoffet med hensyn til binding til CD20, og med redusert fukosylering.

[0048] Ved et annet aspekt er foreliggende oppfinnelse rettet mot en fremgangsmåte for modifisering av glykosyleringen av det rekombinante antistoff eller et fragment derav ifølge oppfinnelsen ved anvendelse av et fusjons-polypeptid med GnTIII-aktivitet og omfattende Golgi-lokalisasjonsdomenet av et heterologt Golgi-residerende polypeptid. Ved én utførelsesform omfatter fusjonspolypeptidene ifølge oppfinnelsen det katalytiske doméne av GnTIII. Ved en annen utførelsesform er Golgi-lokalisasjonsdomenet valgt fra gruppen bestående av: lokalisasjonsdomenet av mannosidase II, lokalisasjonsdomenet av GnTI, lokalisasjonsdomenet av mannosidase I, lokalisasjonsdomenet av GnTII og lokalisasjonsdomenet av α1-6-kjerne-fukosyltransferase. Fortrinnsvis er Golgi-lokalisasjonsdomenet fra mannosidase II eller GnTI.

[0049] Ved én utførelsesform er fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen rettet mot frembringelse av et rekombinant, kimærisk antistoff eller et fragment derav, med modifiserte oligosakkarider hvor de modifiserte oligosakkarider har redusert fukosylering sammenliknet med ikke-modifiserte oligosakkarider. I henhold til foreliggende oppfinnelse kan disse modifiserte oligosakkarider være hybride eller komplekse. Ved en annen utførelsesform er fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen rettet mot frembringelse av et rekombinant, kimærisk antistoff eller et fragment

derav med økt andel av todelte, ikke-fukosylerte oligosakkarider i Fc-regionen av polypeptidet. Ved én utførelsesform er de todelte, ikke-fukosylerte oligosakkarider hybride. Ved en annen utførelsesform er de todelte, ikke-fukosylerte oligosakkarider komplekse. Ved en ytterligere utførelsesform er fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen rettet mot frembringelse av et rekombinant, kimærisk antistoff eller et fragment derav hvor minst 20% av oligosakkaridene i Fc-regionen av nevnte polypeptid er todelte, ikke-fukosylerte. Ved en foretrukket utførelsesform er minst 30% av oligosakkaridene i Fc-regionen av polypeptidet todelte, ikke-fukosylerte. Ved en annen foretrukket utførelsesform er minst 35% av oligosakkaridene i Fc-regionen av polypeptidet todelte, ikke-fukosylerte.

[0050] Ved et ytterligere aspekt er oppfinnelsen rettet mot et rekombinant, kimærisk antistoff eller et fragment derav, som oppviser økt Fc-reseptor-bindingsaffinitet og/eller økt effektorfunksjon som resultat av modifikasjonen av dets oligosakkarider. Ved én utførelsesform er den økte bindingsaffinitet til en Fc-aktiverende reseptor. Ved en ytterligere utførelsesform er Fc-reseptoren Fcγ-aktiverende reseptor, spesielt FcγRIIIa-reseptoren. Effektorfunksjonen som er påtenkt i det foreliggende, kan være valgt fra gruppen som innbefatter, men som ikke er begrenset til, økt Fc-mediert cellulær cytotoksisitet; økt binding til NK-celler; økt binding til makrofager; økt binding til polymorfonukleære celler; økt binding til monocytter; økt direkte signalisering som induserer apoptose; økt dendrittcelleutvikling; og økt T-celle-priming.

[0051] Ved et annet aspekt er oppfinnelsen rettet mot et rekombinant, kimærisk antistoff-fragment, med bindingsspesifisitet som for muse-B-Ly1-antistoffet og inneholdende Fc-regionen, som er omarbeidet til å ha økt effektorfunksjon frembrakt ved hvilken som helst av fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse.

[0052] Ved et annet aspekt er foreliggende oppfinnelse rettet mot et fusjonsprotein som innbefatter et polypeptid med sekvensen SEKV ID NR:1 og en region ekvivalent med Fc-regionen av et immunglobulin, og som er omarbeidet til å ha økt effektorfunksjon frembrakt ved hvilken som helst av fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse.

[0053] Ved et annet aspekt er foreliggende oppfinnelse rettet mot et fusjonsprotein som innbefatter et polypeptid med sekvensen SEKV ID NR: 2 og en region ekvivalent med Fc-regionen av et immunglobulin og omarbeidet til å ha

øket effektorfunksjon frembrakt ved hvilken som helst av fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse.

[0054] Ved ett aspekt er foreliggende oppfinnelse rettet mot et farmasøytisk preparat omfattende et rekombinant, kimærisk antistoff, frembrakt ved hjelp av hvilken som helst av fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse, og en farmasøytisk akseptabel bærer. Ved et annet aspekt er foreliggende oppfinnelse rettet mot et farmasøytisk preparat omfattende et rekombinant, kimærisk antistoff-fragment frembrakt ved hjelp av hvilken som helst av fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse, og en farmasøytisk akseptabel bærer. Ved et annet aspekt er foreliggende oppfinnelse rettet mot et farmasøytisk preparat omfattende et fusjonsprotein frembrakt ved hjelp av hvilken som helst av fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse, og en farmasøytisk akseptabel bærer.

[0055] Oppfinnelsen er videre rettet mot en fremgangsmåte for behandling av en sykdom som kan behandles ved B-celle-uttømming, omfattende administrering av en terapeutisk effektiv mengde av det rekombinante, kimæriske antistoff eller fragmentet derav, frembrakt ved hvilken som helst av fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse, til et menneske som trenger det.

Det vises nå til tegningene.

[0056] Fig 1. Nukleotid- (SEKV ID NR:3) og aminosyresekvens (SEKV ID NR:1) for V_H-regionen av muse-B-Ly1.

[0057] Fig 2. Nukleotid- (SEKV ID NR:4) og aminosyresekvens (SEKV ID NR:2) for V_L-regionen av muse-B-Ly1.

[0058] Fig 3. Binding av Rituximab® (O) og ch-B-Ly1 (Δ) til CD20 på Raji B-lymfomceller.

[0059] Fig 4. B-celle-uttømming ved Rituximab® (O) og ch-B-Ly1 (Δ) i fullblod fra de tre forskjellige klasser av FcγRIIIa-158V/F-genotype: (A) fullblod fra en F/F-donor, homozygot med hensyn til lavereaffinitets-reseptoren; (B) fullblod fra en F/V-donor, heterozygot med hensyn til affinitetsreseptoren; og (C) fullblod fra en V/V-donor, homozygot med hensyn til høyereaffinitetsreseptoren.

[0060] Fig 5. Nukleotid- (SEKV ID NR:11) og aminosyresekvens (SEKV ID NR:13) for den tunge kjede av et kimærisk, anti-CD20-antistoff.

[0061] Fig 6. Nukleotid- (SEKV ID NR:12) og aminosyresekvens (SEKV ID NR:13) for den lette kjede av et kimærisk, anti-CD20-antistoff.

[0062] Fig 7. Nukleotid- og aminosyresekvenser for muse- B-Ly1-antistoff-CDR: (A) Forutsette CDR for V_H-regionen. (B) Forutsette CDR for V_L-regionen.

[0063] Fig 8. MALDI-TOF-profil for et glyko-omarbeidet, kimærisk B-Ly1-antistoff. (A) Tabell som detaljert viser prosentandelene av spesifikke topper; (B) Spektrum for glyko-omarbeidet kimærisk B-Ly1; (C) Spektrum for glyko-omarbeidet kimærisk B-Ly1 behandlet med Endo-H.

[0064] Fig 9. Binding av forskjellige humaniserte anti-CD20-antistoffer til Raji B-celler. Forskjellene mellom B-HH2-konstruksjonen og B-HL8- og B-HL11-konstruksjonene befinner seg i rammeverk 1- og 2-regionene idet alle de tre CDR er identiske. FR1- og FR2-sekvensene i B-HL8 og B-HL11 stammer fra den humane VH3-klasse, mens det fullstendige B-HH2-rammeverk er humant VH1-avledet. B-HL11 er et derivat av B-HL8 med enkeltmutasjonen Glu1Gln, hvor Gln er aminosyreresten i B-HH2-konstruksjonen. Dette betyr at Glu1Gln-utskiftingen ikke forandringer bindingsaffiniteten eller -intensiteten. De andre forskjeller mellom B-HH2 og B-HL8 er 14 FR-rester, hvorav hvilke én eller flere vil innvirke på dette antistoffs antigenbindende oppførsel.

[0065] Fig. 10. Binding av det humaniserte anti-CD20-antistoff BHL4-KV1 på Raji-målceller. B-HL4-konstruksjonen fås fra B-HH2-antistoffet ved erstatting av FR1 i B-HH2 med FR1 fra den humane kimlinjesekvens VH1_45. Denne konstruksjon viser sterkt redusert antigenbindende evne, til tross for at den har forskjellige aminosyrer ved bare tre stillinger i FR1. Disse rester befinner seg i stillingene 2, 14 og 30 ifølge Kabat-nummerering. Blant disse ser det ut til at stilling 30 er den mest innflytelsesrike stilling, siden den er en del av Chothia-definisjonen av CDR1.

[0066] Fig. 11. Sammenlikning av bindingsoppførselen hos B-HH1, B-HH2, B-HH3 og parentalantistoffet B-ly1. Dataene viser at alle Ab viser en liknende ED50-verdi, men B-HH1-konstruksjonen bindes med lavere intensitet/støkiometri enn variantene B-HH2 og B-HH3. B-HH1 kan skjelnes fra B-HH2 og B-HH3 ved sine delvis humane CDR1- og CDR2-regioner (Kabat-definisjon), samt Ala/Thr-polymorfismen i stilling 28 (Kabat-nummerering). Dette tyder på at enten stilling 28, den fullstendige CDR1 og/eller den fullstendige CDR2 er viktig for antistoff/antigen-interaksjon.

[0067] Fig. 12. Sammenlikning av B-HL1, B-HH1 og B-ly1-parental-

antistoffet. Dataene viste fravær av en hver bindingsaktivitet i B-HL1-konstruksjonen, og omtrent halvdelen av bindingsintensiteten/støkiometrien for B-HH1 sammenliknet med B-ly1. Både B-HL1 og B-HH1 er utformet basert på akseptor-rammeverk som stammer fra den humane VH1-klasse. Blant andre forskjeller er stilling 71 (Kabat-nummerering) i B-HL1-konstruksjonen en slående forskjell, noe som tyder på dens putative betydning for antigenbinding.

[0068] Fig. 13. Fluorcytometrisk analyse av kapasiteten hos anti-CD20-antistoffet overfor sitt antigen. Dataene viste at B-HL2- og B-HL3-konstruksjonene ikke viser CD20-bindingsaktivitet.

[0069] Fig. 14. Apoptose av anti-CD20-antistoffer på Z-138 MCL-celler.

[0070] Fig. 15. Apoptose ved anti-CD20-antistoffer. Analysedetaljer: 5 x 10^5 celler pr. brønn ble utsådd i 24-brønnsplater (5 x 10^5 celler pr. ml) i dyrkningsmedium. 10 mg av de respektive Ab, PBS for den negative kontroll eller 5 mM kamptotecin (CPT)-positive kontroll ble tilsatt i brønnene. Prøvene ble inkubert natten over (16 timer), merket med AnnV-FITC og analysert ved hjelp av FACS. Analyser ble utført in triplo (*): Signal for PBS alene subtrahert (PBS alene ga 8% og 2% AnnV+ for henholdsvis PR-1- og Z-138-celler). Anvendte antistoffer var: C2B8 (kimæriske, ikke glyko-omarbeidede); BHH2-KV1 (humaniserte, ikke glyko-omarbeidede). Bemerk: denne analyse innbefatter ikke noen ytterligere effektorceller, bare målceller pluss antistoff eller kontroller.

[0071] Fig. 16. Målcelledreping ved anti-CD20-antistoffer med immuneffektorceller. Analysedetaljer: B-celle-uttømming i normalt fullblod inkubering natten over og analyse med henblikk på CD19+/CD3+ ved FACS. ADOC ved anvendelse av PBMC som effektorer, 4 timers inkubering, 25:1 effektor:mål-forhold, måldreping målt ved Calcein-retensjon i forhold til detergent-lyse (100%) og lyse uten Ab (0%). Anvendte antistoffer: C2B8 (kimærisk, ikke glyko-omarbeidet form); BHH2-KV1-wt (humanisert, ikke glyko-omarbeidet form av BHH2-KV1); BHH2:KV1-GE (humanisert, glyko-omarbeidet form av BHH2-KV1).

[0072] Fig. 17. MALDI/TOF-MS-profil av PNGaseF-frigjorte Fc-oligosakkarider av ikke-modifisert, ikke glyko-omarbeidet BHH2-KV1 humanisert IgG1 B-ly1 antihumant CD20-antistoff.

[0073] Fig. 18. MALDI/TOF-MS-profil av PNGaseF-frigjorte Fc-oligosakkarider av glyko-omarbeidet BHH2-KV1g1 humanisert IgG1 B-ly1

antihumant CD20-antistoff. Glyko-omarbeiding utført ved koekspresjon i vertsceller av antistoffgener og gen som koder for enzym med β-1,4-N-acetylglukosaminyltransferase III (GnT-III)-katalytisk aktivitet.

[0074] Fig. 19. MALDI/TOF-MS-profil av PNGaseF-frigjorte Fc-oligosakkarider av glyko-omarbeidet BHH2-KV1g2 humanisert IgG1 B-ly1 antihumant CD20-antistoff. Glyko-omarbeiding utført ved koekspresjon i vertsceller av antistoffgener og gen som koder for enzym med β-1,4-N-acetylglukosaminyltransferase III (GnT-III)-katalytisk aktivitet og koder for enzym med Golgi α-mannosidase II-katalytisk aktivitet.

[0075] Fig. 20. Binding av ikke glyko-omarbeidede og glyko-omarbeidede antistoffer til human FcgammaRIIIa-reseptor som viser seg på overflaten av rekombinante CHO-CD16-celler.

[0076] Fig. 21. Apoptose av ikke-Fc-omarbeidede og Fc-omarbeidede anti-CD20-antistoffer på Z-138 MCL-celler. Analysedetaljer: 5 x 10^5 celler pr. brønn ble utsådd i 24 brønns plater (5 x 10^5 celler pr. ml) i dyrkningsmedium. 10 mg av det respektive Ab, PBS for den negative kontroll ble tilsatt i brønnene. Prøvene ble inkubert natten over (16 timer), merket med AnnV-FITC og analysert ved hjelp av FACS. Analyse ble utført in triplo. Ab anvendt: C2B8 = rituximab (kimærisk, ikke glyko-omarbeidet form, samme som kommersiell form); BHH2-KV1 (humanisert, ikke glyko-omarbeidet - se fig. 6 for glykosyleringsprofil); BHH2-KV1g1 (humanisert, glyko-omarbeidet - se fig. 7 for glykosyleringsprofil; BHH2-KV1g2 (humanisert, glyko-omarbeidet - se fig. 8 med hensyn til glykosyleringsprofil). Bemerk: denne analyse innbefatter ikke noen ytterligere effektorceller, kun målceller pluss antistoff eller kontroller. (*): Signal for PBS alene subtrahert.

[0077] Betegnelser er anvendt her i dokumentet slik de vanligvis anvendes på området, dersom ikke annet er definert, som følger.

[0078] Anvendt her i dokumentet er betegnelsen *antistoff* ment å innbefatte hele antistoffmolekyler, innbefattende monoklonale, polyklonale og multispesifikke (f.eks. bispesifikke) antistoffer, samt antistoff-fragmenter med Fc-regionen og som bibeholder bindingsspesifisitet, og fusjonsproteiner som innbefatter en region ekvivalent med Fc-regionen av et immunglobulin og som bibeholder bindingsspesifisitet. Humaniserte, primatiserte og kimæriske antistoffer er også innbefattet.

[0079] Anvendt her i dokumentet er betegnelsen *Fc-region* ment å angi en

C-terminal region av en IgG-tungkjede. Skjønt grensene for Fc-regionen av en IgG-tungkjede kan variere litt, er den humane IgG-tungkjede-Fc-region vanligvis definert som å strekke seg fra aminosyreresten i stilling Cys226 til den karboksylterminale ende.

[0080] Anvendt her i dokumentet er betegnelsen *region ekvivalent med Fc-regionen av et immunglobulin* ment å innbefatte naturlig forekommende allele varianter av Fc-regionen av et immunglobulin samt varianter med forandringer som frembringer substitusjoner, addisjoner eller delesjoner, men som ikke i noen vesentlig grad reduserer immunglobulinets evne til å mediere effektorfunksjoner (så som antistoffavhengig cellulær cytotoksisitet). For eksempel kan én eller flere aminosyrer utelukkes fra den N-terminale eller C-terminale ende av Fc-regionen av et immunglobulin uten vesentlig tap av biologisk funksjon. Slike varianter kan velges i henhold til generelle regler kjent på området, for å ha minimal effekt på aktiviteten. (Se f.eks. Bowie, J.U. et al., *Science* 247:1306-10 (1990).

[0081] Anvendt her i dokumentet angir betegnelsen *antigenbindende molekyl* i sin videste betydning et molekyl som spesifikt binder en antigen determinant. Mer spesifikt er et *antigenbindende molekyl som binder CD20*, et molekyl som spesifikt bindes til et ikke-glykosylert celleoverflate-fosfoprotein på 35 000 dalton, typisk betegnet som det humane B-lymfocytt-begrensede differensieringsantigen Bp35, vanligvis omtalt som CD20. Med "spesifikt binder" menes at bindingen er selektiv for antigenet og kan skjelnes fra uønskede eller ikke-spesifikke interaksjoner.

[0082] Anvendt her i dokumentet angir betegnelsene *fusjon* og *kimærisk*, anvendt med henvisning til polypeptider så som ABM, polypeptider omfattende aminosyresekvenser som stammer fra to eller flere heterologe polypeptider, så som deler av antistoffer fra forskjellige arter. Når det for eksempel gjelder kimæriske ABM, kan de ikke-antigenbindende komponenter stamme fra mange forskjellige arter, innbefattende primater så som sjimpanser og mennesker. Den konstante region av det kimæriske ABM er mest foretrukket hovedsakelig identisk med den konstante region av et naturlig humant antistoff; den variable region av det kimæriske antistoff er mest foretrukket hovedsakelig identisk med den variable region av et rekombinant anti-CD20-antistoff med aminosyresekvens som hos den variable muse-B-Ly1-region. Humaniserte antistoffer er en spesielt foretrukket form av fusjons- eller kimærisk antistoff.

[0083] Anvendt her i dokumentet angir *et polypeptid med "GnTIII-aktivitet"* polypeptider som kan katalysere addisjonen av en N-acetylglykosamin- (GlcNAc-) rest i β-1-4-binding til det β-bundne mannosid i trimannosylkjernen av N-bundne oligosakkarider. Dette innbefatter fusjonspolypeptider som oppviser enzymatisk aktivitet i likhet med, men ikke nødvendigvis identisk med, aktiviteten av β(1,4)-N-acetylglukosaminyltransferase III, også kjent som β-1,4-mannosylglykoprotein 4-beta-N-acdetylglukosaminyl-transferase (EC 2.4.1.144), i henhold til Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) målt i en spesiell biologisk analyse, med eller uten doseavhengighet. I det tilfelle hvor doseavhengighet finnes, behøver det ikke være identisk med doseavhengigheten hos GnTIII, men heller hovedsakelig lik doseavhengigheten i en gitt aktivitet sammenliknet med GnTIII (dvs. at kandidat-polypeptidet vil oppvise større aktivitet eller ikke mer enn ca. 25 ganger mindre, og fortrinnsvis ikke mer enn ca. ti ganger mindre aktivitet, og mest foretrukket ikke mer enn ca. tre ganger mindre aktivitet i forhold til GnTIII).

[0084] Anvendt her i dokumentet angir betegnelsen *variant* (eller *analog*) et polypeptid som er forskjellig fra et spesifikt angitt polypeptid ifølge oppfinnelsen ved aminosyreinnsettinger, -delesjoner og -substitusjoner, frembrakt ved anvendelse av f.eks. rekombinante DNA-teknikker. Varianter av ABM ifølge foreliggende oppfinnelse innbefatter kimæriske, primatiserte eller humaniserte antigenbindende molekyler hvor én eller flere av aminosyrerestene er modifisert ved substitusjon, addisjon og/eller delesjon på en slik måte at det ikke i noen vesentlig grad påvirker antigen- (f.eks. CD20-) bindende affinitet. Rettledning med hensyn til bestemmelse av hvilken aminosyrerest som kan erstattes, adderes eller utelukkes uten at aktuelle aktiviteter oppheves, kan finnes ved sammenlikning av sekvensen for det spesielle polypeptid med sekvensen for homologe peptider, og minimalisering av antallet aminosyresekvensforandringer utført i regioner med høy homologi (konserverte regioner), eller ved erstatting av aminosyrer med konsensussekvens.

[0085] Alternativt kan rekombinante varianter som koder for disse samme eller liknende polypeptider, syntetiseres eller utvelges ved at det gjøres bruk av "overflødigheten" i den genetiske kode. Forskjellige kodonsubstitusjoner, så som de stumme forandringer som frembringer forskjellige restriksjonsseter, kan innføres for optimalisering av kloning i et plasmid eller en virusvektor, eller

ekspresjon i et spesielt prokaryot eller eukaryot system. Mutasjoner i polynukleotidsekvensen kan gjenspeiles i polypeptidet eller doménene av andre peptider som er tilføyd til polypeptidet, for modifisering av egenskapene hos hvilken som helst del av polypeptidet, under forandring av karakteregenskaper så som ligandbindende affiniteter, interkjedeaffiniteter eller nedbrytnings/turnover-hastighet.

[0086] Aminosyre-"substitusjoner" er fortrinnsvis et resultat av erstatting av én aminosyre med en annen aminosyre med liknende strukturelle og/eller kjemiske egenskaper, dvs. konserverende aminosyre-erstatninger. "Konserverende" aminosyresubstitusjoner kan gjøres på basis av likhet med hensyn til polaritet, ladning, løselighet, hydrofobitet, hydrofilitet og/eller den amfipatiske beskaffenhet av de rester som inngår. For eksempel innbefatter ikke-polare (hydrofobe) aminosyrer alanin, leucin, isoleucin, valin, prolin, fenylalanin, tryptofan og metionin; polare nøytrale aminosyrer innbefatter glycin, serin, treonin, cystein, tyrosin, asparagin og glutamin; positivt ladde (basiske) aminosyrer innbefatter arginin, lysin og histidin; og negativt ladde (sure) aminosyrer innbefatter asparaginsyre og glutaminsyre. "Innsettinger" eller "utelukkelser" er fortrinnsvis i området ca. 1-20 aminosyrer, mer foretrukket 1-10 aminosyrer. Den tillatte variasjon kan bestemmes eksperimentelt ved at det systematisk foretas innsettinger, utelukkelser eller substitusjoner av aminosyrer i et polypeptidmolekyl ved anvendelse av rekombinante DNA-teknikker og analysering av de resulterende rekombinante varianter med henblikk på aktivitet.

[0087] Anvendt her i dokumentet er betegnelsen *humanisert* anvendt for henvisning til et antigenbindende molekyl som stammer fra et ikke-humant antigenbindende molekyl, for eksempel et museantistoff, som bibeholder eller i det vesentlige bibeholder de antigenbindende egenskaper hos opphavsmolekylet, men som er mindre immunogent i mennesker. Dette kan oppnås ved forskjellige metoder innbefattende (a) poding av hele de ikke-humane variable doméner på humane konstante regioner under frembringelse av kimæriske antistoffer, (b) poding av bare de ikke-humane CDR på humane rammeverk- og konstante regioner med eller uten tilbakeholdelse av kritiske rammeverkrester (f.eks. slike som er viktige for bibeholdelse av gode antigenbindende affinitets- eller antistoff-funksjoner), eller (c) transplantering av hele de ikke-humane variable doméner, men "tilsløring" av dem med en

humanliknende del ved erstatting av overflaterester. Slike metoder er beskrevet i Jones et al., Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.,* 81:6851-6855 (1984); Morrison og Oi, *Adv. Immunol.,* 44:65-92 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.,* 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.,* 31(3):169-217 (1994), som alle i sin helhet er medtatt her i dokumentet som referanse. Det er generelt 3 komplementaritetsbestemmende regioner, eller CDR, (CDR1, CDR2 og CDR3) i hver av de variable tung- og lettkjededoméner av et antistoff, som er flankert av fire rammeverk-subregioner (dvs. FR1, FR2, FR3 og FR4) i hver av de variable tung- og lettkjededoméner av et antistoff: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. En omtale av humaniserte antistoffer kan blant annet finnes i US-patent nr. 6 632 927, og i publisert US-patentsøknad nr. 2003/0175269, som begge i sin helhet er medtatt her i dokumentet som referanse.

[0088] Anvendt her i dokumentet er likeledes betegnelsen *primatisert* anvendt for henvisning til et antigenbindende molekyl som stammer fra et antigenbindende ikke-primat-molekyl, for eksempel et museantistoff, som bibeholder eller i det vesentlige bibeholder de antigenbindende egenskaper hos opphavsmolekylet, men som er mindre immunogent i primater.

[0089] I det tilfelle hvor det er to eller flere definisjoner av en betegnelse som anvendes og/eller er akseptert på området, er definisjonen av betegnelsen anvendt her i dokumentet ment å innbefatte alle slike betydninger dersom ikke det motsatte er uttrykkelig angitt. Et spesifikt eksempel er bruken av betegnelsen "komplementaritetsbestemmende region" ("CDR") til beskrivelse av de ikke på hverandre følgende antigenkombinerende seter som finnes i den variable region av både tung- og lettkjede-polypeptider. Denne spesielle region er beskrevet av Kabat et al., U.S. Dept. of Health og Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) og av Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), som er medtatt her i dokumentet som referanse, hvor definisjonene innbefatter overlappende eller subsett av aminosyrerester sammenliknet med hverandre. Ikke desto mindre er anvendelse av én av definisjonene til å omtale en CDR av et antistoff eller varianter derav ment å være innenfor rammen for betegnelsen som definert og anvendt her i dokumentet. De passende aminosyrerester som omfatter CDR som definert ved hver av de ovenfor angitte referanser, er angitt nedenfor i tabell I som sammenlikning. De nøyaktige

restnumre som omfatter en bestemt CDR, vil variere avhengig av sekvensen og størrelsen av CDR. Fagfolk på området kan rutinemessig bestemme hvilke rester som omfatter en bestemt CDR på bakgrunn av aminosyresekvensen for den variable region av antistoffet.

TABELL 1. CDR-definisjoner[1]

	Kabat	Chothia	AbM
V_H CDR1	31-35	26-32	26-35
V_H CDR2	50-65	52-58	50-58
V_H CDR3	95-102	95-102	95-102
V_L CDR1	24-34	26-32	
V_L CDR2	50-56	50-52	
V_L CDR3	89-97	91-96	

[1]Nummerering av alle CDR-definisjoner i tabell 1 i henhold til nummereringskonvensjonene angitt av Kabat et al. (se nedenfor).

[0090] Kabat et al. definerte også et nummereringssystem for sekvenser av variable doméner, som er anvendelig for hvilket som helst antistoff. En vanlig fagperson på området kan utvetydig tilordne dette system med "Kabat-nummerering" til hvilken som helst sekvens for variabelt doméne, uten å basere seg på noen forsøksdata ut over selve sekvensen. Avnendt her i dokumentet angir "Kabat-nummerering" nummereringssystemet angitt av Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). Dersom ikke annet er spesifisert, er henvisninger til nummereringen av spesifikke aminosyrereststillinger i et ABM i henhold til Kabat-nummereringssystemet. Sekvensene i sekvenslisten (dvs. SEKV ID NR: 1 til SEKV ID NR: 78) er ikke nummerert i henhold til Kabat-nummereringssystemet.

[0091] Med en nukleinsyre eller et polynukleotid med en nukleotidsekvens som er for eksempel minst 95% "identisk" med en referanse-nukleotidsekvens ifølge foreliggende oppfinnelse menes at nukleotidsekvensen i polynukleotidet er identisk med referansesekvensen, bortsett fra at polynukleotidsekvensen kan innbefatte opp til fem punktmutasjoner pr. 100 nukleotider i referanse-nukleotidsekvensen. Med andre ord kan opp til 5% av nukleotidene i referansesekvensen utelukkes eller substitueres med et annet nukleotid for oppnåelse av et polynukleotid med en nukleotidsekvens som er minst 95% identisk med en referanse-nukleotidsekvens, eller et antall nukleotider på opp til 5% av den totale mengde nukleotider i referansesekvensen kan innføres i

referansesekvensen. Søkesekvensen kan være hele sekvensen vist enten på fig. 24 eller fig. 25.

[0092] I praksis kan det bestemmes om hvorvidt hvilket som helst spesielt nukleinsyremolekyl eller polypeptid er minst 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% eller 99% identisk med en nukleotidsekvens eller polypeptid-sekvens ifølge foreliggende oppfinnelse, på konvensjonell måte ved anvendelse av kjente datamaskinprogrammer. En foretrukket metode for bestemmelse av den beste totale samstemmighet mellom en søkesekvens (en sekvens ifølge foreliggende oppfinnelse) og en aktuell sekvens, også omtalt som en global sekvensinnretting, kan bestemmes ved anvendelse av FASTDB-datamaskin-programmet basert på algoritmen ifølge Brutlag et al., *Comp. App. Biosci.* 6:237-245 (1990). I en sekvensoppstilling er både søkesekvensen og de aktuelle sekvenser DNA-sekvenser. En RNA-sekvens kan sammenliknes ved omdannelse av U til T. Resultatet av den globale sekvensoppstilling er prosent identitet. Foretrukne parametere anvendt i en FASTDB-oppstilling av DNA-sekvenser for beregning av prosent identitet er: Matriks=Enhetlig, k-tuppel=4, Mismatch-fradrag (-"penalty")=1, Kombinasjons-("joining")-fradrag=30, Randomiserings-gruppelengde=0, Forkortnings-("cut off")-poeng=1, Mellomromsfradrag=5, Mellomromsstørrelse-fradrag 0,05, Vindusstørrelse=500 eller lengden av den aktuelle nukleotidsekvens, avhengig av hvilken som er den korteste.

[0093] Hvis den aktuelle sekvens er kortere enn søkesekvensen på grunn av 5'- eller 3'-delesjoner, ikke på grunn av indre delesjoner, må det utføres en manuell korrigering av resultatene. Dette er på grunn av at FASTDB-programmet ikke svarer for 5'- og 3'-avkortninger av den aktuelle sekvens ved beregning av prosent identitet. Når det gjelder aktuelle sekvenser som er avkortet i 5'- eller 3'-endene, i forhold til søkesekvensen, korrigeres prosent identitet ved beregning av antallet baser i søkesekvensen som er 5' og 3' i forhold til den aktuelle sekvens, som ikke er samsvarige/innrettet på linje, som prosent av de totale baser i søkesekvensen. Om et nukleotid er samsvarig/innrettet bestemmes ved resultatene av FASTDB-sekvensinnrettingen. Denne prosentandel blir så trukket fra prosent identitet, beregnet ved ovennevnte FASTDB-program ved anvendelse av de spesifiserte parametere, under opppnåelse av et endelig prosent identitets-poengtall. Dette korrigerte poengtall er det som anvendes for foreliggende oppfinnelses formål. Bare baser utenfor 5'- og 3'-basene i den aktuelle sekvens,

vist ved FASTDB-innrettingen, som ikke er samsvarige/innrettet med søkesekvensen, beregnes for det formål å justere prosent identitetspoeng manuelt.

[0094] For eksempel blir en aktuell sekvens på 90 baser innrettet med en 100 basers søkesekvens for bestemmelse av prosent identitet. Delesjonene finnes i 5'-enden av den aktuelle sekvens, og derfor viser ikke FASTDB-innrettingen samsvar/innretting av de første 10 baser i 5'-enden. De 10 uparede baser representerer 10% av sekvensen (antall baser i 5'- og 3'-endene som ikke samsvarer/totalt antall baser i søkesekvensen) slik at 10% trekkes fra prosent identitet-poengtallet beregnet ved FASTDB-programmet. Hvis de gjenværende 90 baser var fullkomment tilpasset, ville den endelige prosent identitet være 90%. I et annet eksempel sammenliknes en 90 basers aktuell sekvens med en 100 basers søkesekvens. Denne gang er delesjonene indre delesjoner slik at det ikke er noen baser på 5' eller 3' av den aktuelle sekvens som ikke er tilpasset/innrettet med søkesekvensen. I dette tilfelle blir ikke prosent identitet beregnet ved FASTDB manuelt korrigert. Enda en gang blir bare baser 5' og 3' i den aktuelle sekvens som ikke er tilpasset/innrettet med søkesekvensen, korrigert manuelt. Ingen andre manuelle korrigeringer gjøres for foreliggende oppfinnelses formål.

[0095] Med et polypeptid med en aminosyresekvens som for eksempel er minst 95% "identisk" med en søke-aminosyresekvens ifølge foreliggende oppfinnelse, er det ment at aminosyresekvensen i det aktuelle polypeptid er identisk med søkesekvensen, bortsett fra at den aktuelle polypeptidsekvens kan innbefatte opp til fem aminosyreforandringer pr. 100 aminosyrer i søke-aminosyresekvensen. For oppnåelse av et polypeptid med en aminosyresekvens som er minst 95% identisk med en søke-aminosyresekvens kan, med andre ord, opp til 5% av aminosyrerestene i den aktuelle sekvens innsettes, utelukkes eller erstattes med en annen aminosyre. Disse forandringer av referansesekvensen kan skje i de amino- eller karboksyterminale stillinger av referanse-aminosyre-sekvensen eller hvor som helst mellom disse terminale stillinger, spredt enten individuelt blant rester i referansesekvensen, eller i én eller flere på hverandre følgende grupper i referansesekvensen.

[0096] I praksis kan det bestemmes om hvorvidt hvilket som helst bestemt polypeptid er minst 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% eller 99% identisk med et referanse-polypeptid, konvensjonelt ved anvendelse av kjente datamaskin-

programmer. En foretrukket metode for bestemmelse av det beste totale samsvar mellom en søkesekvens (en sekvens ifølge foreliggende oppfinnelse) og en aktuell sekvens, også omtalt som en global sekvensinnretting, kan bestemmes ved anvendelse av FASTDB-datamaskinprogrammet basert på algoritmen ifølge Brutlag et al., *Comp. App. Biosci.* 6:237-245 (1990). Ved en sekvensinnretting er både søkesekvensen og den aktuelle sekvens enten nukleotidsekvenser eller aminosyresekvenser. Resultatet av den globale sekvensinnretting er prosent identitet. Foretrukne parametere anvendt i en FASTDB-aminosyreinnretting er: Matriks=PAM 0, k-tuppel=2, Umake-fradrag = 1, Kombinasjonsfradrag=20, Randomiserings-gruppelengde=0, Forkortningspoeng=1, Vindusstørrelse= sekvenslengde, Mellomromsfradrag=5, Mellomromsstørrelse-fradrag 0,05, Vindusstørrelse=500 eller lengden av den aktuelle aminosyre, avhengig av hvilken som er den korteste.

[0097] Hvis den aktuelle sekvens er kortere enn søkesekvensen på grunn av N- eller C-terminale delesjoner, ikke på grunn av indre delesjoner, må det foretas en manuell korrigering av resultatene. Dette er på grunn av av FASTDB-programmet ikke gjør rede for N- og C-terminale avkortninger av den aktuelle sekvens ved beregning av global prosent identitet. Når det gjelder aktuelle sekvenser som er avkortet ved den N- og C-terminale ende, i forhold til søkesekvensen, blir prosent identitet korrigert ved beregning av antallet rester i søkesekvensen som er N- og C-terminale i forhold til den aktuelle sekvens, som ikke er samsvarige/innrettet med en tilsvarende aktuell rest, som prosent av de totale baser i søkesekvensen. Om en rest er samsvarig/innrettet bestemmes ved resultatene av FASTDB-sekvensinnrettingen. Denne prosentandel blir så trukket fra prosent identitet, beregnet ved ovennevnte FASTDB-program under anvendelse av de spesifiserte parametere, under oppnåelse av en endelig prosent identitetspoengverdi. Denne endelige prosent identitetspoengverdi er det som anvendes for foreliggende oppfinnelses formål. Bare rester til de N- og C-terminale ender av den aktuelle sekvens, som ikke er samsvarige/innrettet med søkesekvensen, tas i betraktning for manuell justering av prosent identitetspoeng-verdi. Det vil si bare søke-reststillingen utenfor de fjerneste N- og C-terminale rester i den aktuelle sekvens.

[0098] For eksempel blir en 90 aminosyreresters aktuell sekvens innrettet på linje med en 100 resters søkesekvens for bestemmelse av prosent identitet.

Delesjonen finner sted i den N-terminale ende av den aktuelle sekvens, og derfor viser ikke FASTDB-innrettningen et samsvar/innretting av de første 10 rester i den N-terminale ende. De 10 uparede rester representerer 10% av sekvensen (antall rester i den N- og C-terminale ende som ikke er samsvarige/totalt antall rester i søkesekvensen) slik at 10% trekkes fra prosent identitet-poengverdien beregnet ved FASTDB-programmet. Hvis de gjenværende 90 rester var fullkomment samstemmige, ville den endelige prosent identitet være 90%. Ved et annet eksempel sammenliknes en 90 resters aktuell sekvens med en 100 resters søkesekvens. Denne gang er delesjonene indre delesjoner slik at det ikke er noen rester i den N- eller C-terminale ende av den aktuelle sekvens som ikke er samsvarige/innrettet med søkesekvensen. I dette tilfelle blir prosent identitet beregnet ved FASTDB ikke manuelt korrigert. Enda en gang blir bare reststillinger utenfor de N- og C-terminale ender av den aktuelle sekvens, vist i FASTDB-innrettingen, som ikke er samsvarige/innrettet med søkesekvensen, manuelt korrigert for. Ingen andre manuelle korrigeringer skal gjøres for foreliggende oppfinnelses formål.

[0099] Anvendt her i dokumentet angir en nukleinsyre som "*hybridiserer under stringente betingelser*" til en nukleinsyresekvens ifølge oppfinnelsen, et polynukleotid som hybridiserer i en inkubering natten over ved 42°C i en løsning omfattende 50% formamid, 5 x SSC (750 mM NaCl, 75 mM natriumcitrat), 50 mM natriumfosfat (pH 7,6), 5x Denhardts løsning, 10% dekstransulfat og 20 μg/ml denaturert, kuttet ("sheared") laksespermie-DNA, fulgt av vasking av filtrene i 0,1x SSC ved ca. 65°C.

[0100] Anvendt her i dokumentet angir betegnelsen *Golgi-lokalisasjons-doméne* aminosyresekvensen i et Golgi-residerende polypeptid som er ansvarlig for forankring av polypeptidet på lokasjonen i Golgi-komplekset. Lokalisasjons-doméner omfatter generelt aminoterminale "haler" av et enzym.

[0101] Anvendt her i dokumentet angir betegnelsen *effektorfunksjon* de biologiske aktiviteter som kan tilskrives Fc-regionen (en nativ sekvens-Fc-region eller aminosyresekvens-variant-Fc-region) av et antistoff. Eksempler på antistoff-effektorfunksjoner innbefatter, men er ikke begrenset til, Fc-reseptorbindings-affinitet, antistoffavhengig cellulær cytotoksisitet (ADCC), antistoffavhengig cellulær fagocytose (ADCP), cytokinutskillelse, immun-kompleksmediert antigenopptak ved antigenpresenterende celler, nedregulering av

celleoverflatereseptorer, osv.

[0102] Anvendt her i dokumentet betraktes betegnelsene *omarbeide, omarbeidet, omarbeiding og glykosyleringsomarbeiding* som å innbefatte en hver manipulering av glykosyleringsmønsteret for et naturlig forekommende eller rekombinant polypeptid eller fragment derav. Glykosyleringsomarbeiding innbefatter metabolsk omarbeiding av en celles glykosyleringsmaskineri, innbefattende genetiske manipuleringer av oligosakkarid-synteseveiene under oppnåelse av forandret glykosylering av glykoproteiner som uttrykkes i celler. Videre innbefatter glykosyleringsomarbeiding virkningene av mutasjoner og cellemiljøet på glykosyleringen.

[0103] Anvendt her i dokumentet dekker betegnelsen *vertscelle* hver cellesystemtype som kan omarbeides til å frembringe polypeptidene og de antigenbindende molekyler ifølge foreliggende oppfinnelse. Ved én utførelsesform blir vertscellen omarbeidet til å muliggjøre dannelse av et antigenbindende molekyl med modifiserte glykoformer. Ved en foretrukket utførelsesform er det antigenbindende molekyl et antistoff, antistoff-fragment eller fusjonsprotein. Ved visse utførelsesformer er vertscellene blitt ytterligere manipulert til å uttrykke økte nivåer av ett eller flere polypeptider med GnTIII-aktivitet. Vertsceller innbefatter dyrkede celler, f.eks. dyrkede pattedyrceller, så som CHO-celler, BHK-celler, NS0-celler, SP2/0-celler, YO-myelomceller, P3X63-musemyelomceller, PER-celler, PER.C6-celler eller hybridomceller, gjærceller, insektceller og planteceller, for bare å nevne noen få, men også celler som finnes i et transgent dyr, en transgen plante eller et dyrket plante- eller dyrevev.

[0104] Anvendt her i dokumentet innbefatter betegnelsen *Fc-mediert cellulær cytotoksisitet* antistoffavhengig cellulær cytotoksisitet og cellulær cytotoksisitet mediert ved et løselig Fc-fusjonsprotein inneholdende en human Fc-region. Det er en immunmekanisme som fører til lyse av "antistoff-målsøkte celler" ved "humane immuneffektorceller", hvor:

[0105] De *humane immuneffektorceller* er en populasjon av leukocytter som viser Fc-reseptorer på sin overflate gjennom hvilke de bindes til Fc-regionen av antistoffer eller av Fc-fusjonsproteiner, og utfører effektorfunksjoner. En slik populasjon kan innbefatte, men er ikke begrenset til, mononukleære celler fra perifert blod (PBMC) og/eller naturlige dreper-(NK-) celler.

[0106] De *antistoff-målsøkte celler* er celler som er bundet av antistoffene

eller Fc-fusjonsproteinene. Antistoffene eller Fc-fusjonsproteinene bindes til målceller via proteindelen som er N-terminal i forhold til Fc-regionen.

[0107] Anvendt her i dokumentet er betegnelsen *økt Fc-mediert cellulær cytotoksisitet* definert som enten en økning i antallet "antistoff-målsøkte celler" som lyseres innen en gitt tid, ved en gitt konsentrasjon av antistoff eller av Fc-protein, i mediet som omgir målcellene, ved mekanismen for Fc-mediert cellulær cytotoksisitet definert ovenfor, og/eller en reduksjon i konsentrasjonen av antistoff, eller av Fc-fusjonsprotein, i mediet som omgir målcellene, som trenges for oppnåelse av lyse av et gitt antall "antistoff-målsøkte celler" i et gitt tidsrom, ved mekanismene for Fc-mediert cellulær cytotoksisitet. Økningen i Fc-mediert cellulær cytotoksisitet er i forhold til den cellulære cytotoksisitet som medieres ved det samme antistoff eller Fc-fusjonsprotein, frembrakt ved den samme type vertsceller, under anvendelse av de samme standardfrembringelses-, -rense-, -formulerings- og -lagringsmetoder, som er kjent for fagfolk på området, men som ikke er blitt frembrakt av vertsceller som er omarbeidet til å uttrykke glykosyltransferasen GnTIII ved metodene beskrevet her i dokumentet.

[0108] Med *antistoff med økt antistoffavhengig cellulær cytotoksisitet (ADCC)* menes et antistoff, slik denne betegnelse er definert her i dokumentet, med økt ADCC ifølge bestemmelse ved hvilken som helst egnet metode kjent for vanlige fagfolk på området. Én akseptert in vitro-ADCC-analyse er som følger:

1) analysen anvender målceller som er kjent for å uttrykke målantigenet som gjenkjennes av den antigenbindende region av antistoffet;

2) analysen anvender humane mononukleære celler fra perifert blod (PBMC), isolert fra blod fra vilkårlig valgt frisk donor, som effektorceller;

3) analysen utføres i henhold til følgende protokoll:

i) PBMC isoleres under anvendelse av standard-densitets-sentrifugeringsmetoder og oppslemmes med 5 x 10^6 celler pr. ml i RPMI-celledyrkningsmedium;

ii) målcellene dyrkes ved standard-vevsdyrkningsmetoder, høstes fra den eksponensielle vekstfase med en levedyktighet høyere enn 90%, vaskes i RPMI-celledyrkningsmedium, merkes med 100 µCi ^{51}Cr, vaskes to ganger med celledyrkningsmedium og gjenoppslemmes i celledyrkningsmedium med en tetthet på 10^5 celler pr. ml;

iii) 100 mikroliter av den endelige målcellesuspensjon ovenfor

overføres til hver brønn i en 96 brønns mikrotiterplate;

iv) antistoffet seriefortynnes fra 4000 ng/ml til 0,04 ng/ml i celledyrkningsmedium, og 50 mikroliter av de resulterende antistoffløsninger tilsettes til målcellene i 96 brønns mikrotiterplaten, under in triplo-testing av forskjellige antistoffkonsentrasjsoner som dekker hele konsentrasjonsområdet ovenfor;

v) for maksimal frigjørings-(MR)-kontrollene får 3 ytterligere brønner i platen som inneholder de merkede målceller, 50 mikroliter av en 2% (på volumbasis) vandig løsning av ikke-ionisk detergent (Nonidet, Sigma, St. Louis), i stedet for antistoffløsningen (punkt iv ovenfor).

vi) for spontan frigjørings-(SR)-kontrollene får 3 ytterligere brønner i platen inneholdende de merkede målceller 50 mikroliter RPMI-celledyrknings-medium i stedet for antistoffløsningen (punkt iv ovenfor);

vii) 96 brønns mikrotiterplaten blir så sentrifugert ved 50 x g i 1 minutt og inkuberes i 1 time ved 4°C;

viii) 50 mikroliter av PBMC-suspensjonen (punkt i ovenfor) tilsettes i hver brønn under frembringelse av et effektor:målcelle-forhold på 25:1, og platene anbringes i en inkubator under 5% CO_2-atmosfære ved 37°C i 4 timer;

ix) den cellefrie supernatant fra hver brønn høstes, og den eksperimentelt frigjorte radioaktivitet (ER) kvantifiseres under anvendelse av en gammateller;

x) prosentandelen av spesifikk lyse beregnes for hver antistoff-konsentrasjon i henhold til formelen (ER-MR)/(MR-SR) x 100, hvor ER er den gjennomsnittlige kvantifiserte radioaktivitet (se punkt ix ovenfor) for denne antistoffkonsentrasjon, MR er den gjennomsnittlige kvantifiserte radioaktivitet (se punkt ix ovenfor) for MR-kontrollene (se punkt v ovenfor), og SR er den gjennomsnittlige kvantifiserte radioaktivitet (se punkt ix ovenfor) for SR-kontrollene (se punkt vi ovenfor);

4) "øket ADCC" er definert som enten en økning i den maksimale prosentandel av spesifikk lyse observert i antistoffkonsentrasjonsområdet testet ovenfor, og/eller en reduksjon i konsentrasjonen av antistoff som trenges for oppnåelse av halvdelen av den maksimale prosentandel av spesifikk lyse observert i antistoffkonsentrasjonsområdet testet ovenfor. Økningen i ADCC er i forhold til ADCC, målt med ovennevnte analyse, som medieres ved det samme

antistoff, frembrakt ved den samme type vertsceller, under anvendelse av de samme standardfrembringelses-, -rense-, -formulerings- og -lagringsmetoder, som er kjent for fagfolk på området, men som ikke er blitt frembrakt av vertsceller som er omarbeidet til å overuttrykke GnTIII.

[0109] Ved ett aspekt angår foreliggende oppfinnelse antigenbindende molekyler med bindingsspesifisitet som hos muse-B-Ly1-antistoffet, og oppdagelsen av at deres effektorfunksjoner kan forbedres ved forandret glykosylering. Ved én utførelsesform er det antigenbindende molekyl et kimærisk antistoff. Ved en foretrukket utførelsesform er oppfinnelsen rettet mot et kimærisk antistoff, eller et fragment derav, omfattende CDR vist på fig. 7. Spesifikt er oppfinnelsen ved en foretrukket utførelsesform rettet mot et isolert polynukleotid omfattende: (a) en sekvens valgt fra en gruppe bestående av: SEKV ID NR:5, SEKV ID NR: 6 og SEKV ID NR: 7. (CDR V_{H-1}); og (b) en sekvens valgt fra en gruppe bestående av: SEKV ID NR:21, SEKV ID NR: 22 og SEKV ID NR: 23. (CDR V_{H-2}; og SEKV ID NR: 24. Ved en annen foretrukket utførelsesform er oppfinnelsen rettet mot et isolert polynukleotid omfattende SEKV ID NR: 8, SEKV ID NR: 9 og SEKV ID NR: 10. (CDR V_L). Ved én utførelsesform koder hvert av disse polynukleotidene for et fusjonspolypeptid.

[0110] Ved en annen utførelsesform omfatter det antigenbindende molekyl V_H-domènet av muse-B-Ly1-antistoffet vist på fig. 1, eller en variant derav; og et ikke-muse-polypeptid. Ved en annen foretrukket utførelsesform er oppfinnelsen rettet mot et antigenbindende molekyl omfattende V_L-domènet av muse-B-Ly1-antistoffet vist på fig. 2, eller en variant derav; og et ikke-muse-polypeptid.

[0111] Ved et annet aspekt er oppfinnelsen rettet mot antigenbindende molekyler omfattende én eller flere avkortede CDR av B-Ly1. Slike avkortede CDR vil mimimalt inneholde de spesifisitetsbestemmende aminosyrerester for den gitte CDR. Med "spesifisitetsbestemmende rest" menes de rester som er direkte involvert i interaksjonen med antigenet. Vanligvis deltar bare ca. én femtedel til én tredjedel av restene i en gitt CDR i binding til antigen. De spesifisitets-bestemmende rester i en spesiell CDR kan identifiseres for eksempel ved beregning av interatomiske kontakter ut fra tredimensjonal modellering og bestemmelse av sekvensvariabiliteten ved en gitt reststilling i henhold til metodene beskrevet i Padlan et al., *FASEB J. 9(1)*:133-139 (1995), hvis innhold i sin helhet er medtatt her i dokumentet som referanse.

[0112] Oppfinnelsen er følgelig også rettet mot et isolert polynukleotid omfattende minst én komplementaritetsbestemmende region av muse-B-Ly1-antistoffet, eller en variant- eller avkortet form derav inneholdende minst de spesifisitetsbestemmende rester for den komplementaritetsbestemmende region, hvor det isolert polynukleotid koder for et fusjonspolypeptid. Slike isolerte polynukleotider koder fortrinnsvis for et fusjonspolypeptid som er et antigenbindende molekyl. Ved én utførelsesform omfatter polynukleotidet tre komplementaritetsbestemmende regioner av muse-B-Ly1-antistoffet, eller varianter eller avkortede former derav inneholdende minst de spesifisitetsbestemmende rester for hver av de tre komplementaritetsbestemmende regioner. Ved en annen utførelsesform koder polynukleotidet for hele den variable region av den lette eller tunge kjede av et kimærisk (f.eks. humanisert) antistoff. Oppfinnelsen er videre rettet mot polypeptidene som kodes for av slike polynukleotider.

[0113] Ved en annen utførelsesform er oppfinnelsen rettet mot et antigenkombinerende molekyl omfattende minst én komplementaritetsbestemmende region av muse-B-Ly1-antistoffet, eller en variant eller avkortet form derav inneholdende i det minste de spesifisitetsbestemmende rester for den komplementaritetsbestemmende region, og omfattende en sekvens som stammer fra et heterologt polypeptid. Ved én utførelsesform omfatter det antigenbindende molekyl tre komplementaritetsbestemmende regioner av muse-B-Ly1-antistoffet, eller varianter eller avkortede former derav inneholdende minst de spesifisitetsbestemmende rester for hver av de tre komplementaritetsbestemmende regioner. Ved et annet aspekt omfatter det antigenbindende molekyl den variable region av en lett eller tung antistoffkjede. Ved én spesielt anvendelig utførelsesform er det antigenbindende molekyl et kimærisk, f.eks. humanisert, antistoff. Oppfinnelsen er også rettet mot fremgangsmåter for frembringelse av slike antigenbindende molekyler, og anvendelse av disse ved behandling av sykdom, innbefattende B-celle-lymfomer.

[0114] Det er kjent at flere mekanismer inngår ved den terapeutiske effektivitet av anti-CD20-antistoffer, innbefattende antistoffavhengig cellulær cytotoksisitet (ADCC), komplementavhengig cytotoksisitet (CDC) og induksjon av vekststansing eller apoptose. For eksempel tyder hovedandelen av eksperimentelle beviser på at rituximab opererer via konvensjonelle effektor-

mekanismer målt ved CDC- og ADCC-analyser. Likeledes er det vist at bestandigheten hos forskjellige lymfomceller overfor rituximab in vivo er en funksjon av deres følsomhet overfor CDC in vitro. I motsetning til dette fordrer virkningsmåten in vivo for et annet antistoff som er blitt godkjent for terapeutisk bruk, B1, verken komplement eller naturlig dreper (NK)-celle-aktivitet. Effektiviteten av B1 in vivo skyldes snarere dets evne til å indusere potent apoptose.

[0115] Monoklonale anti-CD20-antistoffer kan generelt inndeles i to atskilte kategorier basert på sin virkningsmekanisme med hensyn til å utrydde lymfomceller. Anti-CD20-antistoffer type I anvender hovedsakelig komplement til å drepe målceller, mens antistoffer type II opererer ved andre mekanismer, hovedsakelig apoptose. Rituximab og 1F5 er eksempler på anti-CD20-antistoffer type I, mens B1 er et eksempel på et antistoff type II. Se f.eks. Cragg, M.S, og Glennie, M.J., *Blood* 103(7):2738-2743 (april 2004); Teeling, J.L. et al., *Blood* 104(6):1793-1800 (september 2004); hele innholdet i hver av disse er medtatt her i dokumentet som referanse.

[0116] Foreliggende oppfinnelse er det første kjente tilfelle hvor et anti-CD20-antistoff type II er blitt omarbeidet til å ha økte effektorfunksjoner så som ADCC, mens det fremdeles bibeholder potent apoptoseevne. Foreliggende oppfinnelse er følgelig rettet mot et omarbeidet anti-CD20-antistoff type II med øket ADCC som resultat av denne omarbeiding, og uten tap av vesentlig evne til å indusere apoptose. Ved én utførelsesform er anti-CD20-antistoffene type II blitt omarbeidet til å ha et forandret mønster for glykosylering i Fc-regionen. Ved en spesiell utførelsesform omfatter den forandrede glykosylering et øket nivå av todelte kompleksrester i Fc-regionen. Ved en annen spesiell utførelsesform omfatter den forandrede glykosylering et redusert nivå av fukoserester i Fc-regionen. Se publisert US-patentsøknad nr. 2004/0093621, hvis hele innhold er medtatt her i dokumentet som referanse. Ved en annen utførelsesform har anti-CD20-antistoffene type II gjennomgått polypeptidomarbeiding som angitt i US-patent nr. 6 737 056 eller publisert US-patentsøknad nr. 2004/0185045 eller publisert US-patentsøknad nr. 2004/0132101; hele inneholdet i hver av disse er medtatt som referanse. Oppfinnelsen er videre rettet mot fremgangsmåter for frembringelse av slike omarbeidede antistoffer type II samt fremgangsmåter for anvendelse av slike antistoffer ved behandling av forskjellige B-celle-forstyrrelser,

innbefattende B-celle-lymfomer.

[0117] Kimæriske muse-/humane antistoffer er beskrevet. Se for eksempel Morrison, S. L. et al., *PNAS* I1 :6851-6854 (november 1984); europeisk patentpublikasjon nr. 173494; Boulianna, G. L, et al., *Nature* 312:642 (desember 1984); Neubeiger, M. S. et al., *Nature* 314:268 (mars 1985); europeisk patentpublikasjon nr. 125023; Tan et al., *J. Immunol.* 135:8564 (november 1985); Sun, L. K et al., *Hybridoma* 5(1):517 (1986); Sahagan et al., *J. Immunol.* 137:1066-1074 (1986). Se generelt Muron, *Nature* 312:597 (desember 1984); Dickson, *Genetic Engineering News* 5(3) (mars 1985); Marx, *Science* 229:455 (august 1985); og Morrison, *Science* 229:1202-1207 (september 1985). PCT-publikasjon nr. WO/88104936 beskriver et kimærisk antistoff med konstant human region og variabel museregion, med spesifisitet overfor en epitop på CD20; musedelen av det kimæriske antistoff i Robinson-referansen stammer fra det monoklonale museantistoff 2H7 (gamma 2b, kappa). Skjønt referansen bemerker at det beskrevne kimæriske antistoff er en "hovedkandidat" for behandling av B-celle-forstyrrelser, kan dette utsagn anses som ikke mer enn et forslag overfor fagfolk på området for å bestemme om hvorvidt dette forslag er nøyaktig for dette spesielle antistoff eller ikke, spesielt på grunn av at referansen mangler data som underbygger påstanden om terapeutisk effektivitet, og i det vesentlige data som anvender høyereordens-pattedyr så som primater eller mennesker.

[0118] Metodikker for frembringelse av kimæriske antistoffer er tilgjengelige for fagfolk på området. For eksempel kan de lette og tunge kjeder uttrykkes separat, for eksempel under anvendelse av immunglobulin-lettkjeder og immunglobulin-tungkjeder i separate plasmider, eller på en enkelt (f.eks. polycistronisk) vektor. Disse kan så renses og settes sammen in vitro til fullstendige antistoffer; metodikker for utførelse av slik sammensetting er beskrevet. Se for eksempel Scharff M., Harvey Lectures 69:125 (1974). In vitro-reaksjonsparametere for dannelse av IgG-antistoffer fra reduserte isolerte lette og tunge kjeder er også beskrevet. Se for eksempel Sears et al., *Biochem.* 16(9):2016-25 (1977).

[0119] Ved en spesielt foretrukket utførelsesform er det kimæriske ABM ifølge foreliggende oppfinnelse et humanisert antistoff. Metoder for humanisering av ikke-humane antistoffer er kjent på området. For eksempel kan humaniserte ABM ifølge foreliggende oppfinnelse frembringes i henhold til metodene ifølge US-

patent nr. 5 225 539, US-patent nr. 6 180 370 eller US-patent nr. 6 632 927; hele innholdet i hvert av disse er herved medtatt som referanse. Et humanisert antistoff har fortrinnsvis innført én eller flere aminosyrerester fra en kilde som er ikke-human. Disse ikke-humane aminosyrerester omtales ofte som "import"-rester, som typisk er tatt fra et variabelt "import"-doméne. Humanisering kan i det vesentlige utføres i henhold til metoden ifølge Winter og medarbeidere (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)) ved innsetting av hypervariable regionsekvenser i stedet for de tilsvarende sekvenser av et humant antistoff. Slike "humaniserte" antistoffer er følgelig kimæriske antistoffer (US-patent nr. 4 816 567) hvor hovedsakelig mindre enn et intakt humant variabelt doméne er blitt erstattet med den tilsvarende sekvens fra en ikke-human art. I praksis er humaniserte antistoffer typisk humane antistoffer hvor en del hypervariabel region-rester og eventuelt en del FR-rester er erstattet med rester fra analoge steder i gnager-antistoffer. De aktuelle humaniserte anti-CD20-antistoffer vil omfatte konstante regioner av humant immunglobulin.

[0120] Valget av humane variable doméner, både lette og tunge, for anvendelse ved frembringelse av de humaniserte antistoffer er meget viktig for redusering av antigenisitet. I henhold til den såkalte "beste tilpasnings"-metode blir sekvensen i det variable doméne av et gnager-antistoff screenet mot hele biblioteket av kjente humane variabelt doméne-sekvenser. Den humane sekvens som er nærmest gnagersekvensen, blir så akseptert som den humane rammeverkregion (FR) for det humaniserte antistoff (Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Clothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). En annen metode for utvelging av den humane rammeverksekvens er å sammenlikne sekvensen for hver individuell subregion av hele gnager-rammeverket (dvs. FR1, FR2, FR3 og FR4) eller en kombinasjon av de individuelle subregioner (f.eks. FR1 og FR2) med et bibliotek av kjente humane variabel region-sekvenser som svarer til denne rammeverk-subregion (f.eks. bestemt ved Kabat-nummerering) og velge den humane sekvens for hver subregion eller kombinasjon som er nærmest gnagersekvensen (publisert US-patentsøknad nr. 2003/0040606A1, publisert 27. feb. 2003). En annen metode anvender en bestemt rammeverkregion som stammer fra konsensussekvensen hos alle humane antistoffer i en spesiell subgruppe av lette eller tunge kjeder. Det samme rammeverk kan anvendes for

flere forskjellige humaniserte antistoffer (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

[0121] Det er videre viktig at antistoffer humaniseres med retensjon av høy affinitet for antigenet og andre gunstige biologiske egenskaper. For å oppnå dette mål blir humaniserte antistoffer i henhold til en foretrukket metode frembrakt ved hjelp av en prosess for analyse av parentalsekvensene og forskjellige begrepsmessige humaniserte produkter under anvendelse av tredimensjonale modeller av parentalsekvensene og de humaniserte sekvenser. Tredimensjonale immunglobulinmodeller er alminnelig tilgjengelige og er kjent for fagfolk på området. Det er tilgjengelig datamaskinprogrammer som illustrerer og viser sannsynlige tredimensjonale konformasjonelle strukturer av utvalgte kandidat-immunglobulinsekvenser. Inspeksjon av disse fremvisninger muliggjør analyse av den sannsynlige rolle for restene ved funksjonering av kandidat-immunglobulin-sekvensen, dvs. analyse av rester som innvirker på evnen hos kandidat-immunglobulinet til å binde sitt antigen. På denne måte kan FR-rester utvelges og kombineres fra mottaker- og importsekvensene slik at de ønskede antistoff-karakteregenskaper, så som øket affinitet for målantigenet (-antigenene) oppnås. Vanligvis er restene i den hypervariable region direkte og i det alt vesentlige involvert i innvirkning på antigenbinding.

[0122] Ved en annen utførelsesform blir de antigenbindende molekyler ifølge foreliggende oppfinnelse omarbeidet til å ha forøket bindingsaffinitet, for eksempel i henhold til metodene beskrevet i publisert US-patentsøknad nr. 2004/0132066, og hele innholdet i dette er medtatt her i dokumentet som referanse.

[0123] Ved én utførelsesform blir det antigenbindende molekyl ifølge foreliggende oppfinnelse konjugert til en ytterligere del, så som en radio-merkesubstans eller et toksin. Slike konjugerte ABM kan frembringes ved hjelp av tallrike metoder som er velkjente på området.

[0124] En rekke radionuklider er anvendelige ved foreliggende oppfinnelse, og fagfolk på området tillegges evnen til lett å bestemme hvilken radionuklide som er mest hensiktsmessig under en rekke omstendigheter. For eksempel er ^{131}jod en velkjent radionuklide som anvendes for målsøkt immunterapi. Den kliniske anvendelighet av ^{131}jod kan imidlertid være begrenset av flere faktorer innbefattende: åtte dagers fysisk halveringstid; dehalogenering av jodert antistoff

både i blodet og på tumorsteder; og emisjonsegenskaper (f.eks. stor gamma-komponent) som kan være suboptimal for lokalisert doseavsetning i tumor. Med tilkomst av bedre chelateringsmidler har muligheten til å knytte metall-chelaterende grupper til proteiner øket mulighetene til å anvende andre radionuklider så som ^{111}indium og ^{90}yttrium. ^{90}Yttrium gir flere fordeler for anvendelse ved radioimmunterapeutiske anvendelser: 64 timers halveringstiden for ^{90}yttrium er lang nok til å muliggjøre antistoffopphopning ved tumor, og i motsetning til f.eks. ^{131}jod, er ^{90}yttrium en ren betaemitter med høy energi uten noen ledsagende gammastråling ved nedbrytningen av det, med en rekkevidde i vev på 100 til 1000 celldiametre. Videre muliggjør den minimale mengde av gjennomtrengende stråling poliklinisk administrering av ^{90}yttrium-merkede antistoffer. Dessuten er internalisering av merket antistoff ikke nødvendig for celledreping, og den lokale emisjon av ioniserende stråling skulle være letal for nabo-tumorceller som mangler mål-antigenet.

[0125] Effektive enkeltbehandlingsdoseringer (dvs. terapeutisk effektive mengder) av ^{90}yttrium-merkede anti-CD20-antistoffer er i området mellom ca. 5 og ca. 75 mCi, mer foretrukket mellom ca. 10 og ca. 40 mCi. Effektive ablative enkeltbehandlings-benmargdoser av ^{131}jod-merkede anti-CD20-antistoffer er i området mellom ca. 5 og ca. 70 mCi, mer foretrukket mellom ca. 5 og ca. 40 mCi. Effektive ablative enkeltbehandlingsdoser (dvs. kan kreve autolog benmargtransplantasjon) av ^{131}jod-merkede anti-CD20-antistoffer er i området mellom ca. 30 og ca. 600 mCi, mer foretrukket mellom ca. 50 og mindre enn ca. 500 mCi. I forbindelse med et kimærisk anti-CD20-antistoff er en effektiv ablativ enkeltbehandlings-benmargdose av ^{131}jod-merkede kimæriske anti-CD20-antistoffer i området mellom ca. 5 og ca. 40 mCi, mer foretrukket mindre enn ca. 30 mCi, på grunn av den lengre sirkulerings-halveringstid i forhold til museantistoffer. Avbildingskriterier for f.eks. ^{111}indium-merkesubstansen er typisk mindre enn ca. 5 mCi.

[0126] Med hensyn til radiomerkede anti-CD20-antistoffer kan terapi med disse også finne sted ved anvendelse av en enkeltterapibehandling eller ved anvendelse av multiple behandlinger. På grunn av radionuklidekomponenten er det foretrukket at perifere stamceller ("PSC") eller benmarg ("BM") "høstes" for behandling av pasienter som har fått potensielt fatal benmargtoksisitet som resultat av bestråling. BM og/eller PSC høstes under anvendelse av

standardteknikker, og blir så utskylt og frosset for eventuell reinfusjon. Det er dessuten meget foretrukket at det før behandling utføres en diagnostisk dosimetriundersøkelse med anvendelse av et diagnostisk merket antistoff (f.eks. under anvendelse av ^{111}indium) på pasienten; et formål med dette er å sikre at det terapeutisk merkede antistoff (f.eks. med anvendelse av ^{90}yttrium) ikke vil bli unødvendig "konsentrert" i noe normalt organ eller vev.

[0127] Ved en foretrukket utførelsesform er foreliggende oppfinnelse rettet mot et isolert polynukleotid omfattende en sekvens som koder for et polypeptid med en aminosyresekvens som vist i tabell 3 nedenfor. Oppfinnelsen er videre rettet mot en isolert nukleinsyre omfattende en sekvens som er minst 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% eller 99% identisk med en nukleotidsekvens vist i tabell 2 nedenfor. Ved en annen utførelsesform er oppfinnelsen rettet mot en isolert nukleinsyre omfattende en sekvens som koder for et polypeptid med en aminosyresekvens som er minst 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% eller 99% identisk med en aminosyresekvens i tabell 3. Oppfinnelsen omfatter også en isolert nukleinsyre omfattende en sekvens som koder for et polypeptid med aminosyresekvens som hos hvilken som helst av konstruksjonene i tabell 3 med konserverende aminosyresubstitusjoner.

TABELL 2

KONSTR.	NUKLEOTIDSEKVENS	SEKV ID NR.
B-HH1	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA GAAGCCTGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG CTTCCGGATACACCTTCAGCTATTCTTGGATGAGCT GGGTGCGGCAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG ATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA CTACGCACAGAAATTCCAAGGAAGAGTCACAATTA CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT CCTCA	29
B-HH2	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA GAAGCCTGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG CTTCCGGATACGCCTTCAGCTATTCTTGGATGAACT GGGTGCGGCAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG ATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA CTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTA CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT CCTCA	31
B-HH3	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA GAAGCCTGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG CTTCCGGATACGCCTTCAGCTATTCTTGGATGAACT GGGTGCGGCAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG ATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA CTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTA CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA TCTGTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT CCTCAGCTAGCACC	33
B-HH4	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA GAAGCCTGGAGCTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG TCTCCGGATACGCGTTCAGCTATTCTTGGATGAACT GGGTGCGGCAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG ATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA CTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTA CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT CCTCA	35

KONSTR.	NUKLEOTIDSEKVENS	SEKV ID NR.
B-HH5	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA GAAGCCTGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG CTTCCGGATACGCGTTCAGCTATTCTTGGATGAGCT GGGTGCGGCAGGCGCCTGGACAAGGGCTCGAGTG GATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTG ACTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATT ACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGA GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGT ATTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGC TTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT CCTCA	37
B-HH6	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA GAAGCCTGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG CTTCCGGATACGCCTTCAGCTATTCTTGGATCAATT GGGTGCGGCAGGCGCCTGGACAAGGGCTCGAGTG GATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTG ACTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATT ACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGA GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGT ATTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGC TTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT CCTCA	39
B-HH7	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA GAAGCCTGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG CTTCCGGATACGCCTTCAGCTATTCTTGGATCTCGT GGGTGCGGCAGGCGCCTGGACAAGGGCTCGAGTG GATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTG ACTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATT ACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGA GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGT ATTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGC TTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT CCTCA	41
B-HH8	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA GAAGCCTGGCGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG CTTCCGGATACACCTTCACATACAGCTGGATGAAC TGGGTGCGGCAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTG GATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTG ACTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATT ACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGA GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGT ATTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGC TTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT CCTCA	43

KONSTR.	NUKLEOTIDSEKVENS	SEKV ID NR.
B-HH9	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA GAAGCCTGGCGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG CTTCCGGATACACCTTCAGCTATTCTTGGATGAACT GGGTGCGGCAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG ATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA CTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTA CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT CCTCA	45
B-HL1	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG CTTCCGGATACACCTTCACCTATTCTTGGATGCACT GGGTGCGGCAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG ATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA CTACGCACAGAAATTCCAAGGAAGAGTCACAATGA CACGGGACACGTCCACTTCCACCGTCTATATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT CCTCA	47
B-HL2	GAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA GAAGCCTGGGGCCACCGTGAAGATCTCCTGCAAGG TGTCCGGATACACCTTCACCTATTCTTGGATGCACT GGGTGCAGCAGGCCCCTGGAAAGGGGCTCGAGTG GATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTG ACTACGCAGAGAAATTCCAAGGAAGAGTCACAATC ACAGCCGACACGTCCACTGACACCGCCTATATGGA GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGT ATTACTGTGCAACCAATGTCTTTGATGGTTACTGGC TTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT CCTCA	49
B-HL3	GAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA GAAGCCTGGGGCCACCGTGAAGATCTCCTGCAAGG TGTCCGGATACACCTTCACCTATTCTTGGATGAACT GGGTGCAGCAGGCCCCTGGAAAGGGGCTCGAGTG GATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTG ACTACAATGGGAAATTCAAGGGAAGAGTCACAATC ACAGCCGACACGTCCACTGACACCGCCTATATGGA GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGT ATTACTGTGCAACCAATGTCTTTGATGGTTACTGGC TTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT CCTCA	51

KONSTR.	NUKLEOTIDSEKVENS	SEKV ID NR.
B-HL4	CAGATGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA GAAGACCGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG CTTCCGGATACACCTTCACCTATTCTTGGATGAGCT GGGTGCGGCAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG ATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA CTACGCACAGAAATTCCAAGGAAGAGTCACAATTA CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT CCTCAGCTAGCACC	53
B-HL8	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGT CAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGGCTCTCCTGTGCAG CCTCTGGATTCACATTTAGCTATTCTTGGATGAACT GGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGG GTGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA CTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTA CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT CCTCA	55
B-HL10	CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGG ACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCAC AGGAGCCCACTCCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTG GAGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGG CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCGCATTCAGCTAT TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTCCCGGCG ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTT GATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA	57
B-HL11	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGT CAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGGCTCTCCTGTGCAG CCTCTGGATTCACATTTAGCTATTCTTGGATGAACT GGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGG GTGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA CTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTA CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT CCTCA	59

KONSTR.	NUKLEOTIDSEKVENS	SEKV ID NR.
B-HL12	CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGG ACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCAC AGGAGCTCACTCCGAAGTGCAGCTCGTGGAGTCTG GAGCAGGCTTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGG CTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTCACATTTAGCTAT TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTCCCGGCG ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTT GATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA	61
B-HL13	CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGG ACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCAC AGGAGCTCACTCCGAAGTGCAGCTCGTCGAGTCTG GAGGAGGCGTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGG CTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTCACATTTAGCTAT TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTCCCGGCG ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTT GATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA	63
B-HL14	CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGG ACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCAC AGGAGCTCACTCCGAAGTGCAGCTGGTCGAGTCCG GAGGAGGCTTGAAGAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGG CTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTCACATTTAGCTAT TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTCCCGGCG ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTT GATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA	65

KONSTR.	NUKLEOTIDSEKVENS	SEKV ID NR.
B-HL15	CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGG ACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCAC AGGAGCCCACTCCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTG GAGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGCTCTTCCCTGCGG CTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTCACATTTAGCTAT TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTCCCGGCG ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTT GATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA	67
B-HL16	CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGG ACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCAC AGGAGCCCACTCCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTG GAGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGG GTCAGCTGCGCAGCCTCTGGATTCACATTTAGCTAT TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTCCCGGCG ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTT GATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA	69
B-HL17	CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGG ACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCAC AGGAGCCCACTCCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTG GAGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGG CTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTCACATTTAGCTAT TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTCCCGGCG ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTT GATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA	71
VH Signal-sekvens	ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGC AGCAGCCACAGGAGCCCACTCC	73
B-KV1	GATATCGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCC GTCACCCCTGGAGAGCCCGCCAGCATTAGCTGCAG GTCTAGCAAGAGCCTCTTGCACAGCAATGGCATCA CTTATTTGTATTGGTACCTGCAAAAGCCAGGGCAG TCTCCACAGCTCCTGATTTATCAAATGTCCAACCTT GTCTCTGGCGTCCCTGACCGGTTCTCCGGATCCGGG TCAGGCACTGATTTCACACTGAAAATCAGCAGGGT GGAGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGCGCTC AGAATCTAGAACTTCCTTACACCTTCGGCGGAGGG ACCAAGGTGGAGATCAAACGTACGGTG	75

KONSTR.	NUKLEOTIDSEKVENS	SEKV ID NR.
VL Signal-sekvens	ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGCCT CCTGCTGCTCTGGTTCCCAGGTGCCAGGTGT	77

TABELL 3

KONSTR.	AMINOSYRESEKVENS	SEKV ID NR.
B-HH1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSYSWMSWVR QAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYAQKFQGRVTITADKSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTL VTVSS	30
B-HH2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMNWV RQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQG TLVTVSS	32
B-HH3	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMNWV RQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYLCARNVFDGYWLVYWGQGT LVTVSS	34
B-HH4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYAFSYSWMNWV RQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQG TLVTVSS	36
B-HH5	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMSWV RQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQG TLVTVSS	38
B-HH6	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVR QAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTL VTVSS	40
B-HH7	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWISWVR QAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTL VTVSS	42
B-HH8	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTYSWMNWV RQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQG TLVTVSS	44
B-HH9	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSYSWMNWV RQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQG TLVTVSS	46
B-HL1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTYSWMHWV RQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQ GTLVTVSS	48

5

KONSTR.	AMINOSYRESEKVENS	SEKV ID NR.
B-HL2	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTYSWMHWV QQAPGKGLEWMGRIFPGDGDTDYAEKFQGRVTITADTS TDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATNVFDGYWLVYWGQG TLVTVSS	50
B-HL3	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTYSWMNWV QQAPGKGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADTS TDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATNVFDGYWLVYWGQG TLVTVSS	52
B-HL4	QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTFTYSWMSWV RQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYAQKFQGRVTITADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQG TLVTVSS	54
B-HL8	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR QAPGKGLEWVGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGT LVTVSS	56
B-HL10	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSYSWMNWVR QAPGKGLEWVGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTL VTVSS	58
B-HL11	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR QAPGKGLEWVGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGT LVTVSS	60
B-HL12	EVQLVESGAGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR QAPGKGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGT LVTVSS	62
B-HL13	EVQLVESGGGVVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR QAPGKGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTL VTVSS	64
B-HL14	EVQLVESGGGLKKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR QAPGKGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTL VTVSS	66
B-HL15	EVQLVESGGGLVKPGSSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR QAPGKGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGT LVTVSS	68
B-HL16	EVQLVESGGGLVKPGGSLRVSCAASGFTFSYSWMNWVR QAPGKGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTL VTVSS	70
B-HL17	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR QAPGKGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGT LVTVSS	72
VH signal-sekvens	MDWTWRILFLVAAATGAHS	74

KONSTR.	AMINOSYRESEKVENS	SEKV ID NR.
B-KV1	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGITYLYWY LQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIKRTV	76
VL signal-sekvens	MDMRVPAQLLGLLLLWFPGARC	78

[0128] Ved en annen foretrukket utførelsesform er foreliggende oppfinnelse rettet mot et isolert polynukleotid omfattende en sekvens som koder for et polypeptid med aminosyresekvensen vist på fig. 1 eller fig. 2. Oppfinnelsen er videre rettet mot en isolert nukleinsyre omfattende en sekvens som er minst 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% eller 99% identisk med nukleotidsekvensen vist på fig. 5 eller fig. 6. Ved en annen utførelsesform er oppfinnelsen rettet mot en isolert nukleinsyre omfattende en sekvens som koder for et polypeptid med en aminosyresekvens som er minst 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% eller 99% identisk med aminosyresekvensen vist på fig. 5 eller fig. 6. Oppfinnelsen omfatter også en isolert nukleinsyre omfattende en sekvens som koder for et polypeptid med aminosyresekvensen ifølge hvilken som helst av fig. 1. fig. 2, fig. 5 eller fig. 6 med konserverende aminosyresubstitusjoner.

[0129] Ved en annen utførelsesform er foreliggende oppfinnelse rettet mot en ekspresjonsvektor og/eller en vertscelle som omfatter ett eller flere isolerte polynukleotider ifølge foreliggende oppfinnelse.

[0130] Generelt kan hvilken som helst type dyrket cellelinje anvendes til å uttrykke ABM ifølge foreliggende oppfinnelse. Ved en foretrukket utførelsesform anvendes CHO-celler, BHK-celler, NS0-celler, SP2/0-celler, YO-myelomceller, P3X63-musemyelomceller, PER-celler, PER.C6-celler eller hybridomceller, andre pattedyrceller, gjærceller, insektceller eller planteceller som bakgrunnscellelinje til frembringelse av de omarbeidede vertsceller ifølge oppfinnelsen.

[0131] Den terapeutiske effektivitet av ABM ifølge foreliggende oppfinnelse kan forsterkes ved at de frembringes i en vertscelle som videre uttrykker et polynukleotid som koder for et polypeptid med GnTIII-aktivitet. Ved en foretrukket utførelsesform er polypeptidet med GnTIII-aktivitet et fusjonspolypeptid omfattende Golgi-lokalisasjonsdomènet av et polypeptid som finnes i Golgi-apparatet. Ved en annen foretrukket utførelsesform resulterer ekspresjonen av ABM ifølge foreliggende oppfinnelse i en vertscelle som uttrykker et polynukleotid som koder for et polypeptid med GnTIII-aktivitet, i ABM med øket Fc-reseptor-

bindingsaffinitet og øket effektorfunksjon. Ved én utførelsesform er foreliggende oppfinnelse følgelig rettet mot en vertscelle omfattende (a) en isolert nukleinsyre omfattende en sekvens som koder for et polypeptid med GnTIII-aktivitet; og (b) et isolert polynukleotid som koder for et ABM ifølge foreliggende oppfinnelse, så som et kimærisk, primatisert eller humanisert antistoff som binder humant CD20. Ved en foretrukket utførelsesform er polypeptidet som har GnTIII-aktivitet, et fusjonspolypeptid omfattende det katalytiske doméne av GnTIII, og Golgi-lokalisdasjonsdoménet er lokalisasjonsdoménet for mannosidase II. Metoder for frembringelse av slike fusjonspolypeptider og anvendelse av dem til fremstilling av antistoffer med økte effektorfunksjoner er beskrevet i midlertidig US-patentsøknad nr. 60/495 142; hele innholdet i denne er uttrykkelig medtatt her i dokumentet som referanse. Ved en annen foretrukket utførelsesform er det kimæriske ABM et kimærisk antistoff eller et fragment derav, som har bindingsspesifisitet som for muse-B-Ly1-antistoffet. Ved en spesielt foretrukket utførelsesform omfatter det kimæriske antistoff et humant Fc. Ved en annen foretrukket utførelsesform er antistoffet primatisert eller humanisert.

[0132] Ved én utførelsesform kan ett eller flere polynukleotider som koder for et ABM ifølge foreliggende oppfinnelse, uttrykkes under regulering av en konstitutiv promoter, eller alternativt et regulert ekspresjonssystem. Egnede regulerte ekspresjonssystemer innbefatter, men er ikke begrenset til, et tetracyklinregulert ekspresjonssystem, et ecdyson-induserbart ekspresjons-system, et lac-omskiftings-ekspresjonssystem, et glukokortikoid-induserbart ekspresjonssystem, et temperatur-induserbart promotersystem og et metalltionein-metall-induserbart ekspresjonssystem. Hvis flere forskjellige nukleinsyrer som koder for et ABM ifølge foreliggende oppfinnelse finnes i vertscellesystemet, kan noen av dem uttrykkes under kontroll av en konstitutiv promoter, mens andre uttrykkes under kontroll av en regulert promoter. Det maksimale ekspresjonsnivå anses for å være det høyest mulige nivå av stabil polypeptidekspresjon som ikke har en betydelig uheldig virkning på celleveksthastigheten, og vil bli bestemt under anvendelse av rutine-eksperimentering. Ekspresjonsnivåene bestemmes ved metoder som er generelt kjent på området, innbefattende Western blot-analyse med anvendelse av et antistoff som er spesifikt for ABM, eller et antistoff som er spesifikt for et peptid-merkemateriale koplet til ABM; og Northern blot-analyse. Ved et ytterligere

alternativ kan polynukleotidet være operativt knyttet til et reportergen; ekspresjonsnivåene for et kimærisk ABM med hovedsakelig samme bindingsspesifisitet som muse-B-Ly1-antistoffet bestemmes ved måling av et signal som er korrelert med ekspresjonsnivået for reportergenet. Reportergenet kan transkriberes sammen med nukleinsyren(e) som koder for nevnte polypeptid som et enkelt mRNA-molekyl; deres respektive kodingssekvenser kan sammenknyttes enten ved et indre ribosominngangssete (IRES) eller ved en deksel ("cap")-uavhengig translasjonsforsterker (CITE). Reportergenet kan translateres sammen med minst én nukleinsyre som koder for et kimærisk ABM med hovedsakelig samme bindingsspesifisitet som muse-B-Ly1-antistoffet slik at det dannes en enkelt polypeptidkjede. Nukleinsyrene som koder for AMB ifølge foreliggende oppfinnelse, kan være operativt knyttet til reportergenet under kontroll av en enkelt promoter, slik at nukleinsyren som koder for fusjons-polypeptidet og reportergenet, transkriberes til et RNA-molekyl som alternativt spleises til to atskilte budbringer-RNA (mRNA)-molekyler; ett av de resulterende mRNA translateres til reporterproteinet, og det andre translateres til fusjons-proteinet.

[0133] Metoder som er velkjente for fagfolk på området, kan anvendes til konstruering av ekspresjonsvektorer inneholdende kodingssekvensen for et ABM med hovedsakelig samme bindingsspesifisitet som muse-B-Ly1-antistoffet sammen med passende transkripsjons/translasjons-kontrollsignaler. Disse metoder innbefatter rekombinante in vitro-DNA-teknikker, synteseteknikker og in vivo-rekombinasjon/genetisk rekombinasjon. Se for eksempel teknikkene beskrevet i Maniatis et al., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989) og Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989).

[0134] Det kan anvendes forskjellige verts-ekspresjonsvektorsystemer til å uttrykke kodingssekvensen for ABM ifølge foreliggende oppfinnelse. Det anvendes fortrinnsvis pattedyrceller som vertssystemer transfektert med rekombinant plasmid-DNA- eller kosmid-DNA-ekspresjonsvektorer inneholdende kodingssekvensen for det aktuelle protein, og kodingssekvensen for fusjonspolypeptidet. Mest foretrukket anvendes CHO-celler, BHK-celler, NSO-celler, SP2/0-celler, YO-myelomceller, P3X63-musemyelomceller, PER-celler, PER.C6-celler eller hybridomceller, andre pattedyrceller, gjærceller, insektceller

eller planteceller som vertscellesystem. Noen eksempler på ekspresjonssystemer og seleksjonsmetoder er beskrevet i følgende referanser, og referanser i disse: Borth et al., *Biotechnol. Bioen.* 71(4):266-73 (2000-2001), i Werner et al., *Arzneimittelforschung/Drug Res.* 48(8):870-80 (1998), i Andersen og Krummen, *Curr. Op. Biotechnol.* 13:117-123 (2002), i Chadd og Chamow, *Curr. Op. Biotechnol.* 12:188-194 (2001), og i Giddings, *Curr. Op. Biotechnol.* 12: 450-454 (2001). Ved alternative utførelsesformer kan andre eukaryote vertscellesystemer overveies, innbefattende gjærceller transformert med rekombinante gjærekspresjonsvektorer inneholdende kodingssekvensen for et ABM ifølge foreliggende oppfinnelse; insektscellesystemer infisert med rekombinante virusekspresjonsvektorer (f.eks. baculovirus) inneholdende kodingssekvensen for et kimærisk ABM med hovedsakelig samme bindingsspesifisitet som muse-B-Ly1-antistoffet; plantecellesystemer infisert med rekombinante virusekspresjons-vektorer (f.eks. blomkålmosaikkvirus, CaMV; tobakkmosaikkvirus, TMV) eller transformert med rekombinante plasmid-ekspresjonsvektorer (f.eks. Ti-plasmid) inneholdende kodingssekvensen for ABM ifølge oppfinnelsen; eller dyrecellesystemer infisert med rekombinante virusekspresjonsvektorer (f.eks. adenovirus, vacciniavirus) innbefattende cellelinjer omarbeidet til å inneholde multiple kopier av DNA som koder for et kimærisk ABM med hovedsakelig samme bindingsspesifisitet som for muse-B-Ly1-antistoffet, enten stabilt amplifisert (CHO/dhfr) eller ustabilt amplifisert i dobbelt-småkromosomer (f.eks. musecellelinjer). Ved én utførelsesform er vektoren omfattende polynukleotidet (polynukleotidene) som koder for ABM ifølge oppfinnelsen, polycistronisk. Ved én utførelsesform er ABM omtalt ovenfor dessuten et antistoff eller et fragment derav. Ved en foretrukket utførelsesform er ABM et humanisert antistoff.

[0135] Når det gjelder fremgangsmåtene ifølge denne oppfinnelse, er stabil ekspresjon vanligvis foretrukket fremfor forbigående ekspresjon på grunn av at den typisk oppnår mer reproduserbare resultater og dessuten er mer tilpassbar til storskalaproduksjon. Heller enn å anvende ekspresjonsvektorer som inneholder virus-replikasjonsorigo, kan vertsceller transformeres med de respektive kodings-nukleinsyrer kontrollert ved passende ekspresjonskontrollelementer (f.eks. promoter, forsterker, sekvenser, transkripsjonsterminatorer, polyadenyleringsseter osv.) og en selekterbar markør. Etter innføring av fremmed DNA, kan omarbeidede celler få vokse i 1-2 dager i et anriket medium, som deretter blir

skiftet til et selektivt medium. Den selekterbare markør i det rekombinante plasmid gir resistens til seleksjonen og muliggjør seleksjon av celler som har stabilt integrert plasmidet i sine kromosomer og vokser under dannelse av foci som i sin tur kan klones og ekspanderes i cellelinjer.

[0136] En rekke seleksjonssystemer kan anvendes, innbefattende, men ikke begrenset til, herpes simplex-virus-thymidinkinase- (Wigler *et at, Cell* 11:223 (1977)), hypoxantin-guanin fosforibosyltransferase- (Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:2026 (1962)), og adeninfosforibosyltransferase- (Lowy *et at, Cell 22:817* (1980)) gener, som kan anvendes i henholdsvis tk$^-$- hgprt$^-$- eller aprt$^-$-celle. Dessuten kan antimetabolittresistens anvendes som basis for seleksjon med henblikk på dhfr, som gir resistens overfor metotreksat (Wigler et al., *Natl. Acad. Sci. USA* 77:3567 (1989); O'Hare *et at , Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1527 (1981)); gpt, som gir resistens overfor mykofenolsyre (Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072 (1981)); neo, som gir resistens overfor aminoglykosid G-418- (Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.* 150:1 (1981)); og hygro, som gir resistens overfor hygromycin- (Santerre *et at , Gene* 30:147 (1984) gener. Det er nylig beskrevet ytterligere selekterbare gener, nemlig trpB, som gir mulighet for celler å anvende indol i stedet for tryptofan; hisD, som gir mulighet for celler å anvende histinol i stedet for histidin (Hartman & Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Set USA* 85:8047 (1988)); glutaminsyntasesystemet; og ODC (ornitindekarboksylase) som gir resistens overfor ornitindekarboksylase-inhibitoren, 2-(difluormeyl-DL-ornitin, DFMO (McConlogue, i: *Current Communications in Molecular Biology,* Cold Spring Harbor Laboratory red. (1987)).

[0137] Foreliggende oppfinnelse er videre rettet mot en metode for modifisering av glykosyleringsprofilen for ABM ifølge foreliggende oppfinnelse som dannes av en vertscelle, omfattende ekspresjon i vertscellen av en nukleinsyre som koder for et ABM ifølge oppfinnelsen, og en nukleinsyre som koder for et polypeptid med GnTIII-aktivitet, eller en vektor omfattende slike nukleinsyrer. Det modifiserte polypeptid er fortrinnsvis IgG eller et fragment derav omfattende Fc-regionen. Ved en spesielt foretrukket utførelsesform er ABM et humanisert antistoff eller et fragment derav.

[0138] De modifiserte ABM dannet av vertscellene ifølge oppfinnelsen oppviser øket Fc-reseptor-bindende affinitet og/eller øket effektorfunksjon som resultat av modifikasjonen. Ved en spesielt foretrukket utførelsesform er ABM et

humanisert antistoff eller et fragment derav inneholdende Fc-regionen. Den økte Fc-reseptor-bindende affinitet er fortrinnsvis økt binding til en Fcγ-aktiverende reseptor, så som FcγRIIIa-reseptoren. Den økte effektorfunksjon er fortrinnsvis en økning i én eller flere av følgende: økt antistoffavhengig cellulær cytotoksisitet, økt antistoffavhengig cellulær fagocytose (ADCP), økt cytokinutskillelse, økt immunkompleks-mediert antigenopptak ved antigenpresenterende celler, økt Fc-mediert cellulær cytotoksisitet, økt binding til NK-celler, økt binding til makrofager, økt binding til polymorfonukleære celler (PMN), økt binding til monocytter, økt kryssbinding av målbundne antistoffer, økt direkte signalisering som induserer apoptose, økt dendrittcelleutvikling og økt T-celle-priming.

[0139] Foreliggende oppfinnelse er også rettet mot en fremgangsmåte for frembringelse av et ABM ifølge foreliggende oppfinnelse, med modifiserte oligosakkarider i en vertscelle, omfattende (a) dyrking av en vertscelle som er omarbeidet til å uttrykke minst én nukleinsyre som koder for et polypeptid med GnTIII-aktivitet under betingelser som muliggjør dannelse av et ABM ifølge foreliggende oppfinnelse, hvor polypeptidet med GnTIII-aktivitet uttrykkes i en mengde som er tilstrekkelig til å modifisere oligosakkaridene i Fc-regionen av nevnte ABM dannet av vertscellen; og (b) isolering av dette ABM. Ved en foretrukket utførelsesform er polypeptidet med GnTIII-aktivitet et fusjonspolypeptid omfattende det katalytiske doméne av GnTIII. Ved en spesielt foretrukket utførelsesform omfatter fusjonspolypeptidet videre Golgi-lokalisasjonsdomènet av et polypeptid i Golgi-apparatet.

[0140] Golgi-lokalisasjonsdomènet er fortrinnsvis lokalisasjonsdomènet av mannosidase II eller GnTI. Alternativt er Golgi-lokalisasjonsdomènet valgt fra gruppen bestående av: lokalisasjonsdomènet av mannosidase I, lokalisasjons-domènet av GnTII og lokalisasjonsdomènet av α1-6-kjerne-fukosyltransferase. ABM fremstilt ved hjelp av fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse har økt Fc-reseptor-bindende affinitet og/eller økt effektorfunksjon. Den økte effektorfunksjon er fortrinnsvis én eller flere av følgende: økt Fc-mediert cellulær cytotoksisitet (innbefattende økt antistoffavhengig cellulær cytotoksisitet), økt antistoffavhengig cellulær fagocytose (ADCP), økt cytokinutskillelse, økt immunkompleks-mediert antigenopptak ved antigenpresenterende celler, økt binding til NK-celler, økt binding til makrofager, økt binding til monocytter, økt binding til polymorfonukleære celler, økt direkte signalisering som induserer

apoptose, økt kryssbinding av målbundne antistoffer, økt dendrittcelleutvikling eller økt T-celle-priming. Den økte Fc-reseptor-bindende affinitet er fortrinnsvis økt binding til Fc-aktiverende reseptorer så som FcγRIIIa. Ved en spesielt foretrukket utførelsesform er ABM et humanisert antistoff eller et fragment derav.

[0141] Ved en annen utførelsesform er foreliggende oppfinnelse rettet mot et kimærisk ABM med hovedsakelig samme bindingsspesifisitet som for muse-B-Ly1-antistoffet frembrakt ved hjelp av fremgangsmåtene ifølge oppfinnelse som har en økt andel av todelte oligosakkarider i Fc-regionen av nevnte polypeptid. Man tenker seg at et slikt ABM omfatter antistoffer og fragmenter derav omfattende Fc-regionen. Ved en foretrukket utførelsesform er ABM et humanisert antistoff. Ved én utførelsesform er prosentandelen av todelte oligosakkarider i Fc-regionen av ABM minst 50%, mer fortrukket minst 60%, minst 70%, minst 80%, minst 90% og mest foretrukket minst 90-95% av den totale mengde oligosakkarider. Ved enda en annen utførelsesform har ABM fremstilt ved fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen en økt andel av ikke-fukosylerte oligosakkarider i Fc-regionen som resultat av modifikasjonen av dets oligosakkarider ved hjelp av fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse. Ved én utførelsesform er prosentandelen av ikke-fukosylerte oligosakkarider minst 50%, fortrinnsvis minst 60 til 70%, mest foretrukket minst 75%. De ikke-fukosylerte oligosakkarider kan være av hybrid- eller komplekstypen. Ved en spesielt foretrukket utførelsesform har ABM dannet av vertscellene og ved fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen en økt andel av todelte, ikke-fukosylerte oligosakkarider i Fc-regionen. De todelte, ikke-fukosylerte oligosakkarider kan være enten hybride eller komplekse. Fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse kan spesifikt anvendes til frembringelse av ABM hvor minst 15%, mer foretrukket minst 20%, mer foretrukket minst 25%, mer foretrukket minst 30%, mer foretrukket minst 35% av oligosakkaridene i Fc-regionen av ABM er todelte, ikke-fukosylerte. Fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse kan også anvendes til fremstilling av polypeptider hvor minst 15%, mer foretrukket minst 20%, mer foretrukket minst 25%, mer foretrukket minst 30%, mer foretrukket minst 35% av oligosakkaridene i Fc-regionen av polypeptidet er todelte hybride, ikke-fukosylerte.

[0142] Ved en annen utførelsesform er foreliggende oppfinnelse rettet mot et kimærisk ABM med hovedsakelig samme bindingsspesifisitet som for muse-B-Ly1-antistoffet som er omarbeidet til å ha økt effektorfunksjon og/eller økt Fc-

reseptor-bindende affinitet, fremstilt ved fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen. Den økte effektorfunksjon er fortrinnsvis én eller flere av følgende: økt Fc-mediert cellulær cytotoksisitet (innbefattende økt antistoffavhengig cellulær cytotoksisitet), økt antistoffavhengig cellulær fagocytose (ADCP), økt cytokinutskillelse, økt immunkompleks-mediert antigenopptak ved antigenpresenterende celler, økt binding til NK-celler, økt binding til makrofager, økt binding til monocytter, økt binding til polymorfonukleære celler, økt direkte signalisering som induserer apoptose, økt kryssbinding av målbundne antistoffer, økt dendrittcelleutvikling eller økt T-celle-priming. Ved en foretrukket utførelsesform er den økte Fc-reseptor-bindende affinitet økt binding til en Fc-aktiverende reseptor, mest foretrukket FcγRIIIa. Ved én utførelsesform er ABM et antistoff, et antistoff-fragment inneholdende Fc-regionen eller et fusjonsprotein som innbefatter en region som er ekvivalent med Fc-regionen av et immunglobulin. Ved en spesielt foretrukket utførelsesform er ABM et humanisert antistoff.

[0143] Foreliggende oppfinnelse er videre rettet mot farmasøytiske preparater omfattende ABM ifølge foreliggende oppfinnelse og en farmasøytisk akseptabel bærer.

[0144] Foreliggende oppfinnelse er videre rettet mot anvendelse av slike farmasøytiske preparater ved metoden for behandling av kreft. Spesifikt er foreliggende oppfinnelse rettet mot en fremgangsmåte for behandling av kreft, omfattende administrering av en terapeutisk effektiv mengde av det farmasøytiske preparat ifølge oppfinnelsen.

[0145] Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre fremgangsmåter for frembringelse og anvendelse av vertscellesystemer for fremstilling av glykoformer av ABM ifølge foreliggende oppfinnelse, med økt Fc-reseptor-bindende affinitet, fortrinnsvis økt binding til Fc-aktiverende reseptorer, og/eller med økte effektorfunksjoner, innbefattende antistoffavhengig cellulær cytotoksisitet. Glyko-omarbeidingsmetodikken som kan anvendes med ABM ifølge foreliggende oppfinnelse, er beskrevet mer detaljert i US-patent nr. 6 602 684 og midlertidig US-patentsøknad nr. 60/441 307 og WO 2004/065540; innholdet i hver av disse er i sin helhet medtatt her i dokumentet som referanse. ABM ifølge foreliggende oppfinnelse kan alternativt glyko-omarbeides til å ha reduserte fukoserester i Fc-regionen i henhold til teknikkene beskrevet i EP 1 176 195 A1, hvis hele innhold er medtatt her i dokumentet som referanse.

Frembringelse av cellelinjer for fremstilling av proteiner med forandret glykosyleringsmønster

[0146] Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer vertscelle-ekspresjons-systemer for frembringelse av ABM ifølge foreliggende oppfinnelse med modifiserte glykosyleringsmønstre. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer spesielt vertscellesystemer for frembringelse av glykoformer av ABM ifølge foreliggende oppfinnelse med forbedret terapeutisk verdi. Oppfinnelsen tilveiebringer derfor vertscelle-ekspresjonssystemer valgt eller omarbeidet til å uttrykke et polypeptid med GnTIII-aktivitet. Ved én utførelsesform er polypeptidet med GnTIII-aktivitet et fusjonspolypeptid omfattende Golgi-lokalisasjonsdomènet av et heterologt polypeptid i Golgi-apparatet. Slike vertscelle-ekspresjons-systemer kan spesifikt omarbeides til å omfatte et rekombinant nukleinsyremolekyl som koder for et polypeptid med GnTIII, operabelt knyttet til et konstitutivt eller regulert promotersystem.

[0147] Ved én spesifikk utførelsesform tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en vertscelle som er blitt omarbeidet til å uttrykke minst én nukleinsyre som koder for et fusjonspolypeptid med GnTIII-aktivitet og omfattende Golgi-lokalisasjonsdomènet av et heterologt polypeptid som befinner seg i Golgi-apparatet. Ved ett aspekt er vertscellen omarbeidet med et nukleinsyremolekyl omfattende minst ett gen som koder for et fusjonspolypeptid med GnTIII-aktivitet og omfattende Golgi-lokalisasjonsdomènet av et heterologt polypeptid som befinner seg i Golgi-apparatet.

[0148] Generelt kan hvilken som helst type dyrket cellelinje, innbefattende cellelinjene omtalt ovenfor, anvendes som bakgrunn for omarbeiding av vertscellelinjene ifølge foreliggende oppfinnelse. Ved en foretrukket utførelsesform anvendes CHO-celler, BHK-celler, NS0-celler, SP2/0-celler, YO-myelomceller, P3X63-musemyelomceller, PER-celler, PER.C6-celler eller hybridomceller, andre pattedyrceller, gjærceller, insektceller eller planteceller som bakgrunns-cellelinje for frembringelse av de omarbeidede vertsceller ifølge oppfinnelsen.

[0149] Oppfinnelsen er forutsett å omfatte hvilke som helst omarbeidede vertsceller som uttrykker et polypeptid med GnTIII-aktivitet, innbefattende et fusjonspolypeptid som omfatter Golgi-lokalisasjonsdomènet av et heterologt

polypeptid som befinner seg i Golgi-apparatet, som definert her i dokumentet.

[0150] Én eller flere nukleinsyrer som koder for et polypeptid med GnTIII-aktivitet, kan uttrykkes under kontroll av en konstitutiv promoter, eller alternativt et regulert ekspresjonssystem. Slike systemer er velkjente på området og innbefatter systemene omtalt ovenfor. Hvis flere forskjellige nukleinsyrer som koder for fusjonspolypeptider med GnTIII-aktivitet, og som omfatter Golgi-lokalisasjons-domenet av et heterologt polypeptid som befinner seg i Golgi-apparatet, omfattes i vertscellesystemet, kan noen av dem uttrykkes under kontroll av en konstitutiv promoter, mens andre uttrykkes under kontroll av en regulert promoter. Ekspresjonsnivåer av fusjonspolypeptidene med GnTIII-aktivitet bestemmes ved metodene som er generelt kjent på området, innbefattende Western blot-analyse, Northern blot-analyse, reportergen-ekspresjonsanalyse eller måling av GnTIII-aktivitet. Alternativt kan det anvendes et lektin som bindes til biosyntetiske produkter av GnTIII, for eksempel E_4-PHA-lektin. Alternativt kan det anvendes en funksjonsanalyse som måler den økte Fc-reseptor-binding eller øket effektorfunksjon formidlet av antistoffer dannet av cellene som er omarbeidet med nukleinsyren som koder for et polypeptid med GnTIII-aktivitet.

Identifikasjon av transfektanter eller transformanter som uttrykker proteinet med et modifisert glykosyleringsmønster

[0151] Vertscellene som inneholder kodingssekvensen for et kimærisk ABM med hovedsakelig samme bindingsspesifisitet som for muse-B-Ly1-antistoffet, og som uttrykker de biologisk aktive genprodukter, kan identifiseres ved minst fire generelle fremgangsmåter: (a) DNA-DNA- eller DNA-RNA-hybridisering; (b) tilstedeværelse eller fravær av "markør"-genfunksjoner; (c) fastsettelse av nivået av transkripsjon målt ved ekspresjon av de respektive mRNA-transkripter i vertscellen; og (d) påvisning av genproduktet målt ved immunanalyse eller ved dets biologiske aktivitet.

[0152] Ved den første fremgangsmåte kan tilstedeværelsen av kodings-sekvensen for et kimærisk ABM med hovedsakelig samme bindingsspesifisitet som muse-B-Ly1-antistoffet, og kodingssekvensen for polypeptidet med GnTIII-aktivitet påvises ved DNA-DNA- eller DNA-RNA-hybridisering under anvendelse av prober omfattende nukleotidsekvenser som er homologe med henholdsvis de

respektive kodingssekvenser eller deler eller derivater derav.

[0153] Ved den andre fremgangsmåte kan det rekombinante ekspresjons-vektor/verts-system identifiseres og selekteres basert på tilstedeværelse eller fravær av visse "markør"-genfunksjoner (f.eks. thymidinkinaseaktivitet, resistens overfor antibiotika, resistens overfor metotreksat, transformasjons-fenotype, okklusjons-legemedannelse i baculovirus, osv.). Hvis for eksempel kodingssekvensen for ABM ifølge oppfinnelsen, eller et fragment derav, og kodingsssekvensen for polypeptidet med GnTIII-aktivitet innføres i en markørgensekvens av vektoren, kan rekombinanter inneholdende de respektive kodingssekvenser identifiseres ved fraværet av markørgenfunksjonen. Alternativt kan et markørgen anbringes i tandem med kodingssekvensene under kontroll av den samme eller annen promoter anvendt til regulering av ekspresjonen av kodingssekvensene. Ekspresjon av markøren som svar på induksjon eller seleksjon angir ekspresjon av kodingssekvensen for ABM ifølge oppfinnelsen og kodingssekvensen for polypeptidet med GnTIII-aktivitet.

[0154] Ved den tredje fremgangsmåte kan transkripsjonsaktivitet for kodingsregionen for ABM ifølge oppfinnelsen, eller et fragment derav, og kodings-sekvensen for polypeptidet med GnTIII-aktivitet, fastsettes ved hybridiserings-forsøk. For eksempel kan RNA isoleres og analyseres ved hjelp av Northern blot under anvendelse av en probe som er homolog til kodingssekvensene for ABM ifølge oppfinnelsen, eller et fragment derav, og kodingssekvensen for polypeptidet med GnTIII-aktivitet eller spesielle deler derav. Alternativt kan total mengde nukleinsyrer i vertscellen ekstraheres og analyseres med henblikk på hybridisering til slike prober.

[0155] Ved den fjerde fremgangsmåte kan ekspresjonen av proteinproduktene fastsettes immunologisk, for eksempel ved Western blot, immunanalyser så som radioimmunpresipitasjon, enzymbundne immunanalyser og liknende. Den endelige test angående vellykkethet av ekspresjonssystemet innbefatter imidlertid påvisning av de biologisk aktive genprodukter.

Frembringelse og anvendelse av ABM med økt effektorfunksjon innbefattende antistoffavhengig cellulær cytotoksisitet

[0156] Ved foretrukne utførelsesformer tilveiebringer foreliggende

oppfinnelse glykoformer av kimæriske ABM med hovedsakelig samme bindingsspesifisitet som for muse-B-Ly1-antistoffet og med øket effektorfunksjon innbefattende antistoffavhengig cellulær cytotoksisitet. Glykosyleringsomarbeiding av antistoffer er beskrevet tidligere. Se f.eks. US-patent nr. 6 602 684, i sin helhet medtatt her i dokumentet som referanse.

[0157] Kliniske forsøk angående ukonjugerte monoklonale antistoffer (mAb) for behandling av noen typer kreft har nylig gitt oppmuntrende resultater. Dillman, *Cancer Biother. Radiopharm.* 12:223-25 (1997); Deo *et at, Immunology Today* 18:127 (1997). Et kimærisk, ukonjugert IgG1 er godkjent for lavgradig eller follikulært ikke-Hodgkins B-celle-lymfom. Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12:223-25 (1997), mens et annet ukonjugert mAb, et humanisert IgG1 som søker mot faste brysttumorer, også har vist lovende resultater i kliniske forsøk fase III. Deo et al., *Immunology Today* 18:127 (1997). Antigenene for disse to mAb uttrykkes sterkt i sine respektive tumorceller, og antistoffene formidler potent tumorødeleggelse ved effektorceller in vitro og in vivo. I motsetning til dette kan mange andre ukonjugerte mAb med fine tumorspesifisiteter ikke trigge effektorfunksjoner med tilstrekkelig potens til at det er klinisk anvendelig. Frost et al., *Cancer* 80:317-33 (1997); Surfus et al., *J. Immunother.* 19:184-91 (1996). Når det gjelder noen av disse svakere mAb, blir hjerper-cytokinterapi testet for tiden. Tilsetting av cytokiner kan stimulere antistoffavhengig cellulær cytotoksisitet (ADCC) ved øking av aktiviteten og antallet av sirkulerende lymfocytter. Frost et al., *Cancer* 80:317-33 (1997); Surfus *et at, J. Immunother.* 19:184-91 (1996). ADCC, et lytisk angrep på antistoff-målsøkte celler, trigges ved binding av leukocyttreseptorer til den konstante region (Fc) av antistoffer. Deo et al., *Immunology Today* 18:127 (1997).

[0158] En annen, men komplementerende, fremgangsmåte for øking av ADCC-aktiviteten av ukonjugerte IgG1 er å omarbeide Fc-regionen av antistoffet. Proteinomarbeidingsundersøkelser har vist at FcγR interagerer med den lavere hengselregion av IgG CH2-domènet. Lund et al., *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996). FcγR-binding fordrer imidlertid også tilstedeværelse av oligosakkarider som er kovalent knyttet til det konserverte Asn 297 i CH2-regionen. Lund et al., *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996); Wright og Morrison, *Trends Biotech.* 15:26-31 (1997), noe som tyder på at både oligosakkarid og

polypeptid bidrar direkte til interaksjonssetet, eller at oligosakkaridet trenges for opprettholdelse av en aktiv CH2-polypeptidkonformasjon. Modifikasjon av oligosakkaridstrukturen kan derfor utforskes som middel for å øke affiniteten ved interaksjonen.

[0159] Et IgG-molekyl bærer to N-bundne oligosakkarider i Fc-regionen, ett på hver tung kjede. Som hvilket som helst glykoprotein, frembringes et antistoff som en populasjon av glykoformer som har samme polypeptidskjelett, men som har forskjellige oligosakkarider knyttet til glykosyleringssetene. Oligosakkaridene som normalt finnes i Fc-regionen av serum-IgG, er av kompleks toantennetype (Wormald et al., *Biochemistry* 36:130-38 (1997), med et lavt nivå av terminal sialinsyre og todelende N-acetylglukosamin (GlnNAc), og en variabel grad av terminal galaktosylering og kjerne-fukosylering. Noen undersøkelser tyder på at den minimale karbohydratstruktur som trenges for FcγR-binding, ligger innenfor oligosakkaridkjernen. Lund et al., *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996).

[0160] De muse- eller hamsteravledede cellelinjer som anvendes i industrien og akademien for dannelse av ukonjugerte terapeutiske mAb, knytter normalt de fordrede oligosakkarid-determinanter til Fc-seter. IgG som uttrykkes i disse cellelinjer, mangler imidlertid det todelende GlcNAc som finnes i små mengder i serum-IgG. Lifely et al., *Glycobiology* 318:813-22 (1995). I motsetning til dette er det nylig observert at et rottemyelom-frembrakt, humanisert IgG1 (CAMPATH-1H) bar et todelende GlcNAc i noen av sine glykoformer. Lifely et al., *Glycobiology* 318:813-22 (1995). Det rottecelleavledede antistoff nådde en liknende maksimal in vitro-ADCC-aktivitet som CAMPATH-1H-antistoffer dannet i standardcellelinjer, men i betydelig lavere antistoffkonsentrasjoner.

[0161] CAMPATH-antigenet er normalt til stede i høye nivåer på lymfomceller, og dette kimæriske mAb har høy ADCC-aktivitet i fravær av et todelende GlcNAc. Lifely et al., *Glycobiology* 318:813-22 (1995). I den N-bundne glykosyleringsvei tilføyes et todelende GlcNAc ved GnTIII. Schachter, *Biochem. Cell Biol.* 64:163-81 (1986).

[0162] Tidligere undersøkelser anvendte en enkelt antistoff-produserende CHO-cellelinje som på forhånd var blitt omarbeidet til på en eksternt regulert måte å uttrykke forskjellige nivåer av et klonet GnTIII-gen-

enzym (Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999)). Denne fremgangsmåte påviste for første gang en meget nøyaktig korrelasjon mellom ekspresjon av GnTIII og ADCC-aktiviteten av det modifiserte antistoff. Oppfinnelsen forutsetter således også et rekombinant, kimærisk antistoff eller et fragment derav med bindingsspesifisitet som for muse-B-Ly1-antistoffet, med forandret glykosylering som resultat av øket GnTIII-aktivitet. Den økte GnTIII-aktivitet resulterer i en økning i prosentandelen av todelte oligosakkarider, samt en reduksjon i prosentandelen av fukoserester, i Fc-regionen av ABM. Dette antistoff, eller fragmentet derav, har øket Fc-reseptor-bindende affinitet og øket effektorfunksjon. Oppfinnelsen er dessuten rettet mot et antistoff-fragment og fusjonsproteiner omfattende en region som er ekvivalent med Fc-regionen av immunglobuliner.

Terapeutiske anvendelser av ABM fremstilt i henhold til fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen.

[0163] ABM ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes alene til å målsøke og drepe tumorceller in vivo. ABM kan også anvendes i forbindelse med et passende terapeutisk middel til behandling av humant karsinom. For eksempel kan ABM anvendes i kombinasjon med standard- eller vanlige behandlingsmetoder så som kjemoterapi eller bestrålings-terapi, eller de kan konjugeres eller knyttes til et terapeutisk medikament eller toksin, samt til et lymfokin eller en tumorinhiberende vekstfaktor, for avgivelse av det terapeutiske middel til stedet for karsinomet. Konjugatene av ABM ifølge denne oppfinnelse som er av største betydning, er (1) immuntoksiner (konjugater av ABM og en cytotoksisk del) og (2) merkede (f.eks. radiomerkede, enzym-merkede eller fluorkrom-merkede) ABM hvor merkesubstansen tilveiebringer et middel for identifisering av immun-komplekser som innbefatter det merkede ABM. ABM kan også anvendes til indusering av lyse gjennom den naturlige komplementprosess, og til å interagere med antistoffavhengige cytotoksiske celler som normalt er til stede.

[0164] Den cytotoksiske del av immuntoksinet kan være et cytotoksisk medikament eller et enzymatisk aktivt toksin av bakterie- eller plante-

opprinnelse, eller et enzymatisk aktivt fragment ("A-kjede") av et slikt toksin. Enzymatisk aktive toksiner og fragmenter derav som anvendes, er 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, Phytolacca americana-proteiner (PAPI, PAPII og PAP-S), momordica charantia-inhibitor, curcin, crotin, sapaonaria officinalis-inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, fenomycin og enomycin. Ved en annen utførelsesform blir ABM konjugert til småmolekylære antikreftmedikamenter. Konjugater av ABM og slike cytotoksiske deler lages under anvendelse av forskjellige bifunksjonelle proteinkoplingsmidler. Eksempler på slike reagenser er SPDP, IT, bifunksjonelle derivater av imidoestere så som dimetyladipimidat-HCl, aktive estere så som disuksinimidylsuberat, aldehyder så som glutaraldehyd, bis-azidoforbindelser så som bis(p-azidobenzoyl)heksandiamin, bis-diazoniumderivater så som bis(p-diazoniumbenzoyl)-etylendiamin, diisocyanater så som tolylen-2,6-diisocyanat, og bis-aktive fluorforfindelser så som 1,5-difluor-2,4-dinitrobenzen. Den lyserende del av et toksin kan knyttes til Fab-fragmentet av ABM. Ytterligere passende toksiner er kjent på området, som vist i f.eks. publisert US-patentsøknad nr. 2002/0128448, i sin helhet medtatt her i dokumentet som referanse.

[0165] Ved én utførelsesform blir et kimærisk, glyko-omarbeidet ABM med hovedsakelig samme bindingsspesifisitet som for muse-B-Ly1-antistoffet, konjugert til ricin A-kjede. Mest fordelaktig blir ricin A-kjeden deglykosylert og frembrakt ved rekombinante metoder. En fordelaktig metode for fremstilling av ricin-immuntoksinet er beskrevet i Vitetta et al., *Science* 238, 1098 (1987), medtatt her i dokumentet som referanse.

[0166] Anvendt til å drepe humane kreftceller in vitro for diagnostiske formål vil konjugatene typisk bli tilsatt til celledyrkningsmediet i en konsentrasjon på minst ca. 10 nM. Formuleringen og administreringsmåten for in vitro-anvendelse er ikke avgjørende. Vandige formuleringer som er kompatible med dyrknings- eller perfusjonsmediet, vil normalt bli anvendt. Cytotoksisitet kan avleses ved konvensjonelle teknikker for bestemmelse av tilstedeværelse eller graden av kreft.

[0167] Som omtalt ovenfor, kan det lages et cytotoksisk radio-

farmasøytisk middel for behandling av kreft ved konjugering av en radioaktiv isotop (f.eks. I, Y, Pr) til et kimærisk, glyko-omarbeidet ABM med hovedsakelig samme bindingsspesifisitet som for muse-B-Ly1-antistoffet. Betegnelsen "cytotoksisk del" anvendt her i dokumentet er ment å innbefatte slike isotoper.

[0168] Ved en annen utførelsesform fylles liposomer med et cytotoksisk medikament, og liposomene belegges med ABM ifølge foreliggende oppfinnelse. På grunn av at det er mange CD20-molekyler på overflaten av den maligne B-celle, muliggjør denne metode avgivelse av store mengder medikament til den riktige celletype.

[0169] Teknikker for konjugering av slike terapeutiske midler til antistoffer er velkjente (se f.eks. Arnon et al., "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", i *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (red.), s. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", i *Controlled Drug Delivery* (2. utg.), Robinson et al. (red.), s. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", i *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications,* Pinchera et al. (red.), s. 475-506 (1985); og Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982)).

[0170] Enda andre terapeutiske anvendelser for ABM ifølge oppfinnelsen innbefatter konjugering eller binding, f.eks. ved rekombinante DNA-teknikker, til et enzym som er i stand til å omdanne en prodroge til et cytotoksisk medikament, og anvendelse av dette antistoff-enzym-konjugat i kombinasjon med prodrogen til omdannelse av prodrogen til et cytotoksisk middel på tumorstedet (se f.eks. Senter et al., "Anti-Tumor Effects of Antibody-alkaline Phosphatase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4842-46 (1988); "Enhancement of the in vitro and in vivo Antitumor Activities of Phosphorylated Mitocycin C and Etoposide Derivatives by Monoclonal Antibody-Alkaline Phosphatase Conjugates", Cancer Research 49:5789-5792 (1989); og Senter, "Activation of Prodrugs by Antibody-Enzyme Conjugates: A New Approach to Cancer Therapy," *FASEB J. 4*:188-193 (1990)).

[0171] Enda en annen terapeutisk anvendelse for ABM ifølge oppfinnelsen innbefatter anvendelse, enten ukonjugert, i nærvær av komplement, eller som en del av et antistoff-medikament- eller antistoff-toksin-konjugat, til fjerning av tumorceller fra benmargen hos kreftpasienter. I henhold til denne fremgangsmåte kan autolog benmarg utspyles ex vivo ved behandling med antistoffet, og margen infunderes tilbake i pasienten [se f.eks. Ramsay et al., "Bone Marrow Purging Using Monoclonal Antibodies", *J Clin. Immunol.*, 8(2):81-88 (1988)].

[0172] Det er videre forutsett at oppfinnelsen omfatter et enkeltkjedet immuntoksin omfattende antigenbindende doméner som muliggjør hovedsakelig samme bindingsspesifisitet som muse-B-Ly1-antistoffet (f.eks. polypeptider omfattende CDR av muse-B-Ly1-antistoffet) og videre omfatter et toksin-polypeptid. Enkeltkjede-immuntoksinene ifølge oppfinnelsen kan anvendes til behandling av humant karsinom in vivo.

[0173] Likeledes kan det anvendes et fusjonsprotein omfattende minst den antigenbindende region av et ABM ifølge oppfinnelsen knyttet til minst en funksjonelt aktiv del av et andre protein med antitumoraktivitet, f.eks. et lymfokin eller onkostatin, til behandling av humant karsinom in vivo.

[0174] Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en fremgangsmåte for selektiv dreping av tumorceller som uttrykker CD20. Denne metode omfatter omsetting av immunkonjugatet (f.eks. immuntoksinet) ifølge oppfinnelsen med tumorcellene. Disse tumorceller kan være fra et humant karsinom.

[0175] Denne oppfinnelse tilveiebringer dessuten en metode for behandling av karsinomer (for eksempel humane karsinomer) in vivo. Denne metode omfatter administrering til et individ av en farmasøytisk effektiv mengde av et preparat inneholdende minst ett av immunkonjugatene (f.eks. immuntoksinet) ifølge oppfinnelsen.

[0176] Ved et ytterligere aspekt er oppfinnelsen rettet mot en forbedret metode for behandling av B-celle-proliferative forstyrrelser innbefattende B-celle-lymfom, samt en autoimmun sykdom frembrakt helt eller delvis av patogene autoantistoffer, basert på B-celle-uttømming, omfattende administrering av en terapeutisk effektiv mengde av et ABM ifølge foreliggende oppfinnelse til et menneske som trenger det. Ved en foretrukket utførelsesform er ABM et glyko-omdannet anti-CD20-antistoff med en bindingsspesifisitet som er hovedsakelig den samme som for muse-B-Ly1-

antistoffet. Ved en annen foretrukket utførelsesform er antistoffet humanisert. Eksempler på autoimmune sykdommer eller forstyrrelser innbefatter, men er ikke begrenset til, immunmedierte trombocytopenier, så som akutt idiopatisk trombocytopenisk purpura og kronisk idiopatisk trombocytopenisk purpura, dermatomyositt, Sydenhams chorea, lupusnefritt, reumatisk feber, polyglandulære syndromer, Henoch-Schonlein purpura, post-streptokokk-nefritt, erythema nodosum, Takayasus arteritt, Addisons sykdom, erythema multiforme, polyarteritis nodosa, ankyloserende spondylitt, Goodpastures syndrom, tromboangitis ubiterans, primær biliær cirrhose, Hashimotos tyreoiditt, tyreotoksikose, kronisk aktiv hepatitt, polymyositt/dermatomyositt, polykondritt, pamphigus vulgaris, Wegeners granulomatose, membranøs nefropati, amyotrofisk lateral sklerose, tabes dorsalis, polymyaglia, perniciøs anemi, "rapidly progressive" glomerulonefritt og fibroserende alveolitt, inflammatoriske responser så som inflammatoriske hudsykdommer innbefattende psoriasis og dermatitt (f.eks. atopisk dermatitt); systemisk skleroderma og sklerose; responser forbundet med inflammatorisk tarmsykdom (så som Crohns sykdom og ulcerøs kolitt); åndenødssyndrom (inbefattende akutt åndenødssyndrom; ARDS); dermatitt; meningitt; encefalitt; uveitt; kolitt; glomerulonefritt; allergiske tilstander så som eksem og astma, og andre tilstander som innbefatter infiltrasjon av T-celler og kroniske inflammatoriske responser; aterosklerose; leukocytt-adhesjonsdefekt; reumatoid artritt; systemisk lupus erythematosus (SLE); diabetes mellitus (f.eks. diabetes mellitus type 1, eller insulinavhengig diabetes mellitus); multippel sklerose; Reynauds syndrom; autoimmun tyreoiditt; allergisk encefalomyelitt; Sjögrens syndrom; juvenil diabetes; og immunresponser forbundet med akutt og forsinket hypersensitivitet mediert ved cytokiner og T-lymfocytter som typisk finnes ved tuberkulose, sarkoidose, polymyositt, granulomatose og vaskulitt; perniciøs anemi (Addisons sykdom); sykdommer som innbefatter leukocytt-diapedese; inflammatorisk forstyrrelse i sentralnervesystemet (CNS); multippelt organskadesyndrom; hemolytisk anemi (innbefattende, men ikke begrenset til, kryoglobulinemi eller Coombs positive anemi); myasthenia gravis; antigen-antistoff-kompleks-medierte sykdommer; anti-glomerulær basalmembran-sykdom; antifosfolipidsyndrom; allergisk neuritt; Graves' sykdom; myastenisk Eaton-Lamberts syndrom;

bulløst pemfigoid; pemfigus; autoimmune polyendokrinopatier; Reiters sykdom; "stiff man"-syndrom; Behcets sykdom; kjempecellearteritt; immunkompleks-nefritt; IgA-nefropati; IgM-polyneuropatier; idiopatisk trombocytopenisk purpura (ITP) eller autoimmun trombocytopeni osv. Ved dette aspekt ved oppfinnelsen anvendes ABM ifølge oppfinnelsen til tømming av blodet for normale B-celler i et langvarig tridsrom.

[0177] I henhold til praksisen ifølge denne oppfinnelsen kan individet være et menneske-, heste-, grise-, bovint, muse-, hunde-, katte- og fugleindivid. Andre varmblodige dyr inngår også i denne oppfinnelse.

[0178] Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre metoder for hemming av veksten av humane tumorceller, behandling av en tumor i et individ og behandling av en proliferativ sykdomstype hos et individ. Disse metoder omfatter administrering til individet av en effektiv mengde av preparatet ifølge oppfinnelsen.

[0179] Det er derfor klart at foreliggende oppfinnelse omfatter farmasøytiske preparater, kombinasjoner og metoder for behandling av humane karsinomer, så som et B-celle-lymfom. For eksempel innbefatter oppfinnelsen farmasøytiske preparater for anvendelse ved behandling av humane karsinomer, omfattende en farmasøytisk effektiv mengde av et antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse og en farmasøytisk akseptabel bærer.

[0180] ABM-preparatene ifølge oppfinnelsen kan administreres under anvendelse av konvensjonelle administreringsmåter innbefattende, men ikke begrenset til, intravenøs, intraperitoneal, oral, intralymfatisk eller administrering direkte i tumoren. Intravenøs administrering er foretrukket.

[0181] Ved ett aspekt ved oppfinnelsen tilberedes terapeutiske utformninger inneholdende ABM ifølge oppfinnelsen for lagring ved blanding av et antistoff med den ønskede grad av renhet med eventuelle farmasøytisk akseptable bærere, tilsetningsmidler eller stabilisatorer (Remington's Pharmaceutical Sciences 16. utgave, Osol, A. red. (1980)), i form av lyofiliserte formuleringer eller vandige løsninger. Akseptable bærere, tilsetningsmidler eller stabilisatorer er ikke-toksiske for mottakere i de anvendte doser og konsentrasjoner, og innbefatter buffere så som fosfat, citrat og andre organiske syrer; antioksidanter innbefattende askorbinsyre og

metionin; konserveringsmidler (så som oktadekyldimetylbenzyl-ammonium-klorid; heksametoniumklorid; benzalkoniumklorid, benzetoniumklorid; fenol, butyl- eller benzylalkohol; alkylparabener så som metyl- eller propylparaben; katekol; resorcinol; cykloheksanol; 3-pentanol; og m-kresol); lavmolekylære (mindre enn ca. 10 rester) polypeptider; proteiner, så som serumalbumin, gelatin eller immunglobuliner; hydrofile polymerer så som polyvinylpyrrolidon; aminosyrer så som glycin, glutamin, asparagin, histidin, arginin eller lysin; monosakkarider, disakkarider og andre karbohydrater innbefattende glukose, mannose eller dekstriner; chelateringsmidler så som EDTA; sukkerarter så som sakkarose, mannitol, trehalose og sorbitol; saltdannende mot-ioner så som natrium; metallkomplekser (f.eks. Zn-protein-komplekser); og/eller ikke-ioniske overflateaktive midler så som TWEEN™, PLURONICS™ eller polyetylenglykol (PEG).

[0182] Eksempler på anti-CD20-ABM-formuleringer er beskrevet i WO98/56418, uttrykkelig medtatt her i dokumentet som referanse. Denne publikasjon beskriver en flytende flerdoseformulering omfattende 40 mg/ml rituximab, 25 mM acetat, 150 mM trehalose, 0,9% benzylalkohol, 0,02% polysorbat 20 ved pH 5,0 som har en minimal holdbarhet på to års lagring ved 2-8°C. En annen aktuell anti-CD20-formulering omfatter 10 mg/ml rituximab i 9,0 mg/ml natriumklorid, 7,35 mg/ml natriumcitrat-dihydrat, 0,7 mg/ml polysorbat 80 og sterilt vann for injeksjon, pH 6,5. Ved foreliggende oppfinnelse vil RITUXAN® bli erstattet med et ABM ifølge foreliggende oppfinnelse.

[0183] Lyofiliserte formuleringer tilpasset for subkutan administrering er beskrevet i WO97/04801. Slike lyofiliserte formuleringer kan rekondisjoneres med et egnet fortynningsmiddel til høy proteinkonsentrasjon, og den rekondisjonerte formulering kan administreres subkutant til pattedyret som skal behandles i det foreliggende.

[0184] Formuleringen i det foreliggende kan også inneholde mer enn én aktiv forbindelse etter som det er nødvendig for den spesielle indikasjon som behandles, fortrinnsvis slike med komplementære aktiviteter som ikke på uheldig måte påvirker hverandre. Det kan for eksempel være ønskelig videre å tilveiebringe et cytotoksisk middel, et kjemoterapeutisk middel, et cytokin eller et immunundertrykkende middel (f.eks. et middel som virker på

T-celler, så som cyklosporin eller et antistoff som binder T-celler, f.eks. ett som binder LFA-1). Den effektive mengde av slike andre midler avhenger av mengden av antagonist som finnes i formuleringen, typen sykdom eller forstyrrelse eller behandling, samt andre faktorer omtalt ovenfor. Disse anvendes vanligvis i samme doseringer og med administreringsmåter som anvendt i det foregående, eller omtrent fra 1 til 99% av de hittil anvendte doser.

[0185] De aktive bestanddeler kan også innfanges i mikrokapsler som for eksempel er fremstilt ved koacervasjonsteknikker eller ved grenseflatepolymerisering, for eksempel hydroksymetylcellulose, eller henholdsvis gelatin-mikrokapsler og poly(metylmetakrylat)-mikrokapsler, i kolloidale medikamentavgivelsessystemer (for eksempel liposomer, albumin-mikrokuler, mikroemulsjoner, nanopartikler og nanokapsler) eller i makroemulsjoner. Slike teknikker er beskrevet i Remington's Pharmaceutical Sciences 16. utgave, Osol, A. red. (1980).

[0186] Det kan fremstilles preparater med langvarig frigjøring. Egnede eksempler på preparater med langvarig frigjøring innbefatter semipermeable matrikser av faste hydrofobe polymerer inneholdende antagonisten, hvilke matrikser er i form av formede artikler, f.eks. filmer, eller mikrokapsler. Eksempler på matrikser for langvarig frigjøring innbefatter polyestere, hydrogeler (for eksempel poly(2-hydroksyetylmetakrylat), eller poly(vinylalkohol)), polylaktider (US-patent nr. 3 773 919), kopolymerer av L-glutaminsyre og γetyl-L-glutamat, ikke-nedbrybart etylen-vinylacetat, nedbrytbare melkesyre-glykolsyre-kopolymerer så som LUPRON DEPOT™ (injiserbare mikrokuler bestående av melkesyre-glykolsyre-kopolymer og leuprolidacetat), og poly-D-(-)-3-hydroksysmørsyre.

[0187] Formuleringene for anvendelse for in vivo-administrering må være sterile. Dette oppnås lett ved filtrering gjennom sterilfiltrerings-membraner.

[0188] Preparatene ifølge oppfinnelsen kan være i mange forskjellige doseringsformer som innbefatter, men er ikke begrenset til, flytende løsninger eller suspensjoner, tabletter, piller, pulvere, stikkpiller, polymere mikrokapsler eller mikrovesikler, liposomer og injiserbare eller infunderbare løsninger. Den foretrukne form avhenger av administreringsmåten og den

terapeutiske anvendelse.

[0189] Preparatene ifølge oppfinnelsen innbefatter også fortrinnsvis konvensjonelle farmasøytisk akseptable bærere og adjuvanser kjent på området, så som humant serumalbumin, ionebyttere, aluminiumoksid, lecitin, buffersubstanser så som fosfater, glycin, sorbinsyre, kaliumsorbat, og salter eller elektrolytter så som protaminsulfat.

[0190] Den mest effektive administreringsmåte og doseringsregime for de farmasøytiske preparater ifølge denne oppfinnelse avhenger av graden og forløpet av sykdommen, pasientens helse og respons overfor behandling og den behandlende leges bedømmelse. Dosene av preparatene bør følgelig titreres til den individuelle pasient. Ikke desto mindre vil en effektiv dose av preparatene ifølge denne oppfinnelse vanligvis være i området fra ca. 0,01 til ca. 2000 mg/kg.

[0191] Molekylene beskrevet her i dokumentet kan være i mange forskjellige doseringsformer som innbefatter, men er ikke begrenset til, flytende løsninger eller suspensjoner, tabletter, piller, pulvere, stikkpiller, polymere mikrokapsler eller mikrovesikler, liposomer, og injiserbare eller infunderbare løsninger. Den foretrukne form avhenger av administreringsmåten og den terapeutiske anvendelse.

[0192] Preparatet omfattende et ABM ifølge foreliggende oppfinnelse vil bli formulert, dosert og administrert på en måte i overensstemmelse med god medisinsk praksis. Faktorer for overveielse i denne forbindelse innbefatter den spesielle sykdom eller forstyrrelse som behandles, det spesielle pattedyr som behandles, den kliniske tilstand for den individuelle pasient, forløpet av sykdommen eller forstyrrelsen, stedet for avgivelse av midlet, administreringsmetoden, timeplanen for administrering og andre faktorer kjent for praktiserende leger. Den terapeutisk effektive mengde av antagonisten som skal administreres, vil bli styrt av slike hensyn.

[0193] Som et generelt forslag vil den terapeutisk effektive mengde av antistoffet administrert parenteralt pr. dose være i området ca. 0,1 til 20 mg/kg pasient-kroppsvekt pr. dag, hvor det typiske innledende område for anvendt antagonist er i området ca. 2-10 mg/kg.

[0194] Ved en foretrukket utførelsesform er ABM et antistoff, fortrinnsvis et humanisert antistoff. Egnede doser for et slikt ukonjugert

antistoff er for eksempel i området fra ca. 20 mg/m^2 til ca. 1000 mg/m^2. Ved én utførelsesform er doseringen av antistoffet forskjellig fra det som for tiden anbefales for RITUXAN®. Man kan for eksempel administrere til pasienten én eller flere doser med hovedsakelig mindre enn 375 mg/m^2 av antistoffet, f.eks. hvor dosen er i området fra ca. 20 mg/m^2 til ca. 250 mg/m^2, for eksempel fra ca. 50 mg/m^2 til ca. 200 mg/m^2.

[0195] Man kan videre administrere én eller flere innledende doser av antistoffet, fulgt av én eller flere påfølgende doser, hvor mg/m^2 dose for antistoffet i påfølgende dose(r) overstiger mg/m^2 dose av antistoffet i den (de) innledende dose(r). Den innledende dose kan for eksempel være i området fra ca. 20 mg/m^2 til ca. 250 mg/m^2 (f.eks. fra ca. 50 mg/m^2 til ca. 200 mg/m^2), og den påfølgende dose kan være i området fra ca. 250 mg/m^2 til ca. 1000 mg/m^2.

[0196] Som angitt ovenfor, er imidlertid disse foreslåtte mengder av ABM gjenstand for en stor del terapeutisk skjønn. Nøkkelfaktoren ved utvelging av en passende dose og program er det oppnådde resultat, som angitt ovenfor. Det kan for eksempel trenges relativt høyere doser innledningsvis for behandling av pågående og akutte sykdommer. For oppnåelse av de mest effektive resultater, avhengig av sykdommen eller forstyrrelsen, blir antagonisten administrert så nær det første tegn på, diagnostisering av, tilsynekomst eller fremkomst av sykdommen eller forstyrrelsen som mulig eller under remisjon av sykdommen eller forstyrrelsen.

[0197] ABM ifølge foreliggende oppfinnelse administreres på hvilken som helst egnet måte, innbefattende parenteralt, subkutant, intraperitonealt, intrapulmonalt og intranasalt, og, hvis ønskelig for lokal immunsuppressiv behandling, intralesjonal administrering. Parenterale infusjoner innbefatter intramuskulær, intravenøs, intraarteriell, intraperitoneal eller subkutan administrering. Dessuten kan antagonist passende administreres ved pulsinfusjon, f.eks. med avtakende doser av antagonisten. Doseringen gis fortrinnsvis ved injeksjoner, mest foretrukket intravenøs eller subkutan injeksjon, avhengig delvis av om hvorvidet administreringen er kort eller kronisk.

[0198] Man kan administrere andre forbindelser, så som cytotoksiske midler, kjemoterapeutiske midler, immunsuppressive midler og/eller cytokiner med antagonistene i det foreliggende. Den kombinerte administrering innbefatter

koadministrering under anvendelse av separate formuleringer eller en enkelt farmasøytisk formulering, og på hverandre følgende administrering i hvilken som helst rekkefølge, hvor det fortrinnsvis er et tidsrom hvor begge (eller alle) aktive midler samtidig utøver sine biologiske aktiviteter.

[0199] Det vil være klart at dosen av preparatet ifølge oppfinnelsen som trenges for oppnåelse av helbredelse, kan reduseres ytterligere med tidsplanoptimalisering.

[0200] I henhold til praksisen ifølge oppfinnelsen kan den farmasøytiske bærer være en lipidbærer. Lipidbæreren kan være et fosfolipid. Videre kan lipidbæreren være en fettsyre. Lipidbæreren kan også være en detergent. Anvendt her i dokumentet er en detergent hvilken som helst substans som forandrer en væskes overflatespenning, generelt reduserer den.

[0201] Ved ett eksempel ifølge oppfinnelsen kan detergenten være en ikke-ionisk detergent. Eksempler på ikke-ioniske detergenter innbefatter, men er ikke begrenset til, polysorbat 80 (også kjent som Tween 80 eller (polyoksyetylen-sorbitan-monooleat), Brij og Triton (for eksempel Triton WR-1339 og Triton A-20).

[0202] Detergenten kan alternativt være en ionisk detergent. Et eksempel på en ionisk detergent innbefatter, men er ikke begrenset til, alkyltrimetyl-ammoniumbromid.

[0203] I henhold til oppfinnelsen kan lipidbæreren dessuten være et liposom. Anvendt i denne patentsøknad er et "liposom" hvilken som helst membranbundet vesikkel som inneholder hvilke som helst molekyler ifølge oppfinnelsen eller kombinasjoner derav.

[0204] Eksemplene nedenfor forklarer oppfinnelsen mer detaljert. Følgende preparater og eksempler er gitt for at fagfolk på området klarere skal kunne forstå og utøve foreliggende oppfinnelse. Foreliggende oppfinnelse er imidlertid ikke begrenset med hensyn til ramme ved de eksemplifiserte utførelsesformer, som kun er påtenkt som illustrasjoner av enkeltaspekter ved oppfinnelsen, og metoder som er funksjonelt ekvivalente, er innenfor oppfinnelsens ramme. Faktisk vil forskjellige modifikasjoner av oppfinnelsen, i tillegg til dem som er beskrevet her i dokumentet, bli åpenbare for fagfolk på området ut fra foranstående beskrivelse og de medfølgende tegninger. Slike modifikasjoner er påtenkt å ligge innenfor rammen for de tilknyttede krav.

EKSEMPLER

[BEMERK: Dersom ikke annet er spesifisert, er henvisninger til nummereringen av spesifikke aminosyrerest-stillinger i følgende eksempler i henhold til Kabat-nummereringssystemet].

EKSEMPEL 1

Materialer og metoder

Kloning og ekspresjon av rekombinant antistoff B-Ly1

[0205] B-Ly1-uttrykkende hybridomceller ble dyrket i RPMI inneholdende 10% FBS og 4 mM L-glutamin. 6 x 10^6 celler med levedyktighet > 90% ble høstet, og total-RNA ble isolert under anvendelse av et Qiagen RNAeasy midi-sett. cDNA som kodet for de variable lette og tunge kjeder av B-Ly1, ble amplifisert ved RT-PCR. RT-PCR-reaksjonen ble utført under anvendelse av følgende betingelser: 30 min 50°C for førstestreng-cDNA syntese; 15 min 95°C begynnelsesdenaturering; 30 sykluser på 1 min 94°C, 1 min 45°C, 1,5 min 72°C; og et endelig forlengelsestrinn i 10 min ved 72°C. Den forventede størrelse av PCR-produktene ble bekreftet ved gel-elektroforese. PCR-produktene ble klonet i passende E. coli-vektorer, og DNA-sekvensering bekreftet at de variable lett- og tungkjede-kodende gener var isolert.

[0206] For konstruksjon av kimæriske B-Ly1-ekspresjonsvektorer ble syntesesignalsekvenser og passende restriksjonsseter koplet til de variable kjeder ved ytterligere PCR-reaksjoner. Etter en endelig bekreftelse av den riktige DNA-sekvens for de variable kjeder, ble de kombinert med de tilsvarende humane konstante IgG1-regioner. Etter at genene var konstruert, ble de klonet under kontroll av av MPSV-promoteren og oppstrøms for et syntetisk polyA-sete, under anvendelse av to separate vektorer, én for hver kjede, som resulterte i plasmidene pETR1808 (tungkjede-ekspresjonsvektor) og pETR1813 (lettkjede-ekspresjonsvektor). Hver vektor bar en EBV OriP-sekvens.

[0207] Kimærisk B-Ly1 ble frembrakt ved ko-transfektering av HEK293-EBNA-celler med vektorer pETR1808 og pETR1813 under anvendelse av en kalsumfosfat-transfekteringsmetode. Eksponensielt voksende HEK293-EBNA-celler ble transfektert ved kalsiumfosfatmetoden. Cellene ble dyrket som tilheftende monolag-kulturer i T-kolber under anvendelse av DMEM-dyrkningsmedium supplert med 10% FCS, og ble transfektert når de var mellom

50 og 80% konfluente. For transfektering av en T75-kolbe ble 8 millioner celler utsådd 24 timer før transfektering i 14 ml DMEM-dyrkningsmedium supplert med FCS (i en endelig konsentrasjon på 10 volum%), 250 µg/ml neomycin, og cellene ble anbrakt ved 37°C i en inkubator med 5% CO_2-atmosfære natten over. For hver T75-kolbe som skulle transfekteres ble det tilberedt en løsning av DNA, $CaCl_2$ og vann ved blanding av 47 µg total plasmidvektor-DNA delt likt mellom lett- og tungkjede-ekspresjonsvektorene, 235 µl av en 1M $CaCl_2$-løsning og tilsetting av vann til et sluttvolum på 469 µl. Til denne løsning ble det tilsatt 469 µl av en løsning av 50 mM HEPES og 280 mM NaCl, 1,5 mM Na_2HPO_4-løsning ved pH 7,05 ble tilsatt, og det ble umiddelbart blandet i 10 sek. og fikk stå ved romtemperatur i 20 sek. Suspensjonen ble fortynnet med 12 ml DMEM supplert med 2% FCS, og tilsatt til T75 i stedet for det eksisterende medium. Cellene ble inkubert ved 37°C og 5% CO_2 i ca. 17-20 timer, og medium ble deretter erstattet med 12 ml DMEM, 10% FCS. For frembringelse av umodifisert antistoff "chB-Ly1" ble cellene transfektert med bare antistoff-ekspresjonsvektorer pETR1808 og pETR1813 i et forhold på 1:1. For fremstilling av det glyko-omarbeidede antistoff "chB-Ly1-ge" ble cellene ko-transfektert med fire plasmider, to for antistoffekspresjon (pETR1808 og pETR1813), ett for en fusjons-GnTIII-polypeptidekspresjon (pETR1519) og én for mannosidase II-ekspresjon (pCLF9) i et forhold på henholdsvis 4:4:1:1. På dag 5 etter transfektering ble supernatanten høstet og sentrifugert i 5 min ved 1200 omdr. pr. min., fulgt av en andre sentrifugering i 10 min ved 4000 omdr. pr. min., og holdt ved 4°C.

[0208] chB-Ly1 og chB-Ly1-ge ble renset fra dyrkningssupernatant under anvendelse av tre sekvensielle kromatografiske trinn, protein A-kromatografi, kationebytterkromatografi og et størrelsesutelukkelseskromatografitrinn på en Superdex 200-kolonne (Amersham Pharmacia) idet bufferen ble skiftet til fosfatbufret saltløsning, og toppen for monomert antistoff fra dette siste trinn ble oppsamlet. Antistoffkonsentrasjonen ble anslått under anvendelse av et spektrofotometer, ut fra absorbansen ved 280 nm.

Oligosakkaridanalyse

[0209] Oligosakkarider ble frigjort enzymatisk fra antistoffene ved PNGaseF-digerering, hvor antistoffene enten var immobilisert på en PVDF-membran eller i løsning.

[0210] Den resulterende digereringsløsning inneholdende de frigjorte oligosakkarider ble enten tilberedt direkte for MALDI/TOF-MS-analyse eller ytterligere nedbrutt med EndoH-glykosidase før prøvetilberedning for MALDI/TOF-MS-analyse.

Oligosakkaridfrigjøringsmetode for PVDF-membran-immobiliserte antistoffer

[0211] Brønnene i en 96-brønnsplate laget av en PVDF- (Immobilon P, Millipore, Bedford, Massachusetts) membran ble fuktet med 100 µl metanol, og væsken ble trukket gjennom PVDF-membranen under anvendelse av vakuum påført på Multiscreen vakuum-manifolden (Millipore, Bedford, Massachusetts). PVDF-membranene ble vasket tre ganger med 300 µl vann. Brønnene ble deretter vasket med 50 µl RCM-buffer (8M urea, 360 mM Tris, 3,2 mM EDTA, pH 8,6). Mellom 30 og 40 µg antistoff ble tilsatt i en brønn inneholdende 10 µl RCM-buffer. Væsken i brønnen ble trukket gjennom membranen ved påføring av vakuum, og membranen ble deretter vasket to ganger med 50 µl RCM-buffer. Reduksjon av disulfidbroer ble utført ved tilsetting av 50 µl 0,1M ditiotreitol i RCM og inkubering ved 37°C i 1 time.

[0212] Etter reduksjon ble det påført vakuum for fjerning av ditiotreitol-løsningen fra brønnen. Brønnene ble vasket tre ganger med 300 µl vann før utførelse av karboksymetyleringen av cysteinrestene ved tilsetting av 50 µl 0,1M jodeddiksyre i RCM-buffer og inkubering ved romtemperatur i mørke i 30 min.

[0213] Etter karboksymetylering ble brønnene påført vakuum og deretter vasket tre ganger med 300 µl vann. PVDF-membranen ble deretter blokkert for forhindring av adsorpsjon av endoglykosidasen, ved inkubering av 100 µl av en 1% vandig løsning av polyvinylpyrrolidon 360 ved romtemperatur i 1 time. Blokkerings-reagenset ble deretter fjernet ved svakt vakuum fulgt av tre vaskinger med 300 µl vann.

[0214] N-bundne oligosakkarider ble frigjort ved tilsetting av 2,5 mE peptid-N-glykosydase F (rekombinant N-Glycanase, GLYKO, Novato, CA) og 0,1 mE Sialidase (GLYKO, Novato, CA), for fjerning av potensielle ladde monosakkaridrester, i et sluttvolum på 25 µl i 20 mM $NaHCO_3$, pH 7,0). Digerering ble utført i 3 timer ved 37°C.

Oligosakkaridfrigjøringsmetode for antistoffer i løsning

[0215] Mellom 40 og 50 μg antistoff ble blandet med 2,5 mE PNGaseF (Glyko, U.S.A.) i 2 mM Tris, pH 7,0 i et sluttvolum på 25 mikroliter, og blandingen ble inkubert i 3 timer ved 37°C.

Anvendelse av endoglykosidase H-digerering av PNGaseF-frigjorte oligosakkarider for tilordning av hybride todelte oligosakkaridstrukturer til nøytrale MALDI/TOF-MS-oligosakkaridtopper

[0216] De PNGaseF-frigjorte oligosakkarider ble deretter digerert med Endoglykosidase H (EC 3.2.1.96). For EndoH-digerering ble 15 mE EndoH (Roche, Sveits) tilsatt til PNGaseF-digereringsproduktet (antistoff i løsning-metode ovenfor) under oppnåelse av et sluttvolum på 30 mikroliter, og blandingen ble inkubert i 3 timer ved 37°C. EndoH spalter mellom N-acetylglukosaminrestene i chitobiosekjernen i N-bundne oligosakkarider. Enzymet kan bare digerere oligomannose og de fleste glykaner av hybridtypen, mens komplekse oligosakkaridtyper ikke hydrolyseres.

Prøvetilberedning for MALDI/TOF-MS

[0217] De enzymatiske nedbrytningsprodukter inneholdende de frigjorte oligosakkarider ble inkubert i ytterligere 3 timer ved romtemperatur etter tilsetting av eddiksyre til en sluttkonsentrasjon på 150 mM, og ble deretter ledet gjennom 0,6 ml kationebytterharpiks (AG50W-X8-hrpiks, hydrogenform, 150-75 μm (100-200 mesh), BioRad, Sveits) pakket i en mikro-bio-spinn-kromatografikolonne (BioRad, Sveits) for fjerning av kationer og proteiner. Én mikroliter av den resulterende prøve ble påført på en målplate av rustfritt stål og blandet på platen med 1 μl sDHB-matriks. sDHB-matriks ble tilberedt ved oppløsing av 2 mg 2,5-dihydroksybenzosyre pluss 0,1 mg 5-metoksysalicylsyre i 1 ml etanol/10 mM vandig natriumklorid 1:1 (på volumbasis). Prøvene ble lufttørket, 0,2 μl etanol ble påført, og prøvene fikk til slutt omkrystalliseres under luft.

MALDI/TOF-MS

[0218] MALDI-TOF-massespektrometret anvendt til å oppnå masse-spektraene var en Voyager Elite (Perspective Biosystems). Instrumentet ble

operert i lineær konfigurasjon, med en akselerering på 20kV og 80 ns forsinkelse. Ekstern kalibrering under anvendelse av oligosakkaridstandarder ble anvendt for masse-tilordning av ionene. Spektraene fra 200 laserskudd ble oppsummert for oppnåelse av sluttspektret.

Uttømming av fullblod-B-celler

[0219] 495 µl heparinisert blod fra en frisk donor ble porsjonert i 5 ml polystyrenrør, 5 µl 100 ganger konsentrerte antistoffprøver (sluttkonsentrasjon 1-1000 ng/ml) eller bare PBS ble tilsatt, og rørene ble inkubert ved 37°. Etter 24 timer ble 50 µl blod overført til et nytt rør og merket med anti-CD3-FITC, anti-CD19-PE og anti-CD45-CyChrome (Becton-Dickinson) i 15 min ved romtemperatur i mørke. Før analyse ble det tilsatt 500 µl FACS-buffer (PBS inneholdende 2% FCS og 5mM EDTA) til rørene. CD3-FITC- og CD19-PE-fluorescens av blodprøvene ble væskestrømcytometrisk analysert ved innstilling av en terskel på CD45-CyChrome. B celle-uttømming ble bestemt ved avsetting av forholdet mellom $CD19^+$ B-celler og $CD3^+$ T-celler.

Binding av anti-CD20-antistoffer til Raji-celler

[0220] 500 000 i 180 µl FACS-buffer (PBS inneholdende 2% FCS og 5mM EDTA) ble overført til 5 ml polystyrenrør, og 20 µl 10 ganger konsentrert anti-CD20-antistoffprøver (1-5000 ng/ml sluttkonsentrasjon) eller bare PBS ble tilsatt, og rørene ble inkubert ved 4°C i 30 min. Prøvene ble deretter vasket to ganger med FACS-buffer og pelletert ved 300 x g i 3 min. Supernatant ble avsugd, og cellene ble tatt opp i 100 µl FACS-buffer, 1 µl anti-Fc-spesifikke F(ab')2-FITC-fragmenter (Jackson Immuno Research Laboratories, USA) ble tilsatt, og rørene ble inkubert ved 4°C i 30 min. Prøvene ble vasket to ganger med FACS-buffer og tatt opp i 500 µl FACS-buffer inneholdende 0,5 µg/ml PI for analyse ved væskestrømcytometri. Binding ble bestemt ved avsetting av den geometriske middelfluorescens mot antistoffkonsentrasjonene.

EKSEMPEL 2

Høyhomologiakseptor-fremgangsmåte

[0221] Høyhomologi-antistoffakseptor-rammeverksøkingen ble utført ved innretting av muse-B-Ly1-proteinsekvensen mot en samling av humane kimlinjesekvensr og plukking av den humane sekvens som viste den høyeste sekvensidentitet. Her ble sekvensen VH1_10 fra VBase-databasen valgt som tungkjederammverk-akseptorsekvens, og VK_2_40-sekvensen ble valgt til være rammeverkakseptoren for den lette kjede. På disse to akseptor-rammeverk ble de tre komplementaritetsbestemmende regioner (CDR) av de tunge og lette variable musedoméner podet. Siden rammeverk 4-regionen ikke er en del av den variable region av kimlinje-V-genet, ble innrettingen for denne stilling utført individuelt. JH4-regionen ble valgt for den tunge kjede, og JK4-regionen ble valgt for den lette kjede. Molekylmodellering av det skisserte immunglobulindoméne viste ett sted som potensielt fordret muse-aminosyrerestene i stedet for de humane utenfor CDR. Gjeninnføring av muse-aminosyrerester i det humane rammeverk ville frembringe de såkalte tilbakemutasjoner. For eksempel ble den humane akseptor-aminosyrerest i Kabat-stilling 27 tilbakemutert til en tyrosinrest. Det ble utformet humaniserte antistoffvarianter som enten innbefattet eller utelukket tilbake-mutasjonene. Den lette humaniserte antistoffkjede fordret ikke noen tilbakemutasjoner. Etter skissering av proteinsekvensene, ble DNA-sekvenser som kodet for disse proteiner, syntetisert som angitt detaljert nedenfor.

Blandet rammeverk-fremgangsmåte

[0222] For å unngå innføring av tilbakemutasjoner i kritiske aminosyrerest-stillinger (kritiske for bibeholdelse av god antigenbindende affinitet eller antistoff-funksjoner) i det humane akseptor-rammeverk ble det undersøkt om hvorvidt enten hele rammeverkregion 1 (FR1) eller rammeverkregionene 1 (FR1) og 2 (FR2) sammen kunne erstattes av humane antistoffsekvenser som allerede hadde donor-rester, eller funksjonelt ekvivalente, i disse viktige stillinger i den naturlige humane kimlinjesekvens. For dette formål ble VH-rammeverkene 1 og 2 av muse-Bly-1-sekvensen innrettet individuelt i forhold til humane kimlinjesekvenser. Her var det ikke viktig med høyeste sekvensidentitet, og dette ble ikke anvendt, for velging av akseptor-rammeverk, men i stedet ble matching av flere kritiske rester antatt å være viktigere. Disse kritiske rester omfatter restene 24, 71 og 94 (Kabat-nummerering) og dessuten restene i stilling 27, 28 og 30 (Kabat-nummerering), som ligger utenfor CDR1-definisjonen ifølge Kabat, men ofte inngår ved

antigenbinding. IMGT-sekvensen VH_3_15 ble valgt som en egnet sekvens. Etter skissering av proteinsekvensene, ble DNA-sekvensene som kodet for disse proteiner, syntetisert som angitt detaljert nedenfor. Ved anvendelse av denne fremgangsmåte trengtes det ingen tilbakemutasjoner verken for den lette eller tunge kjede, for bibeholdelse av gode nivåer av antigenbinding.

Syntese av antistoffgenene

[0223] Etter å ha utpekt aminosyresekvensen for den humaniserte antistoff V-region, måtte DNA-sekvensen frembringes. DNA-sekvensdataene for de individuelle rammeverkregioner ble funnet i databasene for humane kimlinjesekvenser. DNA-sekvensen for CDR-regionene ble tatt fra de tilsvarende muse-cDNA-data. Med disse sekvenser ble hele DNA-sekvensen i realiteten satt sammen. Med disse DNA-sekvensdata ble det innført diagnostiske restriksjonsseter i den virkelige sekvens, ved innføring av stumme mutasjoner, noe som frembrakte gjenkjennelsesseter for restriksjonsendonukleaser. For oppnåelse av den fysiske DNA-kjede ble det utført gensyntese (f.eks. Wheeler et al., 1995). Ved denne metode utformes oligonukleotider fra de aktuelle gener, slik at én serie oligonukleotider fås fra kodingsstrengen, og en annen serie fra den ikke-kodende streng. 3'- og 5'-endene av hvert oligonukleotid (bortsett fra den aller første og siste i rekken) viser alltid komplementære sekvenser med to primere som stammer fra den motsatte streng. Når disse oligonukleotider innlemmes i en reaksjonsbuffer egnet for hvilken som helst varmestabil polymerase, og det tilsettes Mg^{2+}, dNTP og en DNA-polymerase, strekker hvert oligonukleotid seg fra sin 3'-ende. Den nydannede 3'-ende av én primer koples så til den neste primer på den motsatte streng og utvider sin sekvens videre under betingelser som er egnet for templatavhengig DNA-kjede-forlengelse. Det endelige produkt ble klonet i en konvensjonell vektor for formering i E. coli.

Antistoffproduksjon

[0224] Humane tung- og lettkjede-ledersekvenser (for sekresjon) ble tilføyd oppstrøms for de ovennevnte variabel region-sekvenser, og disse ble deretter sammenføyd oppstrøms for henholdsvis humane konstante tunge og lette IgG1-kappa-sekvenser under anvendelse av standard-molekylærbiologiteknikker. De resulterende fullstendige tung- og lettkjede-DNA-antistoffsekvenser ble subklonet i

pattedyr-ekspresjonsvektorer (én for den lette kjede og én for den tunge kjede) under kontroll av MPSV-promoteren og oppstrøms for et syntetisk polyA-sete, idet hver vektor bar en EBV OriP-sekvens, som beskrevet i eksempel 1 ovenfor. Antistoffer ble frembrakt som beskrevet i eksempel 1 ovenfor, nemlig ved kotransfektering av HEK293-EBNA med pattedyr-antistoff-tung- og lettkjede-ekspresjonsvektorer, høsting av det kondisjonerte dyrkningsmedium 5 til 7 dager etter transfeksjon og rensing av de utskilte antistoffer ved protein A-affinitets-kromatografi, fulgt av kationebytterkromatografi og et endelig størrelses-eksklusjonskromatografitrinn for isolering av rene monomere IgG1-antistoffer. Antistoffene ble formulert i en løsning av 25 mM kaliumfosfat, 125 mM natriumklorid, 100 mM glycin, med pH 6,7. Glyko-omarbeidede varianter av de humaniserte antistoffvarianter ble frembrakt ved kotransfeksjon av antistoff-ekspresjonsvektorene sammen med en GnT-III-glykosyltransferase-ekspresjonsvektor, eller sammen med en GnT-III-ekspresjonsvektor pluss en Golgi-mannosidase II-ekspresjonsvektor, som beskrevet for det kimæriske antistoff i eksempel 1 ovenfor. Glyko-omarbeide antistoffer ble renset og formulert som beskrevet ovenfor for de ikke-glyko-omarbeidede antistoffer. Oligosakkaridene knyttet til Fc-regionen av antistoffene ble analysert ved MALDI/TOF-MS som beskrevet nedenfor.

Oligosakkaridanalyse

[0225] Oligosakkaridfrigjøringsmetode for antistoffer i løsning

Mellom 40 og 50 µg antistoff ble blandet med 2,5 mE PNGaseF (Glyko, USA) i 2 mM Tris, pH 7,0, i et sluttvolum på 25 mikroliter, og blandingen ble inkubert i 3 timer ved 37°C.

Prøvetilberedning for MALDI/TOF-MS

[0226] De enzymatiske nedbrytningsprodukter inneholdende de frigjorte oligosakkarider ble inkubert i ytterligere 3 timer ved romtemperatur etter tilsetting av eddiksyre til en sluttkonsentrasjon på 150 mM, og ble deretter ledet gjennom 0,6 ml kationebytterharpiks (AG50W-X8-harpiks, hydrogenform, 150-75 µm, BioRad, Sveits) pakket i en mikro-bio-spin-kromatografikolonne (BioRad, Sveits) under fjerning av kationer og proteiner. Én mikroliter av den resulterende prøve ble

påført på en målplate av rustfritt stål og blandet på platen med 1 µl sDHB-matriks. sDHB-matriks ble tilberedt ved oppløsing av 2 mg 2,5-dihydroksybenzosyre pluss 0,1 mg 5-metoksysalicylsyre i 1 ml etanol/10 mM vandig natriumklorid 1:1 (på volumbasis). Prøvene ble lufttørket, 0,2 µl etanol ble påført, og prøvene fikk til slutt omkrystalliseres under luft.

MALDI/TOF-MS

[0227] MALDI-TOF-massespektrometeret anvendt til opptak av massespektraene var et Voyager Elite (Perspective Biosystems). Instrumentet ble operert i lineær konfigurasjon, med en akselerering på 20kV og 80 ns forsinkelse. Ekstern kalibrering med anvendelse av oligosakkaridstandarder ble anvendt for massetilordning av ionene. Spektraene fra 200 laserskudd ble summert under oppnåelse av det endelige spektrum.

Antigenbindingsanalyse

[0228] De rensede, monomere humaniserte antistoffvarianter ble testet med hensyn til binding til humant CD20 på Raji B-cellelymfom-målceller under anvendelse av væskestrømcytometribasert analyse, som beskrevet for det kimæriske B-ly1-antistoff i Eksempel 1 ovenfor.

Binding av monomere IgG1-glykovarianter til NK-celler og FcγRIIIA-uttrykkende CHO-cellelinje

[0229] Humane NK-celler ble isolert fra nyisolerte mononukleære celler fra perifert blod (PBMC) med anvendelse av negativ seleksjonsanriking med hensyn til CD16- og CD56-positive celler (MACS-system, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach/Tyskland). Renheten bestemt ved CD56-ekspresjon var mellom 88 og 95%. Nyisolerte NK-celler ble inkubert i PBS uten kalsium- og magnesium-ioner (3 x 10^5 celler/ml) i 20 minutter ved 37°C under fjerning av NK-celle-assosiert IgG. Cellene ble inkubert med 10^6 celler/ml med forskjellige konsentrasjoner av anti-CD20-antistoff (0, 0,1, 0,3, 1, 3, 10 µg/ml) i PBS, 0,1% BSA. Etter flere vaskinger ble antistoffbinding påvist ved inkubering med 1:200 FITC-konjugert $F(ab')_2$ geite-antihumant, F(ab')2-spesifikt IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA/USA) og anti-humant CD56-PE (BD Biosciences, Allschwil/Sveits). Anti-

FcgammaRIIIA 3G8 F(ab')2-fragmenter (Ancell, Bayport, MN/USA) ble tilsatt i en konsentrasjon på 10 µg/ml for konkurrering av binding av antistoff-glykovarianter (3 µg/ml). Fluorescensintensiteten som kan tilskrives de bundne antistoffvarianter, ble bestemt for CD56-positive celler på en FACSCalibur (BD Biosciences, Allschwil/Sveits). CHO-celler ble transfektert ved elektroporasjon (280 V, 950 µF, 0,4 cm) med en ekspresjonsvektor som kodet for FcgammaRIIIA-Val158 α-kjeden og γ-kjeden. Transfektanter ble selektert ved tilsetting av 6 µg/ml puromycin, og stabile kloner ble analysert ved FACS under anvendelse av 10 µl monoklonalt FITC-konjugert anti-FcgammaRIII 3G8-antistoff (BD Biosciences, Allschwil/Sveits) for 10^6 celler. Binding av IgG1 til FcgammaRIIIA-Val158-uttrykkende CHO-celler ble utført analogt med NK-cellebindingen beskrevet ovenfor.

ADCC-analyse

[0230] Humane mononukleære celler fra perifert blod (PBMC) ble anvendt som effektorceller og ble preparert under anvendelse av Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, M063178 USA) og idet man hovedsakelig fulgte fabrikantens instruksjoner. Kort angitt ble veneblod tatt med hepariniserte sprøyter fra frivillige personer. Blodet ble fortynnet 1:0,75-1,3 med PBS (ikke inneholdende Ca^{++} eller Mg^{++}) og lagt på Histopaque-1077. Gradienten ble sentrifugert ved 400 x g i 30 min ved romtemperatur (RT) uten bremser. Interfasen inneholdende PBMC ble oppsamlet og vasket med PBS (50 ml pr. celler fra to gradienter) og harvested ved sentrifugering ved 300 x g i 10 minutter ved RT. Etter gjenoppslemming av pelleten med PBS, ble PBMC tellet og vasket en andre gang ved sentrifugering ved 200 x g i 10 minutter ved RT. Cellene ble deretter gjenoppslemmet i passende medium for de påfølgende prosesser.

[0231] Forholdet mellom effektor og mål anvendt for ADCC-analysene var 25:1 og 10:1 for henholdsvis PBMC og NK-celler. Effektorcellene ble preparert i AIM-V-medium i passende konsentrasjon for tilsetting av 50 µl pr. brønn i rundbunnede 96 brønnsplater. Målcellene var humane B-lymfomceller (f.eks. Raji-celler) dyrket i DMEM inneholdende 10% FCS. Målcellene ble vasket i PBS, tellet og gjenoppslemmet i AIM-V med 0,3 millioner pr. ml for tilsetting av 30 000 celler i 100 µl pr. mikrobrønn. Antistoffene ble fortynnet i AIM-V, tilsatt i 50 µl til de for-utplatede målcellene og fikk bindes til målcellene i 10 minutter ved RT. Deretter

ble effektorcellene tilsatt, og platen ble inkubert i 4 timer ved 37°C i fuktig atmosfære inneholdende 5% CO_2. Dreping av målcellene ble fastslått ved måling av laktatdehydrogenase (LDH)-frigjøring fra ødelagte celler under anvendelse av Cytotoksisitetspåvisningssettet (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Sveits). Etter inkuberingen på 4 timer ble platene sentrifugert ved 800 x g. 100 µl supernatant fra hver brønn ble overført til en ny transparent flatbunnet 96 brønns plate. 100 µl fargesubstratbuffer fra utstyrssettet ble tilsatt pr. brønn. V_{maks}-verdiene for fargereaksjonen ble fastsatt i en ELISA-avlesningsinnretning ved 490 nm i minst 10 min under anvendelse av SOFTmax PRO-programvare (Molecular Devices, Sunnyvale, CA94089, USA). Spontan LDH-frigjøring ble målt fra brønner inneholdende bare mål- og effektorceller, men ingen antistoffer. Maksimal frigjøring ble bestemt fra brønner inneholdende bare målceller og 1% Triton X-100. Prosentandel av spesifikk antistoffmediert dreping ble beregnet som følger: ((x — SR)/(MR — SR)*100, hvor x er middelverdien for V_{maks} ved en spesifikk antistoffkonsentrasjon, SR er middelverdien for V_{maks} for den spontane frigjøring, og MR er middelverdien for V_{maks} for den maksimale frigjøring.

Komplementavhengig cytotoksisitetsanalyse

[0232] Målcellene ble tellet, vasket med PBS, gjenoppslemmet i AIM-V (Invitrogen) med 1 millioner celler pr. ml. 50 µl celler ble utplatet pr. brønn i en flatbunnet 96 brønns plate. Antistoff-fortynninger ble tilberedt i AIM-V og tilsatt i 50 µl til cellene. Antistoffene fikk bindes til cellene i 10 minutter ved romtemperatur. Humant serumkomplement (Quidel) ble nytint, fortynnet 3 ganger med AIM-V og tilsatt i 50 µl i brønnene. Kaninkomplement (Cedarlane Laboratories) ble tilberedt som beskrevet av fabrikanten, fortynnet 3 ganger med AIM-V og tilsatt i 50 µl i brønnene. Som kontroll ble komplementkilder oppvarmet i 30 min ved 56°C før tilsetting til analysen. Analyseplatene ble inkubert i 2 timer ved 37°C. Dreping av cellene ble bestemt ved måling av LDH-frigjøring. Kort angitt ble platene sentrifugert ved 300 x g i 3 min. 50 µl supernatant pr. brønn ble overført til en ny 96 brønns plate, og 50 µl av analysereagenset fra Cytotoksisitets-settet (Roche) ble tilsatt. En kinetisk måling med ELISA-avlesningsinnretningen bestemte V_{maks} som samsvarte med LDH-konsentrasjonen i supernatanten. Maksimal frigjøring ble bestemt ved inkubering av cellene i nærvær av 1% Trition X-100.

Uttømmingsanalyse for B-celler i fullblod

[0233] Normal B-celle-uttømming i fullblod ved anti-CD20-antistoffene ble utført som beskrevet i Eksempel 1 ovenfor.

Apoptoseanalyse

[0234] Den apoptotiske potens for antistoffene ble analysert ved inkubering av antistoffet med 10 µg/ml (metningsbetingelser med hensyn til antigenbinding) med målcellene (med en målcellekonsentrasjon på 5 x 10^5 celler/ml) natten over (16-24 t). Prøvene ble merket med AnnV-FITC og analysert ved FACS. Analyse ble utført in triplo.

[0235] Påvisning utføres ved væskestrømcytometri ved at man fulgte tilsynekomsten av apoptotiske markører så som annexin V og fosfatidylserin. Negativ kontroll (ingen apoptose indusert) inneholder intet antistoff, men bare fosfatbufret saltløsning. Positiv kontroll (maksimal apoptose) inneholder 5 mikromolar av det sterke apoptoseinduserende middel camptothecin (CPT).

Resultater og diskusjon

[0236] Sammenlikning av bindingen til humant CD20-antigen av antistoffvariantene B-HH1, B-HH2, B-HH3, enten kompleksbundet med den kimæriske B-ly1-lettkjede (mVL, som beskrevet i eksempel 1 ovenfor) eller med den humaniserte B-ly1-lettkjede (KV1), og det parentale, kimæriske antistoff chB-ly1 (beskrevet i eksempel 1 ovenfor) viser at alle antistoffer har liknende EC50-verdi, men B-HH1-konstruksjonen bindes med lavere intensitet/støkiometri enn variantene B-HH2 og B-HH3 (fig. 11). B-HH1 kan skjelnes fra B-HH2 og B-HH3 ved sine delvis humane CDR1- og CDR2-regioner (Kabat-definisjon), samt Ala/Thr-polymorfismen i stilling 28 (Kabat-nummerering). Dette tyder på at enten 28, det fullstendige CDR1 og/eller det fullstendige CDR2 er viktige for antistoff/antigen-interaksjon.

[0237] Sammenlikningen av B-HL1, B-HH1 og det kimæriske parentale chB-ly1-antistoff viste fravær av en hver bindingsaktivitet i B-HL1-konstruksjonen, og omtrent halvdelen av bindingsintensiteten/støkiometrien for B-HH1 sammenliknet med B-ly1 (fig. 12). Både B-HL1 og B-HH1 utformes basert på akseptor-rammeverk som stammer fra den humane VH1-klasse. Blant andre forskjeller er

stilling 71 (Kabat-nummerering; Kabat-stilling 71 svarer til stilling 72 i SEKV ID NR: 48) av B-HL1-konstruksjonen et slående avvik, noe som viser dens antatte betydning for antigenbinding.

[0238] Ved sammenlikning av antigenbindingsdataene ifølge fig. 9-13 viser BHH2-KV1-, BHL8-KV1- og BHL11-KV1-variantene den beste bindingsaffinitet, blant de forskjellige testede humaniserte antistoffvarianter, til humant CD20 på overflaten av humane celler. Forskjellene mellom B-HH2 på den ene side og B-HL8 og B-HL11 på den annen side befinner seg kun i FR1- og FR2-regionene, idet alle de tre CDR er identiske (sammenlikne f.eks. SEKV ID NR: 32, 56 og 60, som ikke er nummerert ifølge Kabat, men hvis Kabat-nummerering lett kan bestemmes av en vanlig fagperson). B-HL8 og B-HL11 har sine FR1- og FR2-sekvenser fra den humane VH3-klasse, mens det fullstendige B-HH2-rammeverk er humant VH1-avledet. B-HL11 er et derivat av B-HL8 med enkeltmutasjonen Glu1Gln (stilling 1 er den samme både ved Kabat-nummerering og det konvensjonelle nummereringssystem anvendt i sekvenslisten), hvor Gln er aminosyreresten i B-HH2-konstruksjonen. Dette betyr at Glu1Gln-utskifting ikke forandrer bindingsaffinitet eller intensitet. De andre forskjeller mellom B-HH2 og B-HL8 er 14 rammeverkrester, hvorav én eller flere vil innvirke på den antigenbindende oppførsel hos dette antistoff.

[0239] B-HL4-konstruksjonen fås fra B-HH2-antistoffet ved erstatting av FR1 i B-HH2 med FR1 i den humane kimlinjesekvens VH1_45. Denne konstruksjon viser sterkt redusert antigenbindende evne, til tross for at den har forskjellige aminosyrer bare i tre stillinger i FR1. Disse rester befinner seg i stillingene 2, 14 og 30 (Kabat-nummerering). Blant disse kan stilling 30 være en stilling av betydning, siden det er en del av Chothia-definisjonen av CDR1. Total analyse av alle bindingskurvene fra fig. 9 til 13 viser at følgende humaniserte B-ly1-tungkjederester (Kabat-nummerering) er viktige for binding til CD20: N35 (enden av Kabat CDR1), fullstendig Kabat CDR1, fullstendig Kabat CDR2 og fullstendig Kabat CDR3, restene A71 og R94 (i dette tilfelle kan R94 ikke erstattes av et treonin) og Y27. A28 og S30 bidrar også i mindre utstrekning. Dessuten er Kabat CDR3 og alle kanoniske rester viktige for antigenbinding. Ingen tilbakemutasjoner ble innført i den humaniserte lette kjede, som hadde de fullstendige Kabat CDR1, CDR2 og CDR3 innpodet. Ved induksjon av apoptose (fig. 14, 15 og 21) var den mest potente variant humanisert B-ly1-variant BHH2-

KV1 (enda mer potent enn den opprinnelige chB-ly1, og meget mer potent enn et antistoff med en sekvens identisk med rituximab, C2B8). Andre humaniserte varianter (derivater av BHL8) som kan gjenvinne den økte apoptose, er: B-HL12 til B-HL17 (se tabell) og BHH8 (blandede rammeverk) og BHH9 ("blandede rammeverk" med én tilbakemutasjon, S30T). Stillingene 9 og 48 (Kabat-nummerering) kan kontakte antigenet. Variantene BHH4 til BHH7 er andre humaniserte B-ly1-varianter som ikke innfører ytterligere ikke-humane sekvenser.

[0240] Viktige egenskaper hos det humaniserte B-ly1-antistoff er at det er et anti-CD20-antistoff type II som definert i Cragg, M.S. og Glennie, M.J., *Blood* 103(7):2738-2743 (april 2004). Ved binding til CD20 induserte det derfor ikke noen betydelig resistens overfor ekstraksjon av CD20 med ikke-ionisk detergent fra overflaten av humane CD20+-celler, ved anvendelse av analysen beskrevet for dette formål i Polyak, M.J. og Deans, J.P., *Blood* 99(9):3256-3262 (2002). Det induserte unektelig betydelig mindre resistens overfor ekstraksjon av CD20 med ikke-ionisk detergent enn C2B8-antistoffet gjør (et annet anti-CD20-antistoff med identisk sekvens som rituximab (se US-patentpublikasjon nr. 2003/0003097). Som ventet for et anti-CD20-antistoff type II, hadde det humaniserte B-ly1 ikke noen signifikant komplementmediert lyseaktivitet og unektelig en mengde mer komplementmediert lyseaktivitet enn anti-CD20-antistoffet C2B8 (kimærisk IgG1 med identisk sekvens som rituximab). En annen viktig egenskap hos det humaniserte B-ly1-antistoff var at det var meget potent i den homotypiske aggregeringsanalyse. I denne analyse ble CD20-positive humane celler, Daudi-celler, inkubert i celledyrkningsanalysemedium i opp til 24 timer ved 37°C i 5% CO_2-atmosfære i en pattedyrcelleinkubator som beskrevet detaljert i (Deans referanse) med antistoffet i en konsentrasjon på 1 mikrogram pr. ml og parallelt i en konsentrasjon på 5 mikrogram pr. ml. Til sammenlikning ble kontroll, parallell inkubering av cellene utført under identiske betingelser, men med anvendelse av anti-CD20-antistoffet C2B8. På forskjellige tidspunkter, innbefattende 8 timers og 24 timers inkubering, ble cellene inspisert visuelt ved anvendelse av mikroskop. Det ble funnet at det humaniserte B-ly1-antistoff førte til sterk homotypisk aggregering, idet aggregatene var betydelig større enn aggregatene innført ved tilsetting av C2B8-kontrollantistoffet. Dessuten, og i overensstemmelse med at antistoffet var anti-CD20 type II, induserte det høyere nivåer av apoptose når CD20-positive humane celler ble inkubert med det humaniserte B-ly1-antistoff, i

forhold til en kontroll under identiske betingelser under anvendelse av det C2B8-kimæriske IgG1-antistoff med identisk sekvens som rituximab.

[0241] Glyko-omarbeidede varianter av de humaniserte antistoffer ble frembrakt ved ko-ekspresjon av GnTIII-glykosyltransferase, sammen med antistoffgenene, i pattedyrceller. Dette førte til en økning i fraksjonen av ikke-fukosylerte oligosakkarider knyttet til Fc-regionen av antistoffene, innbefattende todelte ikke-fukosylerte oligosakkarider, som beskrevet i WO 2004/065540 (fig. 17-19). De glyko-omarbeidede antistoffer hadde betydelig høyere nivåer av binding til humane FcgammaRIII-reseptorer (fig. 20) samt ADCC-aktivitet (fig. 16), i forhold til det ikke-glyko-omarbeidede antistoff og i forhold til C2B8-antistoffet. Det humaniserte B-ly1-antistoff var også mer potent ved innføring av human B-celle-uttømming i en fullblodanalyse (fig. 16), enn kontroll-C2B8-antistoffet. Dette var tilfellet både for det ikke-glyko-omarbeidede B-ly1-antistoff og for den glyko-omarbeidede versjon av det. Det glyko-omarbeidede antistoff var omtrent 1000 ganger mer potent enn C2B8-kontroll-anti-CD20-antistoffet med hensyn til uttømming av B-celler i fullblodanalysen. Denne sammenlikning er viktig både for de ikke-glyko-omarbeidede og for de glyko-omarbeidede humaniserte former av B-ly1-antistoff, på grunn av at den viste at i analyser som kombinerte Fc-reseptor-avhengige aktiviteter, så som ADCC, pluss komplementmediert lyse, pluss induksjon av apoptose, var begge former av B-ly1 betydelig mer potente enn C2B8, skjønt begge former av B-ly1 har dramatisk lavere komplementmediert lyseaktivitet. De Fc-reseptor-avhengige ADCC-dreperaktiviteter og apoptose-induksjon var til stede i denne overlegne aktivitet av de humaniserte B-ly1-antistoffvarianter. Ved apoptoseanalysen var videre både de glyko-omarbeidede og ikke-glyko-omarbeidede former av dette type II-anti-CD20-antistoff potente, og de Fc-omarbeidede varianter med økt bindingsaffinitet til Fcgamma-reseptorer var enda mer potente ved apoptoseinduksjon enn den ikke-Fc-omarbeidede variant, og alle varianter var betydelig mer potente enn kontrollantistoffet C2B8. Den nøyaktige mekanisme for forøket homotypisk aggregering og induksjon av apoptose mediert ved type II-anti-CD20-antistoffer er ikke kjent, og samtidig binding til andre molekyler på overflaten av CD20-positive celler, så som Fc-gamma-reseptorer, kan innvirke på denne viktige egenskap. Det var derfor viktig å vise at anti-CD20-antistoffer av type II som er blitt omarbeidet i sin Fc-region for økt bindingsaffinitet til Fc-gamma-reseptorer, innbefattende FcgammaRIII og med

en tilknyttet økning i ADCC-aktivitet, fremdeles var i stand til å indusere sterk apoptose, enda høyere enn den ikke-Fc-omarbeidede og homotypiske aggregering. Apoptoseinduksjon er viktig in vivo, siden det er steder i kroppen hvor de CD20-positive målceller kan finnes, men hvor adgang til FcgammaRIII-positive celler er mer vanskelig enn i blod; slike steder er for eksempel lymfeknuter. På disse steder kan induksjonen av apoptose ved selve anti-CD20-antistoffet være avgjørende for god effektivitet av anti-CD20-antistoff-terapien hos mennesker, både for behandling av hematologiske maligniteter så som ikke-Hodgkins lymfomer og kronisk B-celle-lymfocyttleukemi, og for behandling av autoimmune sykdommer så som reumatoid artritt og lupus via en B-celle-uttømmings-fremgangsmåte. Den økte bindingsaffinitet til FcgammaRIII og høyere ADCC hos det humaniserte, Fc-omarbeidede anti-CD20-antistoff type II kan også være en meget viktig egenskap for slike terapier. Endelig kan den reduserte eller ubetydelige komplementmedierte lyseaktivitet hos disse anti-CD20-antistoffer type II, innbefattende humaniserte og Fc-omarbeidede varianter, også være viktig høyere komplementaktivering ved anti-CD20-antistoffer er blitt korrelert med økte, uønskede bivirkninger.

Patentkrav

1. Humanisert Type II anti-CD20 antistoff omfattende

(a) tungkjede variabel region omfattende SEKV ID NR:32 eller en tungkjede variabel region omfattende SEKV ID NR:32 som omfatter substitusjonen M34I, og

(b) en lettkjede variabel region omfattende SEKV ID NR:76.

2. Antistoff ifølge krav 1, idet nevnte antistoff omfatter tungkjede variabel region SEKV ID NR:40.

3. Ekspresjonsvektor omfattende et polynukleotid kodende for en tungkjede variabel region ifølge krav 1 eller krav 2 og et polynukleotid kodende for en lettkjede variabel region ifølge krav 1.

4. Vektor ifølge krav 3, som er polycystronisk

5. Vertscelle omfattende ekspresjonsvektoren ifølge krav 3 eller krav 4 eller et polynukleotid kodende for en tungkjede variabel region ifølge krav 1 eller krav 2 og et polynukleotid kodende for en lettkjede variabel region ifølge krav 1.

6. Vertscelle ifølge krav 5, idet nevnte vertscelle er konstruert for å uttrykke minst en nukleinsyre kodende for et polypeptid med β(1,4)-N-acetylglukosylaminyltransferase III aktivitet.

7. Vertscelle ifølge krav 6, idet nevnte polypeptid som har β(1,4)-N-acetylglukosylaminyltransferase III aktivitet er et fusjonspolypeptid som videre omfatter Golgi lokaliseringsdomenen til et heterologt Golgi resident polypeptid.

8. Vertscelle ifølge krav 7, idet nevnte Golgi lokaliseringsdomene er valgt fra lokaliseringsdomenen til mannosidase II, lokaliseringsdomenen til β(1,2)-N-acetylglucosaminyltransferase I, β(1,2)-N-acetylglucosaminyltransfcrase II, mannosidase I eller α1-6 kjerne fukosyltransferase.

9. Metode for produksjon av et humanisert Type II anti-CD20 antistoff ifølge krav 1 eller krav 2 omfattende dyrking av vertscellen ifølge et hvilket som helst av kravene 5 til 8 under betingelser som tillater produksjon av nevnte antistoff og isolering av

nevnte antistoff fra nevnte kultur.

10. Humanisert Type II anti-CD20 antistoff, hvor antistoffet blir oppnådd ved metoden ifølge krav 9.

11. Antistoff ifølge et hvilken som helst av kravene 1, 2 eller 10, eller oppnådd ved metoden ifølge krav 9, idet nevnte antistoff omfatter en glykokonstruert Fc region.

12. Antistoff ifølge krav 11, idet nevnte antistoff har en økning i fraksjonen av ikke-fukosylerte oligosakkarider koblet til nevnte glykokonstruerte Fc region.

13. Antistoff ifølge krav 11, idet nevnte antistoff har en økning i fraksjonen av halverte, ikke-fukosylerte oligosakkarider koblet til nevnte glykokonstruerte Fc region.

14. Antistoff ifølge krav 11, idet nevnte antistoff har betydeligere høyere nivå av binding til human FcgammaRIII reseptorer i forhold til det ikke-glykokonstruerte antistoffet.

15. Antistoff ifølge krav 11, idet nevnte antistoff har et betydeligere høyere nivå av ADCC aktivitet i forhold til det ikke-glykokonstruerte antistoffet.

16. Farmasøytisk sammensetning omfattende antistoffet ifølge et hvilken som helst av kravene 1, 2 eller 10 til 15, eller oppnådd ved metoden ifølge krav 9 og en farmasøytisk akseptabel bærer.

17. Antistoff ifølge hvilke som helst av kravene 1, 2 eller 10 til 15, eller oppnådd ved metoden ifølge krav 9 for anvendelse som et medikament for behandling en B-celle forstyrrelse.

18. Antistoff ifølge krav 17, idet nevnte B-celle forstyrrelse er et B-celle lymfom.

19. Anvendelse av antistoffet ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2 eller 10 til 15 eller oppnådd ved metoden ifølge krav 9 for fremstilling av et medikament for behandling av en forstyrrelse som kan behandles ved B-celle utarming.

20. Antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2 eller 10 til 15, eller oppnådd ved metoden ifølge krav 9 for anvendelse som et medikament for behandling av en

forstyrrelse som kan behandles ved B-celle utarming.

21. Antistoff for anvendelse ifølge krav 20 eller anvendelse av antistoffet ifølge krav 19, idet nevnte forstyrrelse er en hematologisk malignhet eller en autoimmun sykdom.

22. Antistoff for anvendelse eller anvendelse av antistoffet ifølge krav 21, idet nevnte hematologiske malignhet er B-celle lymfom, ikke-Hodgkins lymfom, eller B-celle kronisk lymfocyttisk leukemi.

23. Antistoff for anvendelse eller anvendelse av antistoffet ifølge krav 21, idet nevnte autoimmune sykdom er revmatoid artritt eller lupus.

24. Humanisert Type II anti-CD20 antistoff omfattende

(a) en tungkjede variabel region valgt fra gruppen bestående av SEKV ID NR: 32 og SEKV ID NR: 40 og
(b) KV1 lettkjede variabel region ifølge SEKV ID NR: 76.

25. Antistoff ifølge krav 24, idet tungkjede variable region er SEKV ID NR: 40.

26. Humanisert Type II anti-CD20 antistoff omfattende en tungkjede variabel region som har de spesifisitetsbestemmende residiene til tungkjede variabel region av antistoffet ifølge krav 24 eller krav 25, idet nevnte antistoff induserer høyere nivåer av apoptose når den inkubert med CD20-positive humane celler i forhold til en kontroll under identiske betingelser ved anvendelse av C2B8 kimært IgG-1 antistoff med en sekvens identisk med rituximab.

27. Humanisert Type II anti-CD20 antistoff omfattende en tungkjede variabel region som blir kodet av en nukleinsyresekvens som er minst 80% identisk med SEKV ID NR: 31 eller SEKV ID NR: 39 og en lettkjede variabel region som blir kodet av en nukleinsyresekvens som er minst 80% identisk med SEKV ID NR: 75, idet nevnte antistoff induserer høyere nivåer av apoptose når inkubert med CD20-positive humane celler i forhold til en kontroll under identiske betingelser ved anvendelse av det chimært IgGl-antistoff med en sekvens identisk til rituximab.

28. Ekspresjonsvektor omfattende et polynukleotid som koder for en tungkjede variabel region ifølge et hvilket som helst av kravene 24 til 27 og et polynukleotid

kodende for en lettkjede variabel region ifølge et hvilket som helst av kravene 24 eller 27.

29. Vektoren ifølge krav 28, som er polycistronisk.

30. Isolert vertscelle omfattende ekspressionsvektoren ifølge krav 28 eller krav 29 eller et polynukleotid kodende for en tung kjede variabel region ifølge et hvilket som helst av kravene 24 til 27 og et polynukleotid kodende for en lettkjede variabel region ifølge et hvilket som helst av kravene 24 eller 27.

31. Vertscelle ifølge krav 30, idet nevnte vertscelle er konstruert til å uttrykke minst en nukleinsyre kodende for et polypeptid med β(1,4) -N-acetylglukosylaminyltransferase III-aktivitet.

32. Vertscelle ifølge krav 31, idet nevnte polypeptid som har β(1,4) -N-acetylglukosylaminyltransferase III-aktivitet er et fusjonspolypeptid som videre omfatter Golgi-lokaliseringsdomenen til et heterologt Golgi-resistent polypeptid.

33. Vertscelle ifølge krav 32, idet nevnte Golgi lokaliseringsdomene er valgt fra lokaliseringsdomenen til mannosidase II, lokaliseringsdomenen til β(1,2) -N-acetylglukosaminyltransferase I, β(1,2) -N-acetylglukosaminyltransferase II, mannosidase I eller α1-6 kjernefukosyltransferase.

34. Metode for produksjon av et humanisert Type II anti-CD20 antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 24 til 27 omfattende dyrking av vertscellen ifølge et hvilket som helst av kravene 30 til 33 under betingelser som muliggjør produksjon av nevnte antistoff og isolering av nevnte antistoff fra nevnte kultur.

35. Humanisert Type II anti-CD20 antistoff, idet antistoffet blir produsert av vertscellen ifølge et hvilket som helst av kravene 30 til 33.

36. Antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 24 til 27 eller 35, eller produsert ved metoden ifølge krav 34, idet nevnte antistoff omfatter en glykokonstruert Fc-region.

37. Antistoff ifølge krav 36, idet nevnte antistoff har en økning i fraksjonen av ikke-fukosylerte oligosakkarider koblet til nevnte glykokonstruerte Fc-region.

38. Antistoff ifølge krav 36, idet nevnte antistoff har en økning i fraksjonen av halverte, ikke-fukosylerte oligosakkarider koblet til nevnte glykokonstruerte Fc-region.

39. Antistoff ifølge krav 36, idet nevnte antistoff har betydeligere høyere nivåer av binding til humane FcgammaRIII-reseptorer i forhold til det ikke-glykokonstruerte antistoffet.

40. Antistoff ifølge krav 36, idet nevnte antistoff har betydelige høyere nivåer av ADCC-aktivitet i forhold til det ikke-glykokonstruerte antistoffet.

41. Farmasøytisk sammensetning omfattende antistoffet ifølge et hvilket som helst av kravene 24 til 27 eller 35 til 40, eller produsert ved metoden ifølge krav 34, og en farmasøytisk akseptabel bærer.

42. Antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 24 til 27 eller 35 til 40 eller produsert ved metoden ifølge krav 34, for anvendelse som et medikament for behandling en B-celleforstyrrelse.

43. Antistoff ifølge krav 42, idet nevnte B-celleforstyrrelse er et B-celle lymfom.

44. Anvendelse av antistoffet ifølge et hvilket som helst av kravene 24 til 27eller 35 til 40, eller produsert ved metoden ifølge krav 34, for fremstilling av et medikament for behandling av en forstyrrelse som kan behandles ved B-celleutarming.

45. Antistoff ifølge et hvilket som helst av kravene 24 til 27 eller 35 til 40, eller produsert ved metoden ifølge krav 34, for anvendelse som et medikament for behandling av en forstyrrelse som kan behandles ved B-celleutarming.

46. Anvendelse ifølge krav 44 eller antistoff ifølge krav 45, idet nevnte forstyrrelse er en hematologisk malignhet eller en autoimmun sykdom.

47. Antistoff eller anvendelse ifølge krav 46, idet nevnte hematologiske malignhet er en B-celle lymfom, ikke-Hodgkins lymfom, eller B-celle kronisk lymfocyttisk leukemi.

48. Antistoff eller anvendelse ifølge krav 46, idet nevnte autoimmune sykdom er reumatoid artritt eller lupus.

5

SEQUENCE LISTING

<110> GlycArt Biotechnology AG
Umana, Pablo
Bruenker, Peter
Suter, Tobias
Puentener, Ursula
Moessner, Ekkehard
Ferrara, Claudia

<120> Antigen Binding Molecules with Increased Fc Receptor Binding Affinity and Effector Function

<130> 1975.029PC01

<160> 78

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 1

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

Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Leu
20 25 30

Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp
35 40 45

Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
50 55 60

Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr
65 70 75 80

Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly
85 90 95

Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
100 105 110

<210> 2
<211> 336
<212> DNA
<213> Mus sp.

<400> 2
ggacctgaac tggtgaagcc tggggcctca gtgaagattt cctgcaaagc ttctggctac 60

gcattcagtt actcttggat gaactgggtg aaactgaggc ctggacaggg tcttgagtgg 120

attggacgga ttttttcctgg agatggggat actgactaca atgggaaatt caagggcaag 180

gccacactga ctgctgacaa atcctccaac acagcctaca tgcaactcac cagcctgacc 240

tctgtggact ctgcggtcta tttatgtgca agaaatgtct ttgatggtta ctggttagtt 300

tactggggcc aagggactct ggtcactgtc tctgca 336

<210> 3
<211> 103
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 3

Asn Pro Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
1 5 10 15

Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu
20 25 30

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn
35 40 45

Leu Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr
50 55 60

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

Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly
85 90 95

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100

<210> 4
<211> 309
<212> DNA
<213> Mus sp.

<400> 4
aatccagtca ctcttggaac atcagcttcc atctcctgca ggtctagtaa gagtctccta 60

catagtaatg gcatcactta tttgtattgg tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag 120

ctcctgattt atcagatgtc caaccttgtc tcaggagtcc cagacaggtt cagtagcagt 180

gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatc agcagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt 240

tattactgtg ctcaaaatct agaacttccg tacacgttcg gaggggggac caagctggaa 300

ataaaacgg 309

<210> 5
<211> 15
<212> DNA
<213> Mus sp.

<400> 5
tactcttgga tgaac 15

<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> Mus sp.

<400> 6
ggctacgcat tcagttac 18

<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> Mus sp.

<400> 7
ggctacgcat tcagttactc ttggatgaac 30

<210> 8
<211> 48
<212> DNA
<213> Mus sp.

<400> 8
aggtctagta agagtctcct acatagtaat ggcatcactt atttgtat 48

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Mus sp.

<400> 9
cagatgtcca accttgtctc a 21

<210> 10
<211> 27
<212> DNA
<213> Mus sp.

<400> 10
gctcaaaatc tagaacttcc gtacacg 27

<210> 11
<211> 1407

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mouse-human chimeric cDNA

<400> 11
atgggttgga gcctcatctt gctcttcctt gtcgctgttg ctacgcgtgt cctgtccgag 60

gtcaagctgc agcagtctgg acctgaactg gtgaagcctg gggcctcagt gaagatttcc 120

tgcaaagctt ctggctacgc attcagttac tcttggatga actgggtgaa actgaggcct 180

ggacagggtc ttgagtggat tggacggatt tttcctggag atggggatac tgactacaat 240

gggaaattca agggcaaggc cacactgact gctgacaaat cctccaacac agcctacatg 300

caactcacca gcctgacctc tgtggactct gcggtctatt tatgtgcaag aaatgtcttt 360

gatggttact ggttagttta ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc tgcagctagc 420

accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 480

gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540

tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 600

tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 660

tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagcaga gcccaaatct 720

tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 780

gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 840

acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 900

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 960

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1020

aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1080

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1140

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1200

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1260

tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1320

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1380

agcctctccc tgtctccggg taaatga 1407

<210> 12
<211> 720
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mouse-human chimeric cDNA

<400> 12
atggattttc aggtgcagat tatcagcttc ctgctaatca gtgcttcagt cataatgtcc 60

agaggagaca ttgtgctcac ccaaactaca aatccagtca ctcttggaac atcagcttcc 120

atctcctgca ggtctagtaa gagtctccta catagtaatg gcatcactta tttgtattgg 180

tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag ctcctgattt atcagatgtc caaccttgtc 240

tcaggagtcc cagacaggtt cagtagcagt gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatc 300

agcagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgtg ctcaaaatct agaacttccg 360

tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgta cggtggctgc accatctgtc 420

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 480

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 540

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 660

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 720

<210> 13
<211> 468
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mouse-human chimeric polypeptide

<400> 13

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

Val Leu Ser Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
20 25 30

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

Ser Tyr Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Leu Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn
65 70 75 80

Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn
85 90 95

```
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val
            100                 105                 110

Tyr Leu Cys Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp
        115                 120                 125

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

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
145                 150                 155                 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
                165                 170                 175

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

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
        195                 200                 205

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

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

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
                245                 250                 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
            260                 265                 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
        275                 280                 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
    290                 295                 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
305                 310                 315                 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                325                 330                 335
```

```
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
            340                 345                 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        355                 360                 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    370                 375                 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385                 390                 395                 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                405                 410                 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
            420                 425                 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        435                 440                 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    450                 455                 460

Ser Pro Gly Lys
465
```

<210> 14
<211> 239
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mouse-human chimeric polypeptide

<400> 14

```
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1               5                   10                  15

Val Ile Met Ser Arg Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Thr Asn Pro
            20                  25                  30

Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
        35                  40                  45

Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys
    50                  55                  60
```

```
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val
65                  70                  75                  80

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

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
            100                 105                 110

Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
        115                 120                 125

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

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

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
                165                 170                 175

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

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

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

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

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 15

```
Tyr Ser Trp Met Asn
1               5
```

<210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 16

Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr
1 5

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 17

Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser Trp Met Asn
1 5 10

<210> 18
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 18

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 19

Gln Met Ser Asn Leu Val Ser
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 20

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 21
<211> 51
<212> DNA
<213> Mus sp.

<400> 21
cggatttttc ctggagatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg c 51

<210> 22

<211> 24
<212> DNA
<213> Mus sp.

<400> 22
tttcctggag atggggatac tgac 24

<210> 23
<211> 30
<212> DNA
<213> Mus sp.

<400> 23
cggatttttc ctggagatgg ggatactgac 30

<210> 24
<211> 30
<212> DNA
<213> Mus sp.

<400> 24
aatgtctttg atggttactg gttagtttac 30

<210> 25
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 25

Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 26

Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp
1 5

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 27

Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp
1 5 10

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 28

Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr
1 5 10

<210> 29
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric DNA

<400> 29
caggtgcaat tggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttccggata caccttcagc tattcttgga tgagctgggt gcggcaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180

gcacagaaat tccaaggaag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 30
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric polypeptide

<400> 30

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 31
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric DNA

<400> 31
caggtgcaat tggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttccggata cgccttcagc tattcttgga tgaactgggt gcggcaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180

aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 32
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric polypeptide

<400> 32

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
```

50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 33
<211> 366
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric DNA

<400> 33
caggtgcaat tggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttccggata cgccttcagc tattcttgga tgaactgggt gcggcaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180

aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt atctgtgtgc aagaaatgtc 300

tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctcagct 360

agcacc 366

<210> 34
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric polypeptide

<400> 34

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 35
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric DNA

<400> 35
caggtgcaat tggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggagcttc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg tctccggata cgcgttcagc tattcttgga tgaactgggt gcggcaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180

aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 36
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric polypeptide

<400> 36

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser

20 25 30

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 37
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric DNA

<400> 37
caggtgcaat tggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttccggata cgcgttcagc tattcttgga tgagctgggt gcggcaggcg 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180

aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 38
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric polypeptide

<400> 38

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 39
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric DNA

<400> 39
caggtgcaat tggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttccggata cgccttcagc tattcttgga tcaattgggt gcggcaggcg 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180

aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 40
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric polypeptide

<400> 40

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 41
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric DNA

<400> 41
caggtgcaat tggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttccggata cgccttcagc tattcttgga tctcgtgggt gcggcaggcg 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180

aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 42
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Mouse-human chimeric polypeptide

<400> 42

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 43
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric DNA

<400> 43

```
caggtgcaat tggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggcgcctc agtgaaggtc     60

tcctgcaagg cttccggata caccttcaca tacagctgga tgaactgggt gcggcaggcc    120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac    180

aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat    240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc    300

tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctca       357
```

<210> 44
<211> 119
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric polypeptide

<400> 44

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 45
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric DNA

<400> 45
caggtgcaat tggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggcgcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttccggata caccttcagc tattcttgga tgaactgggt gcggcaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180

aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 46
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric polypeptide

<400> 46

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 47
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric DNA

<400> 47
caggtgcaat tggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttccggata caccttcacc tattcttgga tgcactgggt gcggcaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180

gcacagaaat tccaaggaag agtcacaatg acacgggaca cgtccacttc caccgtctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 48
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric polypeptide

<400> 48

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 49
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric DNA

<400> 49
gaggtgcaat tggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggggccac cgtgaagatc 60

tcctgcaagg tgtccggata caccttcacc tattcttgga tgcactgggt gcagcaggcc 120

cctggaaagg ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180

gcagagaaat tccaaggaag agtcacaatc acagccgaca cgtccactga caccgcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaccaatgtc 300

tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 50
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric polypeptide

<400> 50

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Thr Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 51
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric DNA

<400> 51
gaggtgcaat tggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggggccac cgtgaagatc 60

tcctgcaagg tgtccggata caccttcacc tattcttgga tgaactgggt gcagcaggcc 120

cctggaaagg ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180

aatgggaaat tcaagggaag agtcacaatc acagccgaca cgtccactga caccgcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaccaatgtc 300

tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 52
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric polypeptide

<400> 52

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Thr Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 53
<211> 366
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric DNA

<400> 53
cagatgcaat tggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaaga ccgggagttc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttccggata caccttcacc tattcttgga tgagctgggt gcggcaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180

gcacagaaat tccaaggaag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctcagct 360

agcacc 366

<210> 54
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric polypeptide

<400> 54

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 55
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric DNA

<400> 55
gaagtgcagc tggtggagtc tggaggaggc ttggtcaagc ctggcgggtc cctgcggctc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacatttagc tattcttgga tgaactgggt gcggcaggct 120

cctggaaagg gcctcgagtg ggtgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180

aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 56
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric polypeptide

<400> 56

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 57
<211> 456

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric DNA

<400> 57
cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60

cagcagccac aggagcccac tccgaagtgc agctggtgga gtctggagga ggcttggtca 120

agcctggcgg gtccctgcgg ctctcctgtg cagcctctgg attcgcattc agctattctt 180

ggatgaactg ggtgcggcag gctcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240

ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg 300

acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360

tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420

ccctggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 58
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric polypeptide

<400> 58

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 59
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric DNA

<400> 59
caggtgcagc tggtggagtc tggaggaggc ttggtcaagc ctggcgggtc cctgcggctc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacatttagc tattcttgga tgaactgggt gcggcaggct 120

cctggaaagg gcctcgagtg ggtgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180

aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 60
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric polypeptide

<400> 60

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 61
<211> 456
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric DNA

<400> 61
cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60

cagcagccac aggagctcac tccgaagtgc agctcgtgga gtctggagca ggcttggtca 120

agcctggcgg gtccctgcgg ctctcctgcg cagcctctgg attcacattt agctattctt 180

ggatgaactg ggtgcggcag gctcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240

ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg 300

acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360

tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420

ccctggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 62
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric polypeptide

<400> 62

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 63
<211> 456
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric DNA

<400> 63
cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60

cagcagccac aggagctcac tccgaagtgc agctcgtcga gtctggagga ggcgtggtca 120

agcctggcgg gtccctgcgg ctctcctgcg cagcctctgg attcacattt agctattctt 180

ggatgaactg ggtgcggcag gctcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240

ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg 300

acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360

tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420

ccctggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 64
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric polypeptide

<400> 64

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 65
<211> 456
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric DNA

<400> 65
cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60

cagcagccac aggagctcac tccgaagtgc agctggtcga gtccggagga ggcttgaaga 120

agcctggcgg gtccctgcgg ctctcctgcg cagcctctgg attcacattt agctattctt 180

ggatgaactg ggtgcggcag gctcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240

ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg 300

acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360

tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420

ccctggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 66
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric polypeptide

<400> 66

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 67
<211> 456
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric DNA

<400> 67
cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60

cagcagccac aggagcccac tccgaagtgc agctggtgga gtctggagga ggcttggtca 120

agcctggctc ttccctgcgg ctctcctgcg cagcctctgg attcacattt agctattctt 180

ggatgaactg ggtgcggcag gctcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240

ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg 300

acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360

tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420

ccctggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 68
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Mouse-human chimeric polypeptide

<400> 68

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 69
<211> 456
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric DNA

<400> 69
cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60

cagcagccac aggagcccac tccgaagtgc agctggtgga gtctggagga ggcttggtca 120

agcctggcgg gtccctgcgg gtcagctgcg cagcctctgg attcacattt agctattctt 180

ggatgaactg ggtgcggcag gctcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240

ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg 300

acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360

tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420

ccctggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 70
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric polypeptide

<400> 70

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 71
<211> 456
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric DNA

<400> 71
cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60

cagcagccac aggagcccac tccgaagtgc agctggtgga gtctggagga ggcttggtca 120

agcctggcgg gtccctgcgg ctctcctgcg cagcctctgg attcacattt agctattctt 180

ggatgaactg ggtgcggcag gctcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240

ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg 300

acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360

tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420

ccctggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 72
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric polypeptide

<400> 72

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 73
<211> 57
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 73
atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcc 57

<210> 74
<211> 19

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 74

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 75
<211> 345
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric DNA

<400> 75
gatatcgtga tgacccagac tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gcccgccagc 60

attagctgca ggtctagcaa gagcctcttg cacagcaatg gcatcactta tttgtattgg 120

tacctgcaaa agccagggca gtctccacag ctcctgattt atcaaatgtc caaccttgtc 180

tctggcgtcc ctgaccggtt ctccggatcc gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240

agcagggtgg aggctgagga tgttggagtt tattactgcg ctcagaatct agaacttcct 300

tacaccttcg gcggagggac caaggtggag atcaaacgta cggtg 345

<210> 76
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mouse-human chimeric polypeptide

<400> 76

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85 90 95

Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val
115

<210> 77
<211> 66
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 77
atggacatga gggtccccgc tcagctcctg ggcctcctgc tgctctggtt cccaggtgcc 60

aggtgt 66

<210> 78
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 78

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys
20

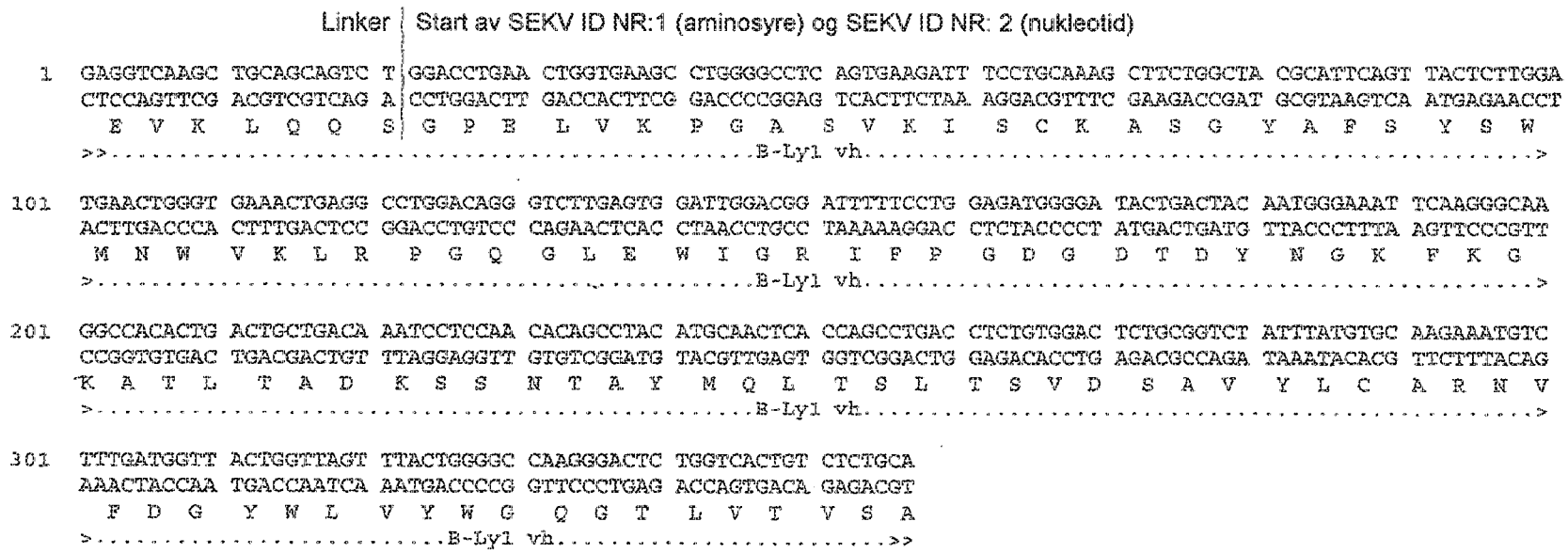

Linker | Start av SEKV ID NR:1 (aminosyre) og SEKV ID NR: 2 (nukleotid)
1 GAGGTCAAGC TGCAGCAGTC T|GGACCTGAA CTGGTGAAGC CTGGGGCCTC AGTGAAGATT TCCTGCAAAG CTTCTGGCTA CGCATTCAGT TACTCTTGGA
CTCCAGTTCG ACGTCGTCAG A|CCTGGACTT GACCACTTCG GACCCCGGAG TCACTTCTAA AGGACGTTTC GAAGACCGAT GCGTAAGTCA ATGAGAACCT
E V K L Q Q S|G P E L V K P G A S V K I S C K A S G Y A F S Y S W
>>.....B-Ly1 vh.....>
101 TGAACTGGGT GAAACTGAGG CCTGGACAGG GTCTTGAGTG GATTGGACGG ATTTTTCCTG GAGATGGGGA TACTGACTAC AATGGGAAAT TCAAGGGCAA
ACTTGACCCA CTTTGACTCC GGACCTGTCC CAGAACTCAC CTAACCTGCC TAAAAAGGAC CTCTACCCCT ATGACTGATG TTACCCTTTA AGTTCCCGTT
M N W V K L R P G Q G L E W I G R I F P G D G D T D Y N G K F K G
>.....B-Ly1 vh.....>
201 GGCCACACTG ACTGCTGACA AATCCTCCAA CACAGCCTAC ATGCAACTCA CCAGCCTGAC CTCTGTGGAC TCTGCGGTCT ATTTATGTGC AAGAAATGTC
CCGGTGTGAC TGACGACTGT TTAGGAGGTT GTGTCGGATG TACGTTGAGT GGTCGGACTG GAGACACCTG AGACGCCAGA TAAATACACG TTCTTTACAG
K A T L T A D K S S N T A Y M Q L T S L T S V D S A V Y L C A R N V
>.....B-Ly1 vh.....>
301 TTTGATGGTT ACTGGTTAGT TTACTGGGGC CAAGGGACTC TGGTCACTGT CTCTGCA
AAACTACCAA TGACCAATCA AATGACCCCG GTTCCCTGAG ACCAGTGACA GAGACGT
F D G Y W L V Y W G Q G T L V T V S A
>.....B-Ly1 vh.....>>

Fig. 1

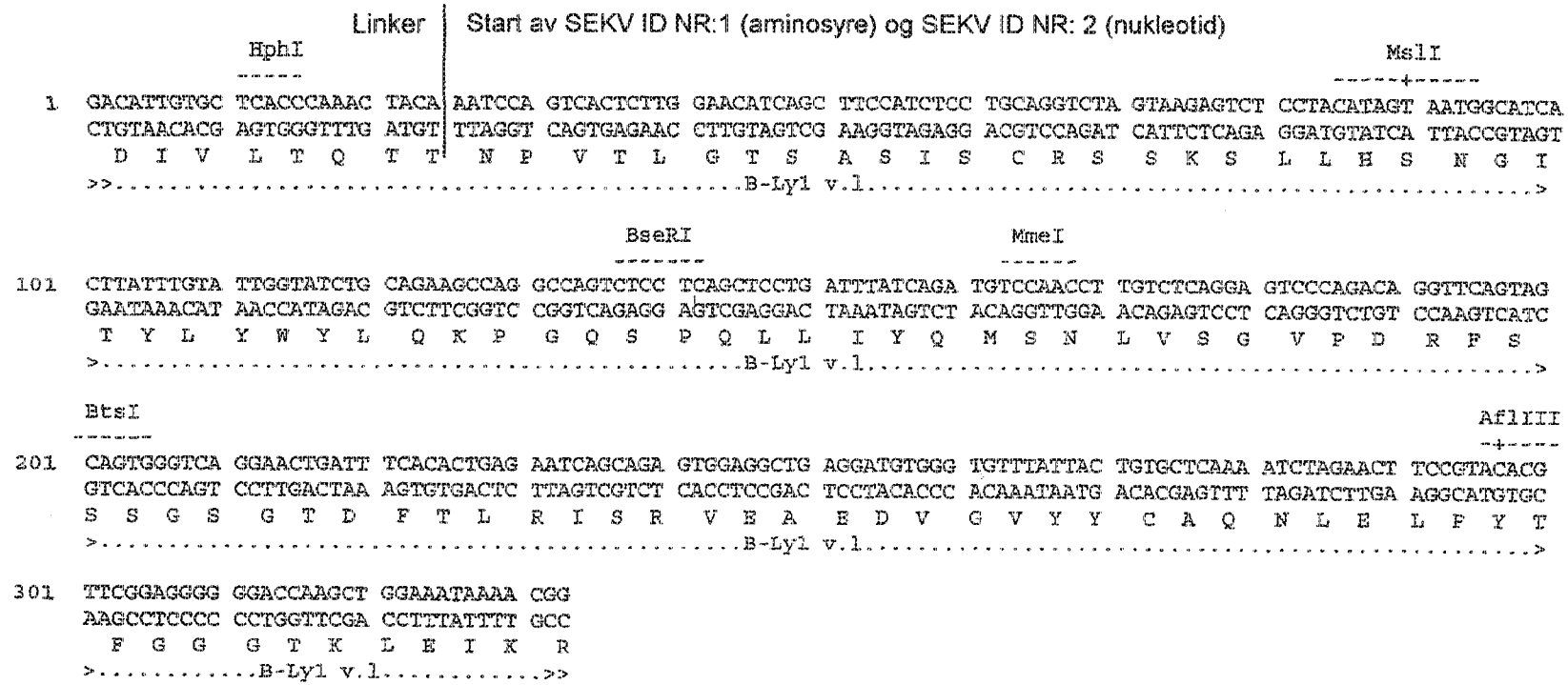

Linker
Start av SEKV ID NR:1 (aminosyre) og SEKV ID NR: 2 (nukleotid)
HphI
MslI
BseRI
MmeI
BtsI
AflIII
1 GACATTGTGC TCACCCAAAC TACA AATCCA GTCACTCTTG GAACATCAGC TTCCATCTCC TGCAGGTCTA GTAAGAGTCT CCTACATAGT AATGGCATCA
CTGTAACACG AGTGGGTTTG ATGT TTAGGT CAGTGAGAAC CTTGTAGTCG AAGGTAGAGG ACGTCCAGAT CATTCTCAGA GGATGTATCA TTACCGTAGT
D I V L T Q T T N P V T L G T S A S I S C R S S K S L L H S N G I
>>.....B-Ly1 v.1.....>
101 CTTATTTGTA TTGGTATCTG CAGAAGCCAG GCCAGTCTCC TCAGCTCCTG ATTTATCAGA TGTCCAACCT TGTCTCAGGA GTCCCAGACA GGTTCAGTAG
GAATAAACAT AACCATAGAC GTCTTCGGTC CGGTCAGAGG AGTCGAGGAC TAAATAGTCT ACAGGTTGGA ACAGAGTCCT CAGGGTCTGT CCAAGTCATC
T Y L Y W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y Q M S N L V S G V P D R F S
>.....B-Ly1 v.1.....>
201 CAGTGGGTCA GGAACTGATT TCACACTGAG AATCAGCAGA GTGGAGGCTG AGGATGTGGG TGTTTATTAC TGTGCTCAAA ATCTAGAACT TCCGTACACG
GTCACCCAGT CCTTGACTAA AGTGTGACTC TTAGTCGTCT CACCTCCGAC TCCTACACCC ACAAATAATG ACACGAGTTT TAGATCTTGA AGGCATGTGC
S S G S G T D F T L R I S R V E A E D V G V Y Y C A Q N L E L P Y T
>.....B-Ly1 v.1.....>
301 TTCGGAGGGG GGACCAAGCT GGAAATAAAA CGG
AAGCCTCCCC CCTGGTTCGA CCTTTATTTT GCC
F G G G T K L E I K R
>.....B-Ly1 v.1.....>>

Fig. 2

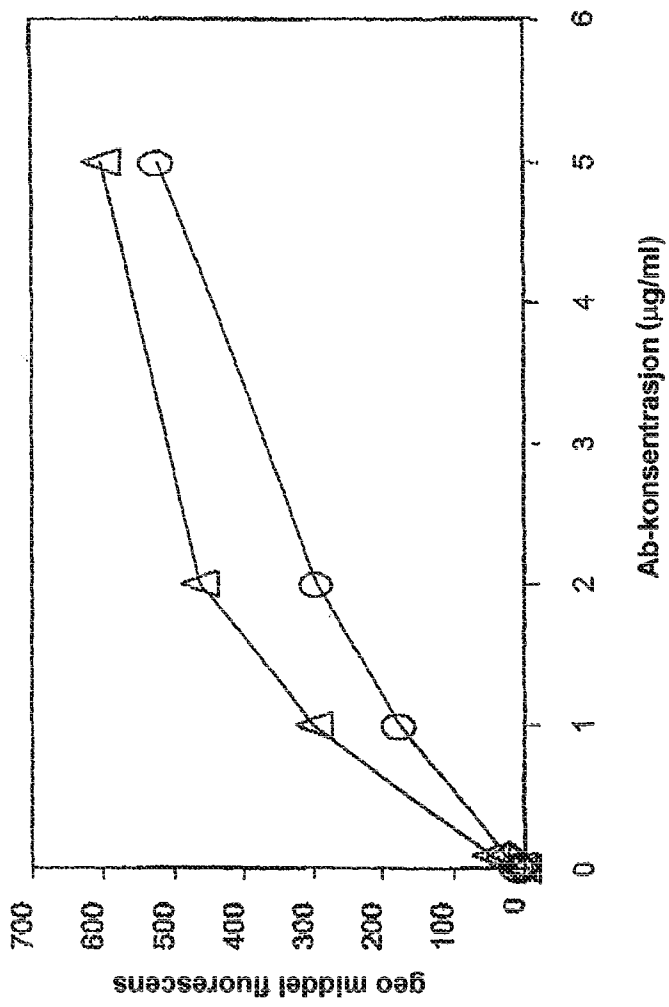

geo middel fluorescens
700
600
500
400
300
200
100
0
0
1
2
3
4
5
6
Ab-konsentrasjon (µg/ml)

Fig. 3

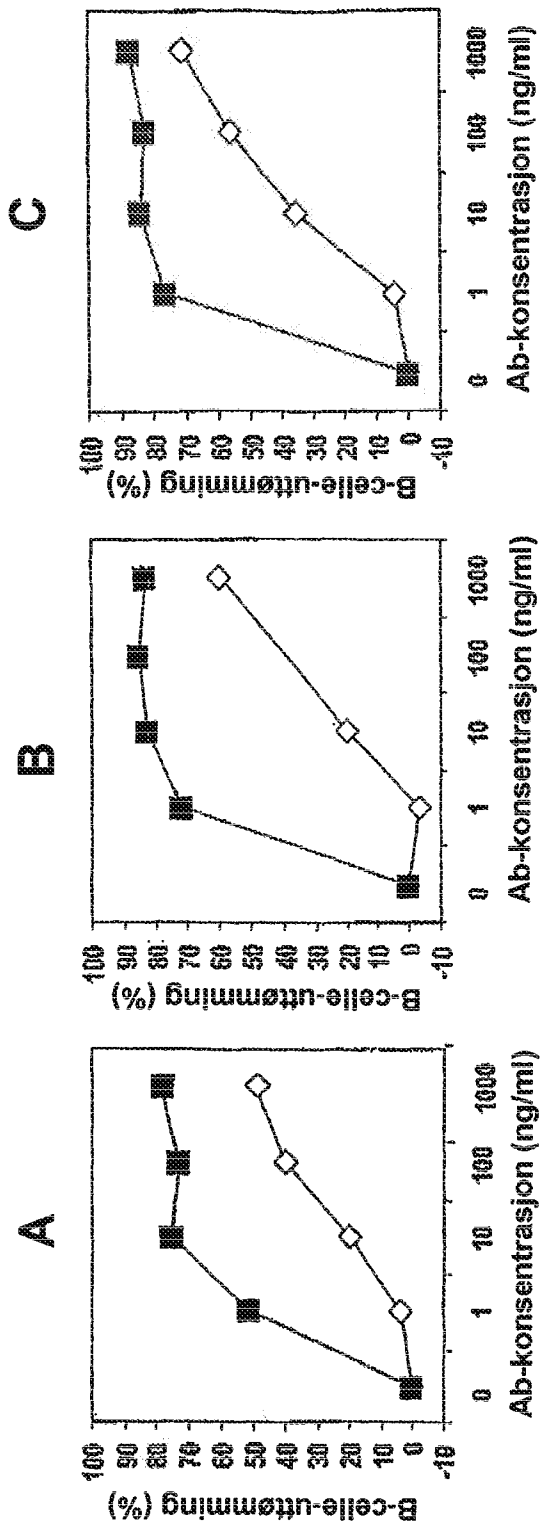

A
B
C
B-celle-uttømming (%)
Ab-konsentrasjon (ng/ml)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
0
1
10
100
1000

Fig. 4

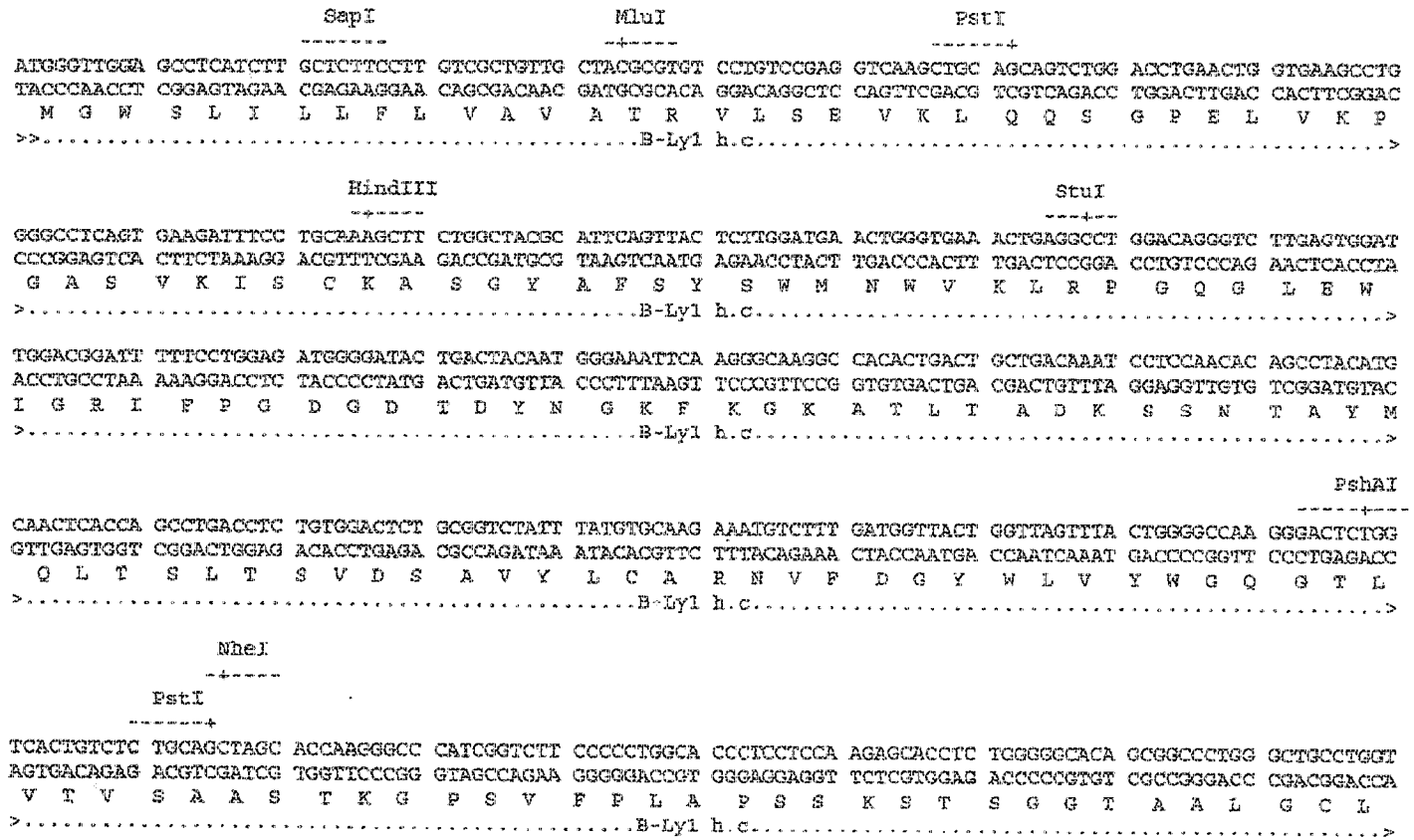
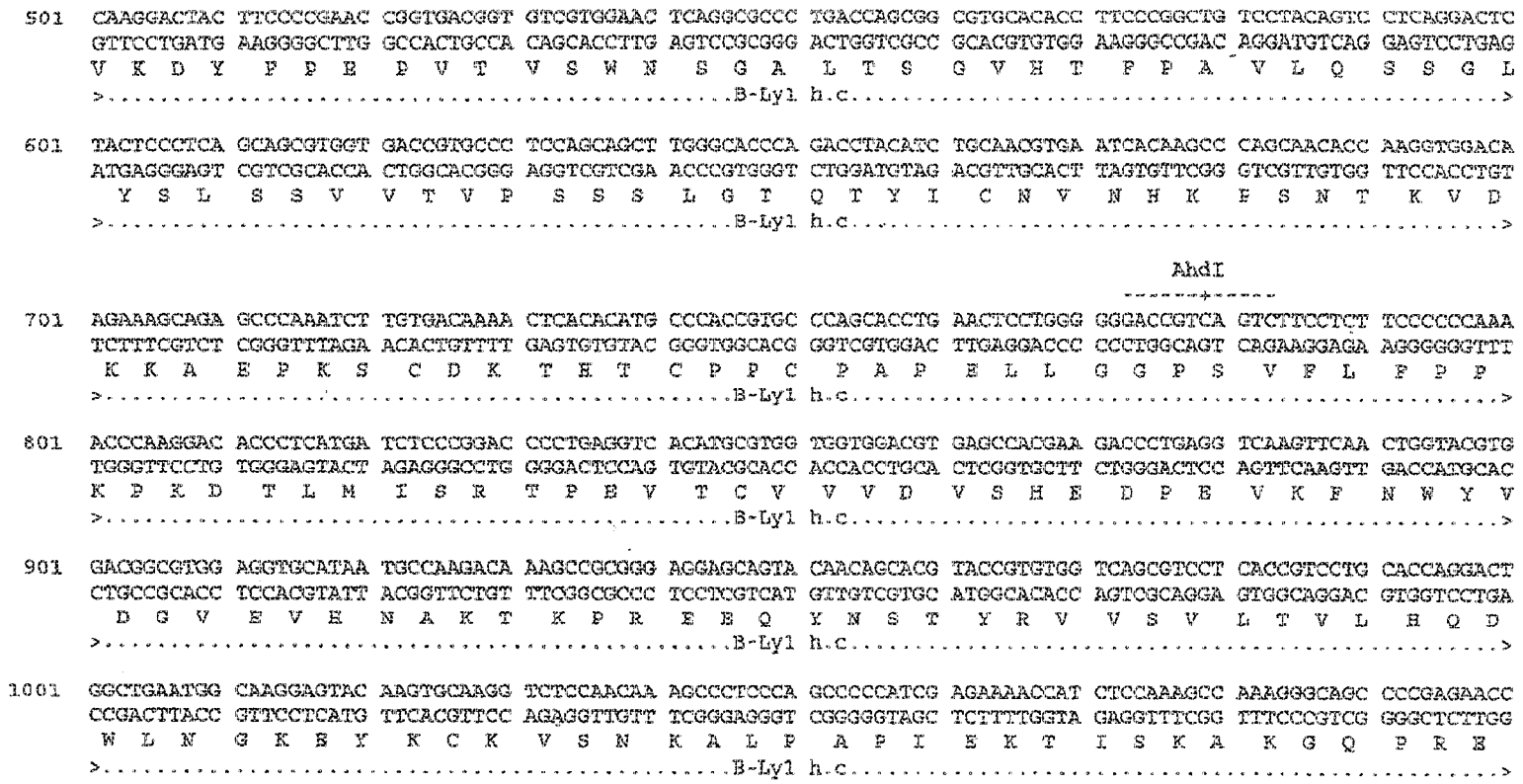
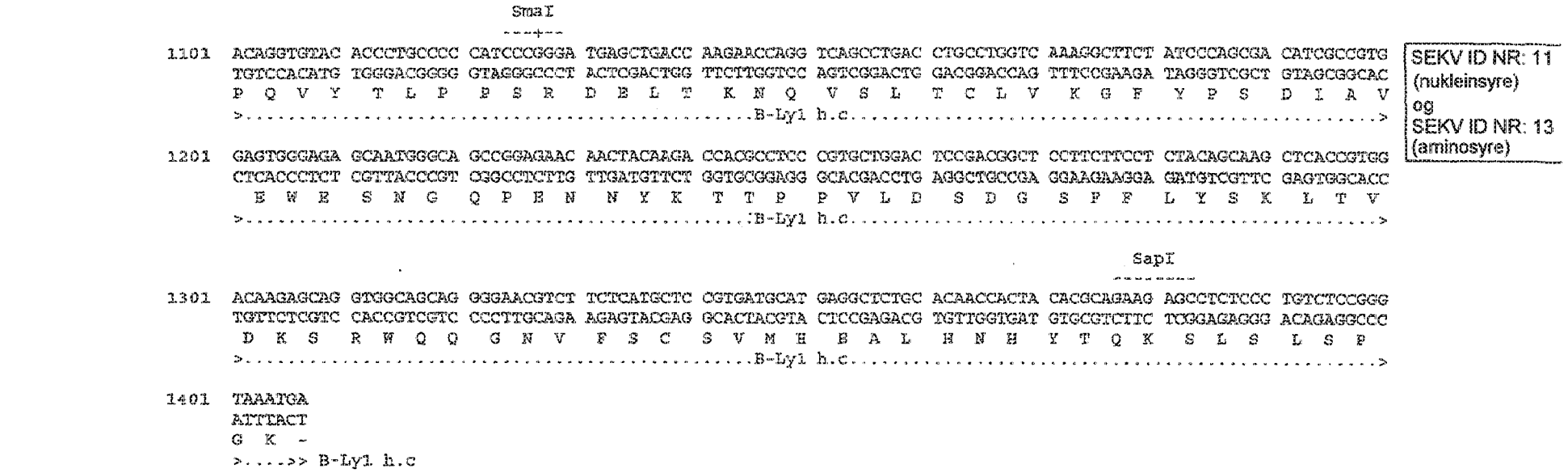

SapI
MluI
PstI
1 ATGGGTTGGA GCCTCATCTT GCTCTTCCTT GTCGCTGTTG CTACGCGTGT CCTGTCCGAG GTCAAGCTGC AGCAGTCTGG ACCTGAACTG GTGAAGCCTG
TACCCAACCT CGGAGTAGAA CGAGAAGGAA CAGCGACAAC GATGCGCACA GGACAGGCTC CAGTTCGACG TCGTCAGACC TGGACTTGAC CACTTCGGAC
M G W S L I L L F L V A V A T R V L S E V K L Q Q S G P E L V K P
>>.....B-Ly1 h.c.....>
SEKV ID NR: 11 (nukleinsyre) og SEKV ID NR: 13 (aminosyre)
HindIII
StuI
101 GGGCCTCAGT GAAGATTTCC TGCAAAGCTT CTGGCTACGC ATTCAGTTAC TCTTGGATGA ACTGGGTGAA ACTGAGGCCT GGACAGGGTC TTGAGTGGAT
CCCGGAGTCA CTTCTAAAGG ACGTTTCGAA GACCGATGCG TAAGTCAATG AGAACCTACT TGACCCACTT TGACTCCGGA CCTGTCCCAG AACTCACCTA
G A S V K I S C K A S G Y A F S Y S W M N W V K L R P G Q G L E W
>.....B-Ly1 h.c.....>
201 TGGACGGATT TTTCCTGGAG ATGGGGATAC TGACTACAAT GGGAAATTCA AGGGCAAGGC CACACTGACT GCTGACAAAT CCTCCAACAC AGCCTACATG
ACCTGCCTAA AAAGGACCTC TACCCCTATG ACTGATGTTA CCCTTTAAGT TCCCGTTCCG GTGTGACTGA CGACTGTTTA GGAGGTTGTG TCGGATGTAC
I G R I F P G D G D T D Y N G K F K G K A T L T A D K S S N T A Y M
>.....B-Ly1 h.c.....>
PshAI
301 CAACTCACCA GCCTGACCTC TGTGGACTCT GCGGTCTATT TATGTGCAAG AAATGTCTTT GATGGTTACT GGTTAGTTTA CTGGGGCCAA GGGACTCTGG
GTTGAGTGGT CGGACTGGAG ACACCTGAGA CGCCAGATAA ATACACGTTC TTTACAGAAA CTACCAATGA CCAATCAAAT GACCCCGGTT CCCTGAGACC
Q L T S L T S V D S A V Y L C A R N V F D G Y W L V Y W G Q G T L
>.....B-Ly1 h.c.....>
NheI
PstI
401 TCACTGTCTC TGCAGCTAGC ACCAAGGGCC CATCGGTCTT CCCCCTGGCA CCCTCCTCCA AGAGCACCTC TGGGGGCACA GCGGCCCTGG GCTGCCTGGT
AGTGACAGAG ACGTCGATCG TGGTTCCCGG GTAGCCAGAA GGGGGACCGT GGGAGGAGGT TCTCGTGGAG ACCCCCGTGT CGCCGGGACC CGACGGACCA
V T V S A A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L
>.....B-Ly1 h.c.....>

Fig. 5A



SEKV ID NR: 11
(nukleinsyre)
og
SEKV ID NR: 13
(aminosyre)

Fig. 5B



SEKV ID NR: 11 (nukleinsyre) og SEKV ID NR: 13 (aminosyre)

Fig. 5C

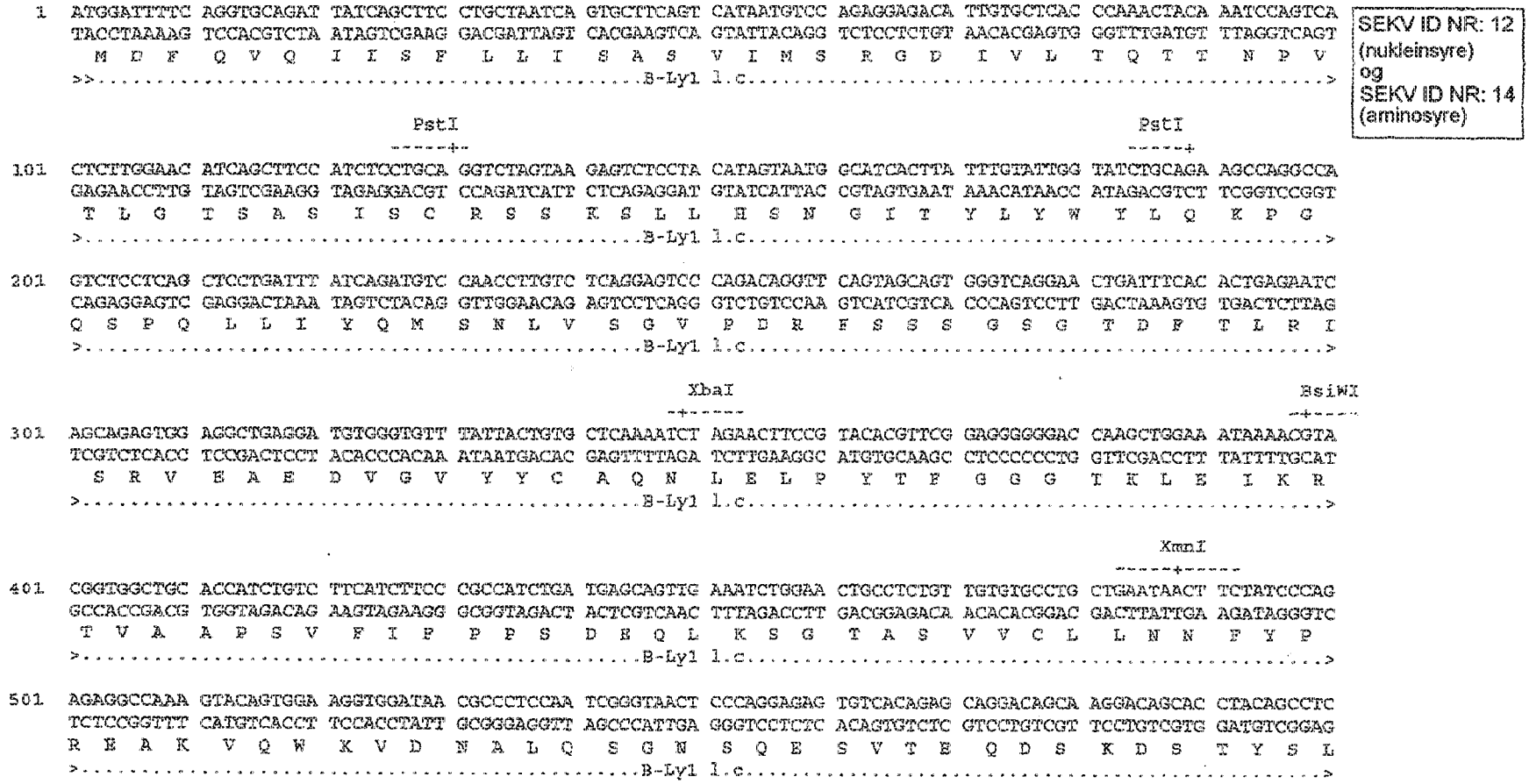

SEKV ID NR: 12
(nukleinsyre)
og
SEKV ID NR: 14
(aminosyre)
PstI
PstI
XbaI
BsiWI
XmnI
B-Ly1 l.c

Fig. 6A

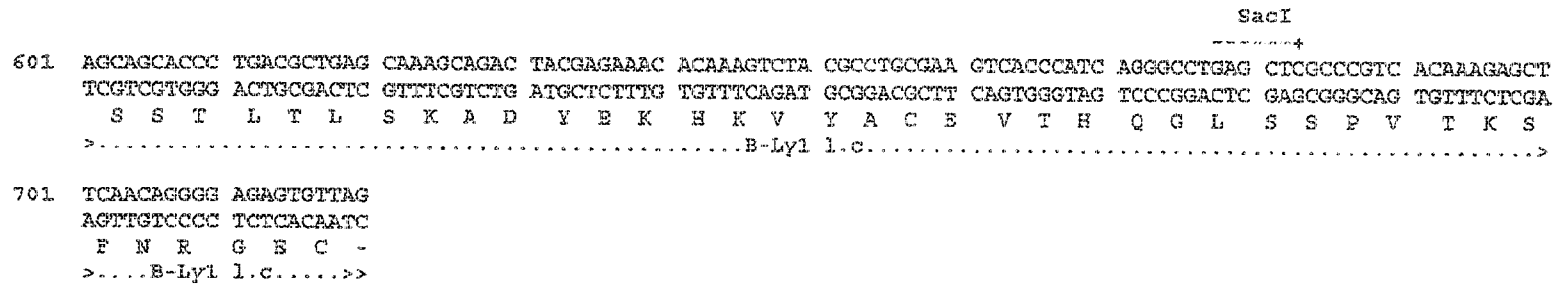

SacI
601
AGCAGCACCC TGACGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAAGTCTA CGCCTGCGAA GTCACCCATC AGGGCCTGAG CTCGCCCGTC ACAAAGAGCT
TCGTCGTGGG ACTGCGACTC GTTTCGTCTG ATGCTCTTTG TGTTTCAGAT GCGGACGCTT CAGTGGGTAG TCCCGGACTC GAGCGGGCAG TGTTTCTCGA
S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S
>.....B-Lyl l.c.....>
701
TCAACAGGGG AGAGTGTTAG
AGTTGTCCCC TCTCACAATC
F N R G E C -
>....B-Lyl l.c.....>>
SEKV ID NR: 12
(nukleinsyre)
og
SEKV ID NR: 14
(aminosyre)

Fig. 6B

A

CDR1(Kabat):	
TACTCTTGGATGAAC	SEKV ID NR: 5
TyrSerTrpMetAsn	SEKV ID NR: 15
CDR1(Chothia):	
GGCTACGCATTCAGTTAC	SEKV ID NR: 6
GlyTyrAlaPheSerTyr	SEKV ID NR: 16
CDR1(AbM):	
GGCTACGCATTCAGTTACTCTTGGATGAAC	SEKV ID NR: 7
GlyTyrAlaPheSerTyrSerTrpMetAsn	SEKV ID NR: 17
CDR2(Kabat):	
CGGATTTTTCCTGGAGATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC	SEKV ID NR: 21
ArgIlePheProGlyAspGlyAspThrAspTyrAsnGlyLysPheLysGly	SEKV ID NR: 25
CDR2(Chothia):	
TTTCCTGGAGATGGGGATACTGAC	SEKV ID NR: 22
PheProGlyAspGlyAspThrAsp	SEKV ID NR: 26
CDR2(AbM):	
CGGATTTTTCCTGGAGATGGGGATACTGAC	SEKV ID NR: 23
ArgIlePheProGlyAspGlyAspThrAsp	SEKV ID NR: 27
CDR3(Kabat, Chothia, AbM):	
AATGTCTTTGATGGTTACTGGTTAGTTTAC	SEKV ID NR: 24
AsnValPheAspGlyTyrTrpLeuValTyr	SEKV ID NR: 28

B

CDR1(Kabat):	
AGGTCTAGTAAGAGTCTCCTACATAGTAATGGCATCACTTATTTGTAT	SEKV ID NR: 8
ArgSerSerLysSerLeuLeuHisSerAsnGlyIleThrTyrLeuTyr	SEKV ID NR: 18
CDR2(Kabat):	
CAGATGTCCAACCTTGTCTCA	SEKV ID NR: 9
GlnMetSerAsnLeuValSer	SEKV ID NR: 19
CDR3(Kabat):	
GCTCAAAATCTAGAACTTCCGTACACG	SEKV ID NR: 10
AlaGlnAsnLeuGluLeuProTyrThr	SEKV ID NR: 20

Fig. 7

1. relative prosentandeler

	Bly-1 m1 031024 016	+ EndoH Bly-1 m1 031024 017
1053		
1256		
1282		
1298		3,70%
1339	18,60%	17,90%
1460		4,30%
1486	5,90%	5,50%
1502	5,10%	3,70%
1543	35,00%	39,20%
1622		
1647	4,60%	3,00%
1664	7%	
1680		
1688	11,00%	10,30%
1705	7,20%	7,30%
1810		
1826		
1850	5,90%	5,20%
1972		
2012		
	100%	100%

Fig. 8A

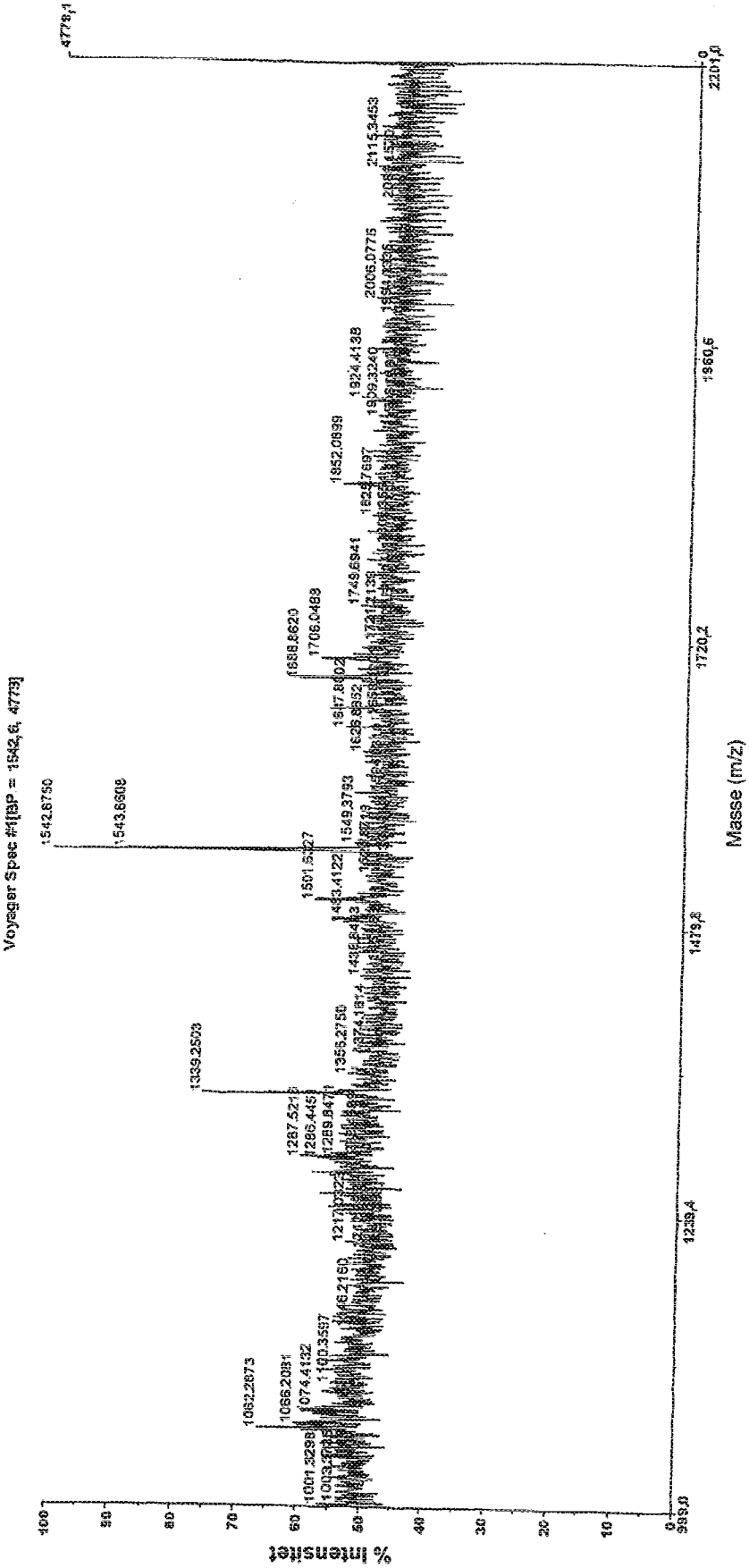

Voyager Spec #1[BP = 1542,6, 4779]
% Intensitet
Masse (m/z)
4779,1
1542,6750
1543,6808
1688,8620
1706,0488
1852,0939
1924,4138
2006,0775
2115,3453
1339,2503
1066,2831
1062,2873
1074,4132
1100,3557
1287,5278
1286,4451
1289,8471
1356,2750
1549,3793
1501,5927
1483,4122
1435,8413
1748,6941
1999,3240
1720,2
1479,8
1239,4
1960,6
2201,0
999,0

Fig. 8B

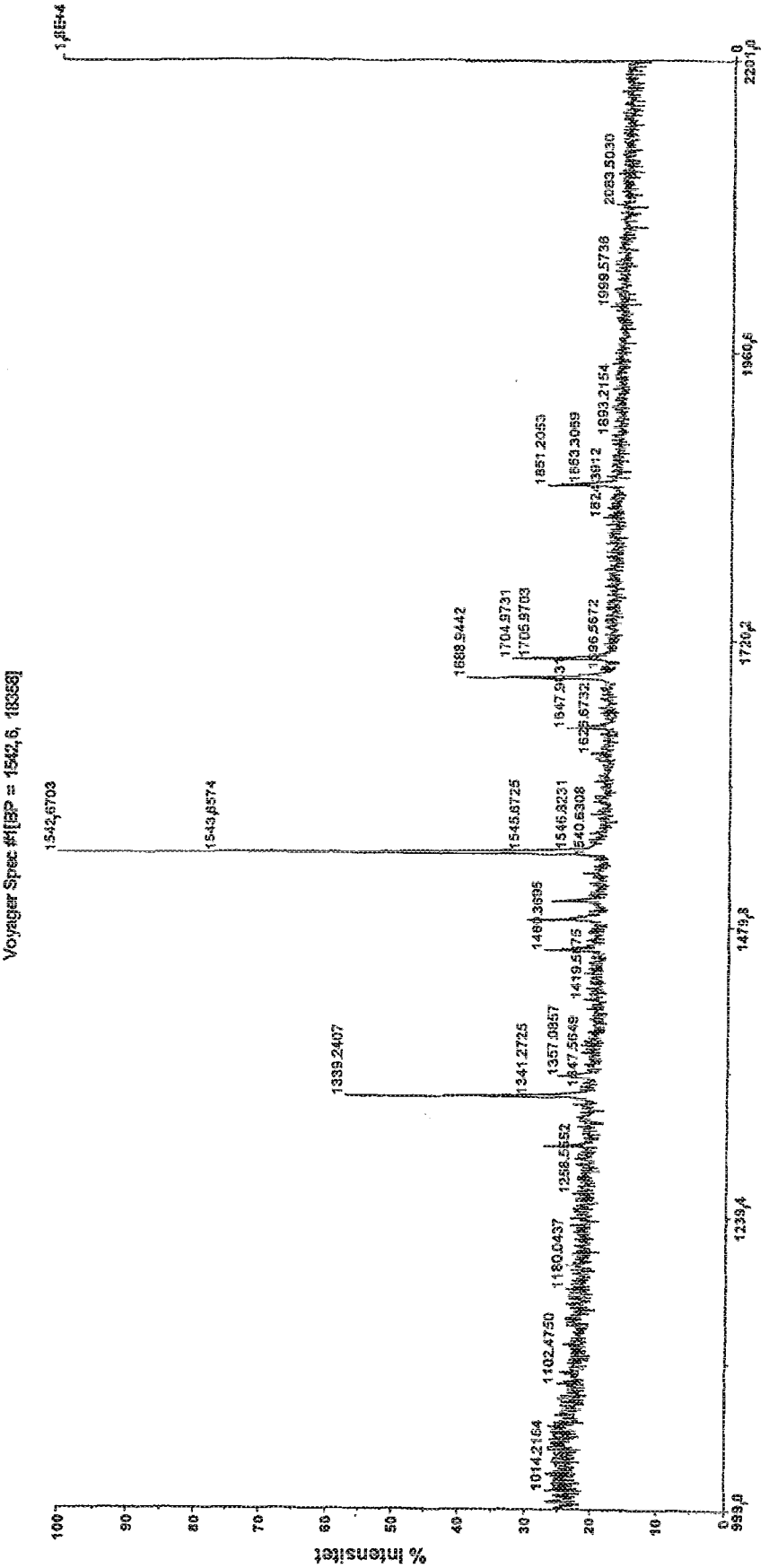

Voyager Spec #1[BP = 1542,6, 183581]
% intensiteit
Masse (m/z)
1542,6703
1543,6574
1545,6725
1339,2407
1341,2725
1357,0857
1847,5649
1469,3695
1419,5875
1545,8231
1540,6308
1688,9442
1704,9731
1705,9703
1851,2053
1663,3059
1999,5736
2083,5030
1014,2164
1102,4750
1180,6437
1258,5552
1239,4
1479,8
1720,2
1960,6
2201,0
999,0

Fig. 8C

Fig. 9

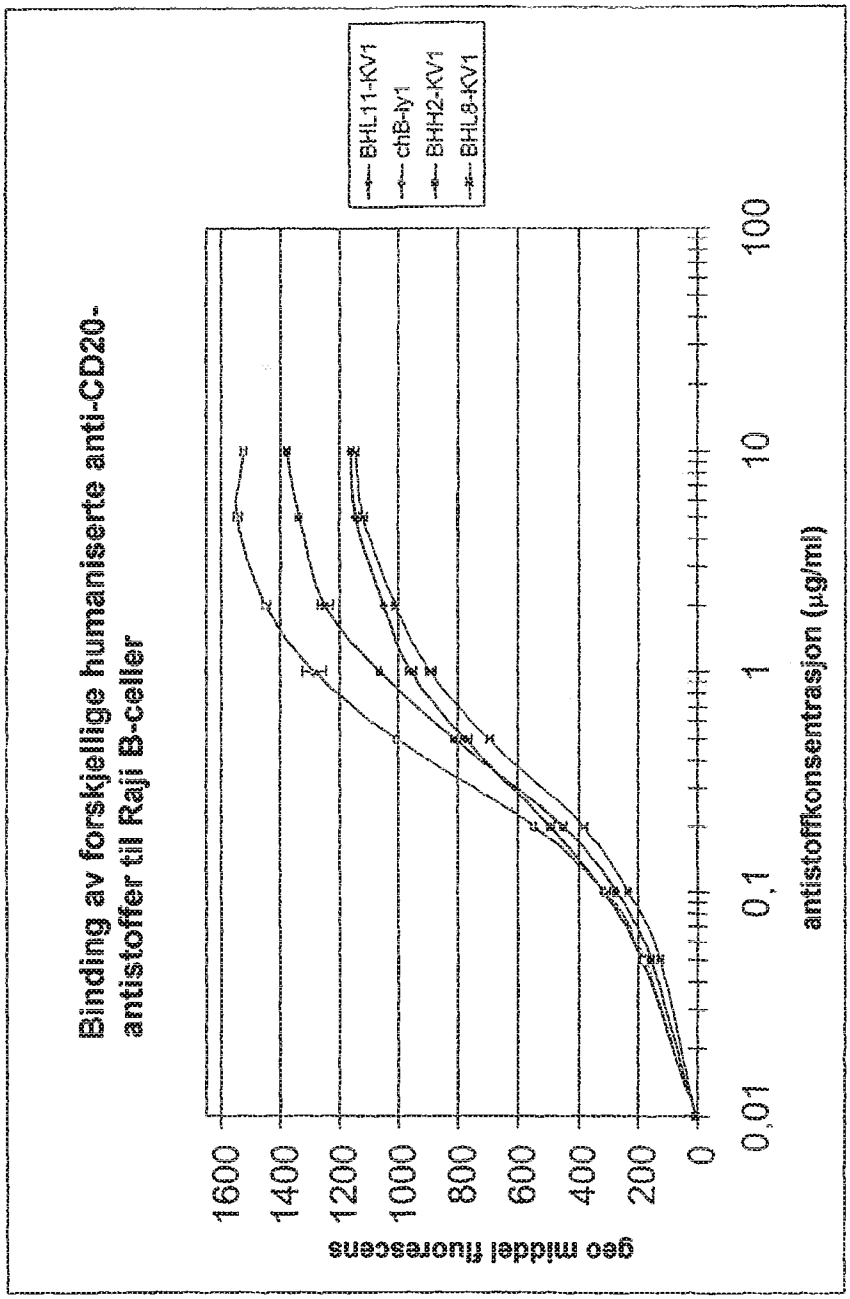

Binding av forskjellige humaniserte anti-CD20-antistoffer til Raji B-celler
geo middel fluorescens
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0,01
0,1
1
10
100
antistoffkonsentrasjon (µg/ml)
BHL11-KV1
chB-ly1
BHH2-KV1
BHL8-KV1

Fig. 10

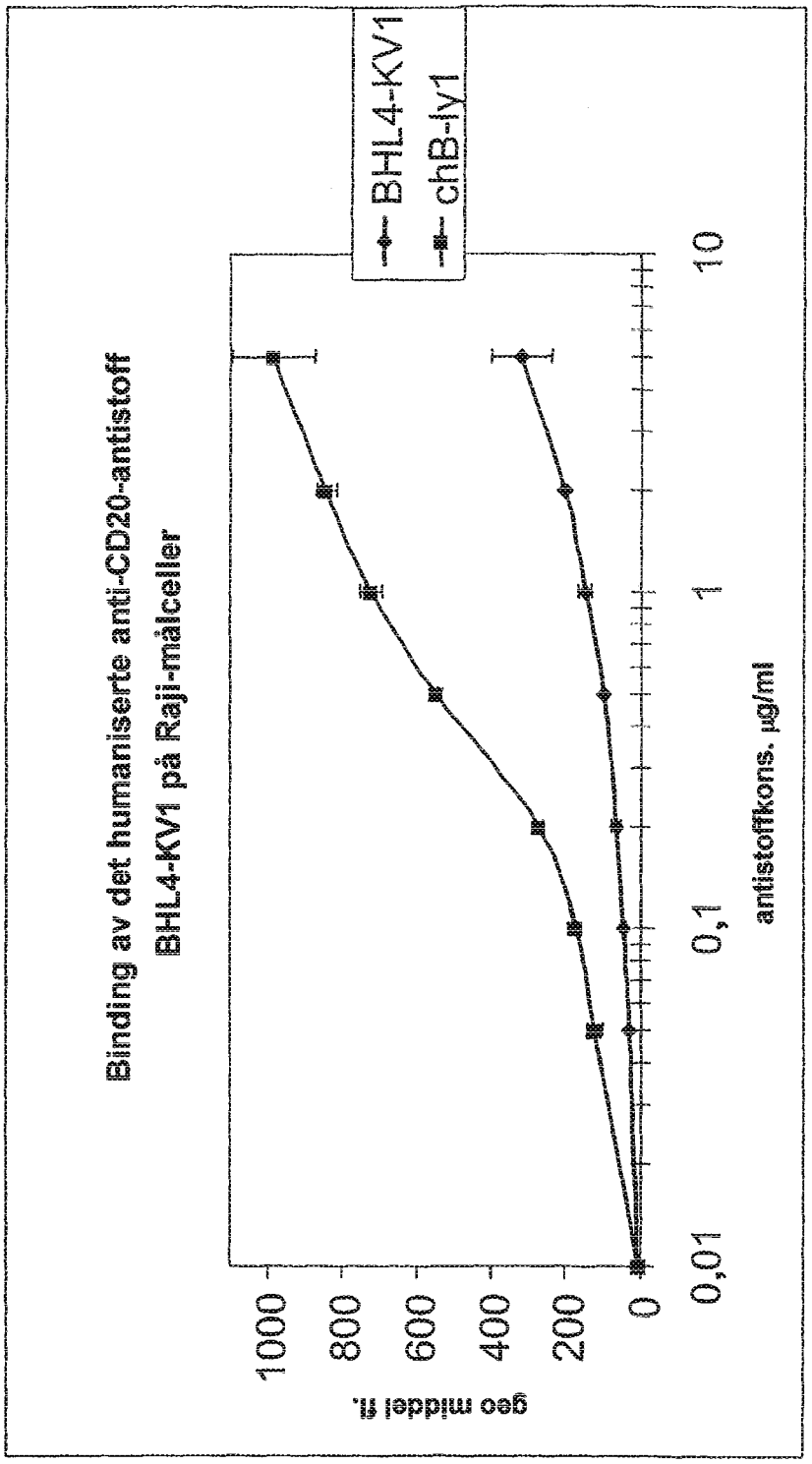

Binding av det humaniserte anti-CD20-antistoff
BHL4-KV1 på Raji-målceller
BHL4-KV1
chB-ly1
geo middel n.
1000
800
600
400
200
0
0,01
0,1
1
10
antistoffkons. µg/ml

Fig. 11

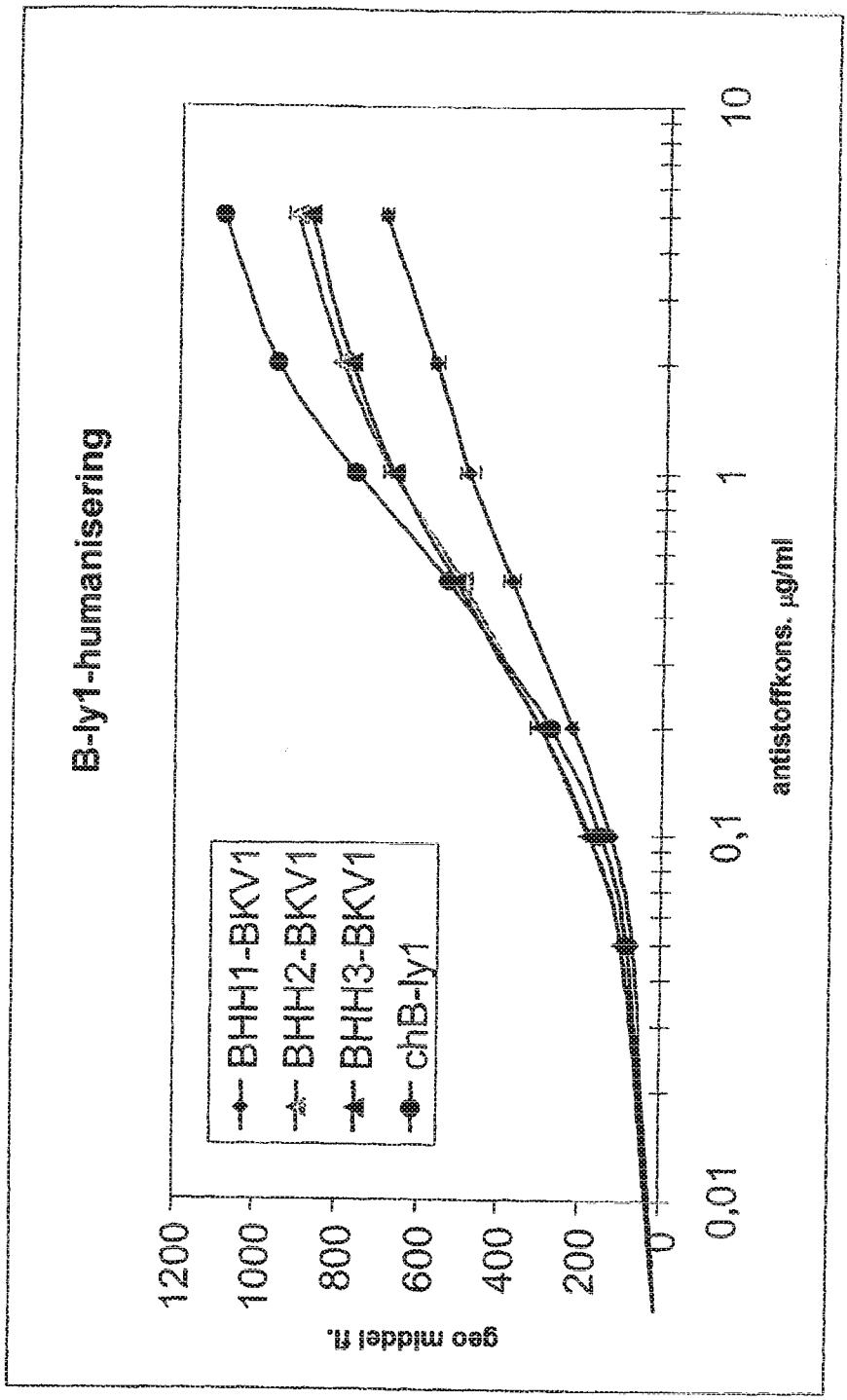

B-ly1-humanisering
BHH1-BKV1
BHH2-BKV1
BHH3-BKV1
chB-ly1
geo middel m.
1200
1000
800
600
400
200
0
0,01
0,1
1
10
antistoffkons. µg/ml

Fig. 12

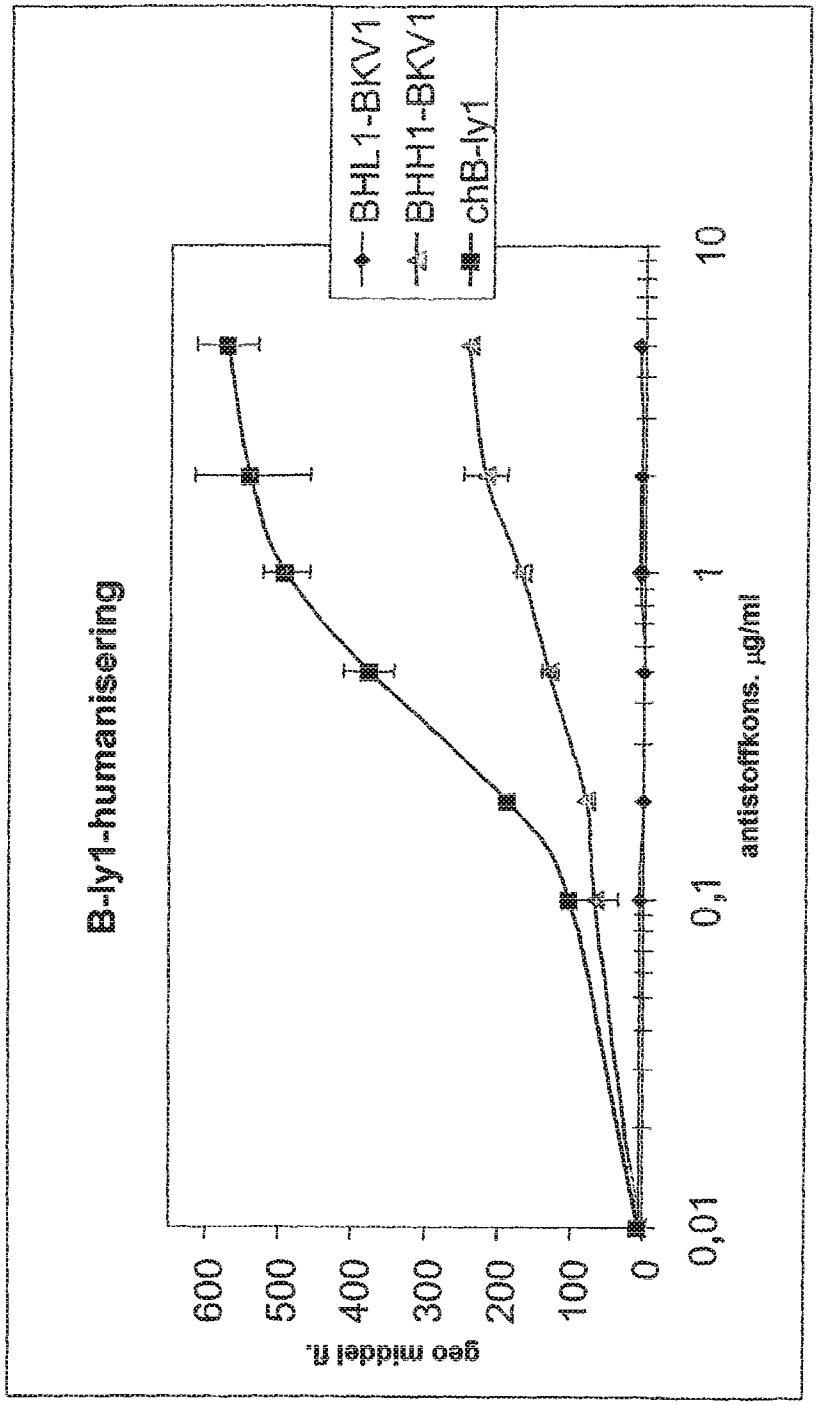

B-ly1-humanisering
BHL1-BKV1
BHH1-BKV1
chB-ly1
geo middel m.
600
500
400
300
200
100
0
0,01
0,1
1
10
antistoffkons. µg/ml

Fig. 13

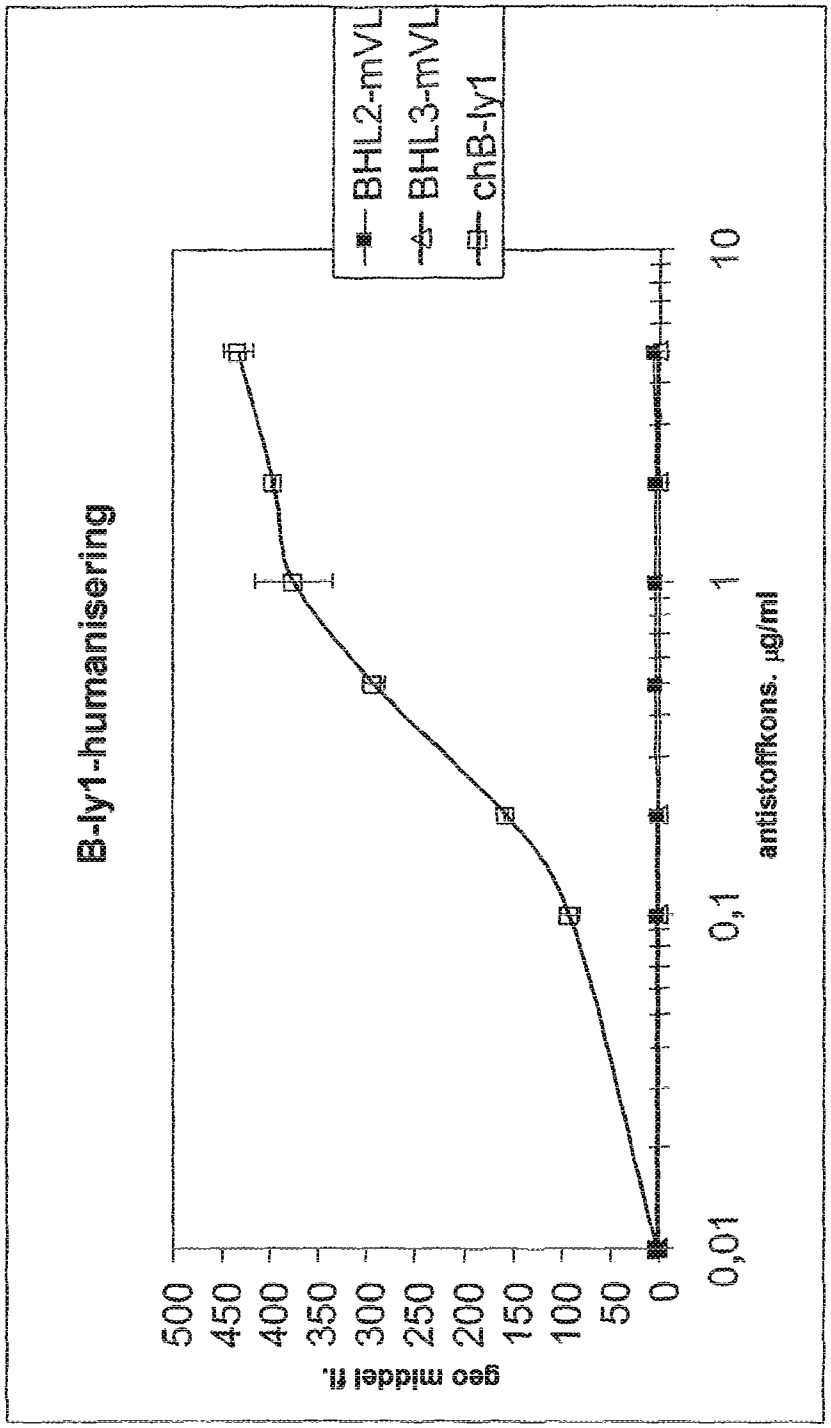

B-ly1-humanisering
BHL2-mVL
BHL3-mVL
chB-ly1
geo middel π.
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0,01
0,1
1
10
antistoffkons. µg/ml

Fig. 14

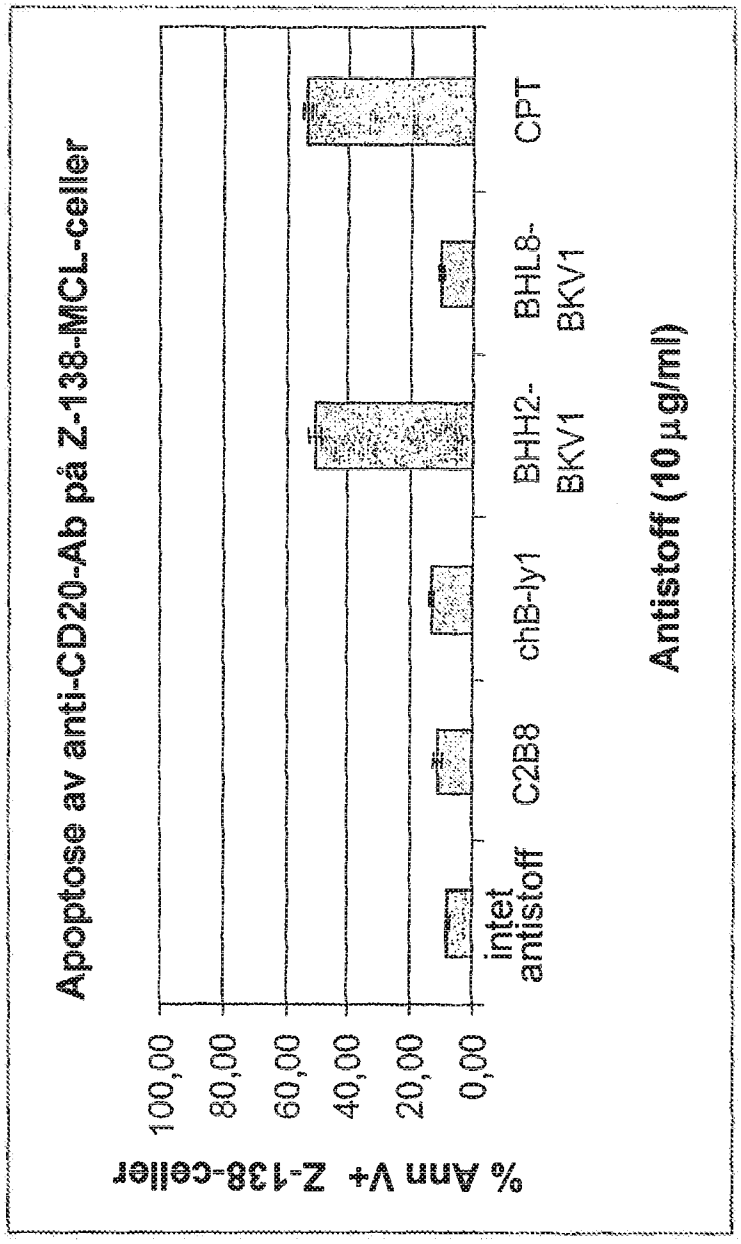

Apoptose av anti-CD20-Ab på Z-138-MCL-celler
% Ann V+ Z-138-celler
100,00
80,00
60,00
40,00
20,00
0,00
intet antistoff
C2B8
chB-ly1
BHH2-BKV1
BHL8-BKV1
CPT
Antistoff (10 µg/ml)

Fig. 15

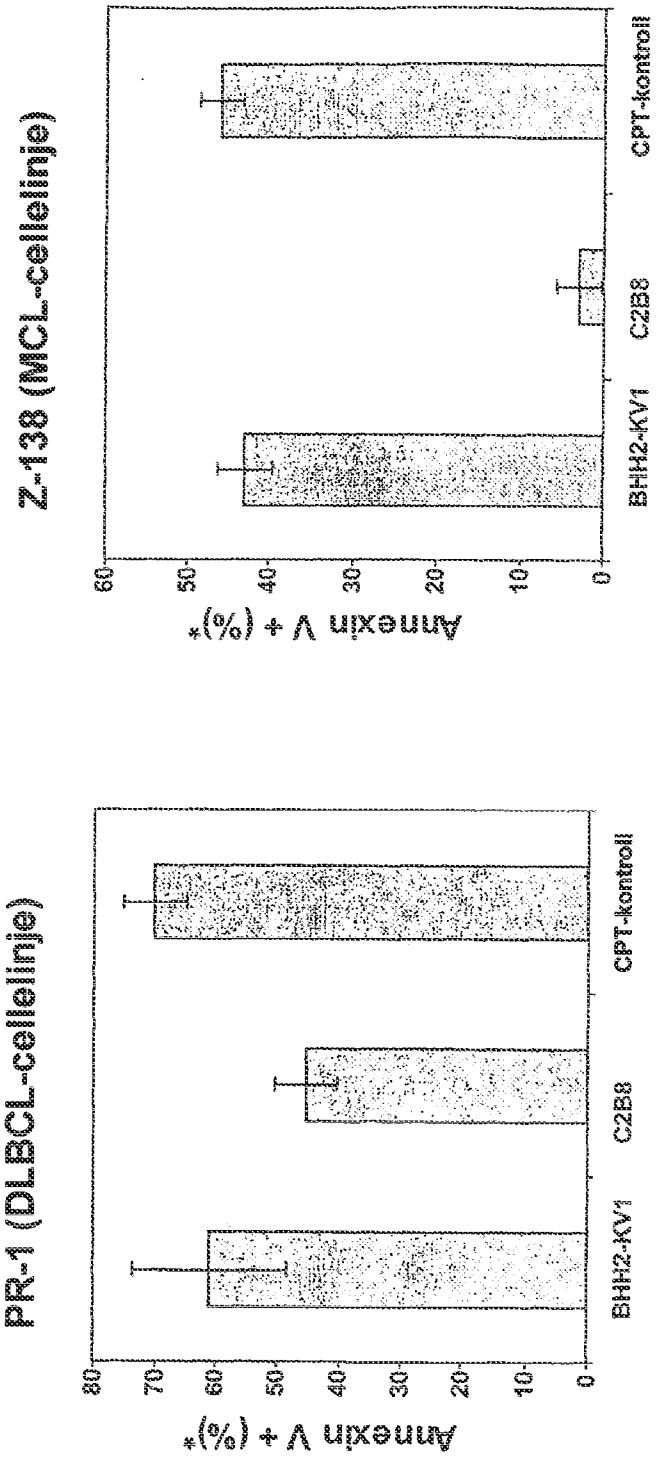

PR-1 (DLBCL-celleline)
Annexin V + (%)*
0
10
20
30
40
50
60
70
80
BHH2-KV1
C2B8
CPT-kontroll
Z-138 (MCL-celleline)
Annexin V + (%)*
0
10
20
30
40
50
60
BHH2-KV1
C2B8
CPT-kontroll

Fig. 16

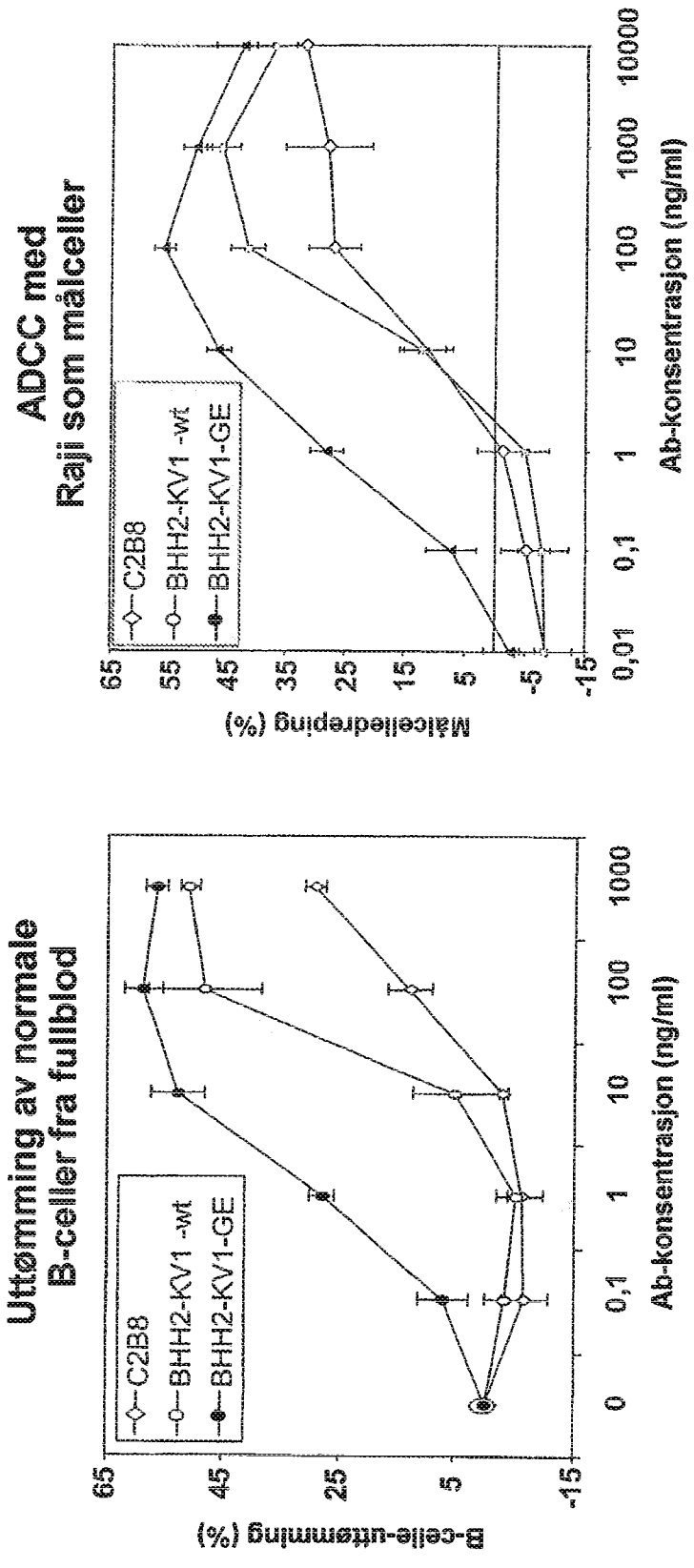
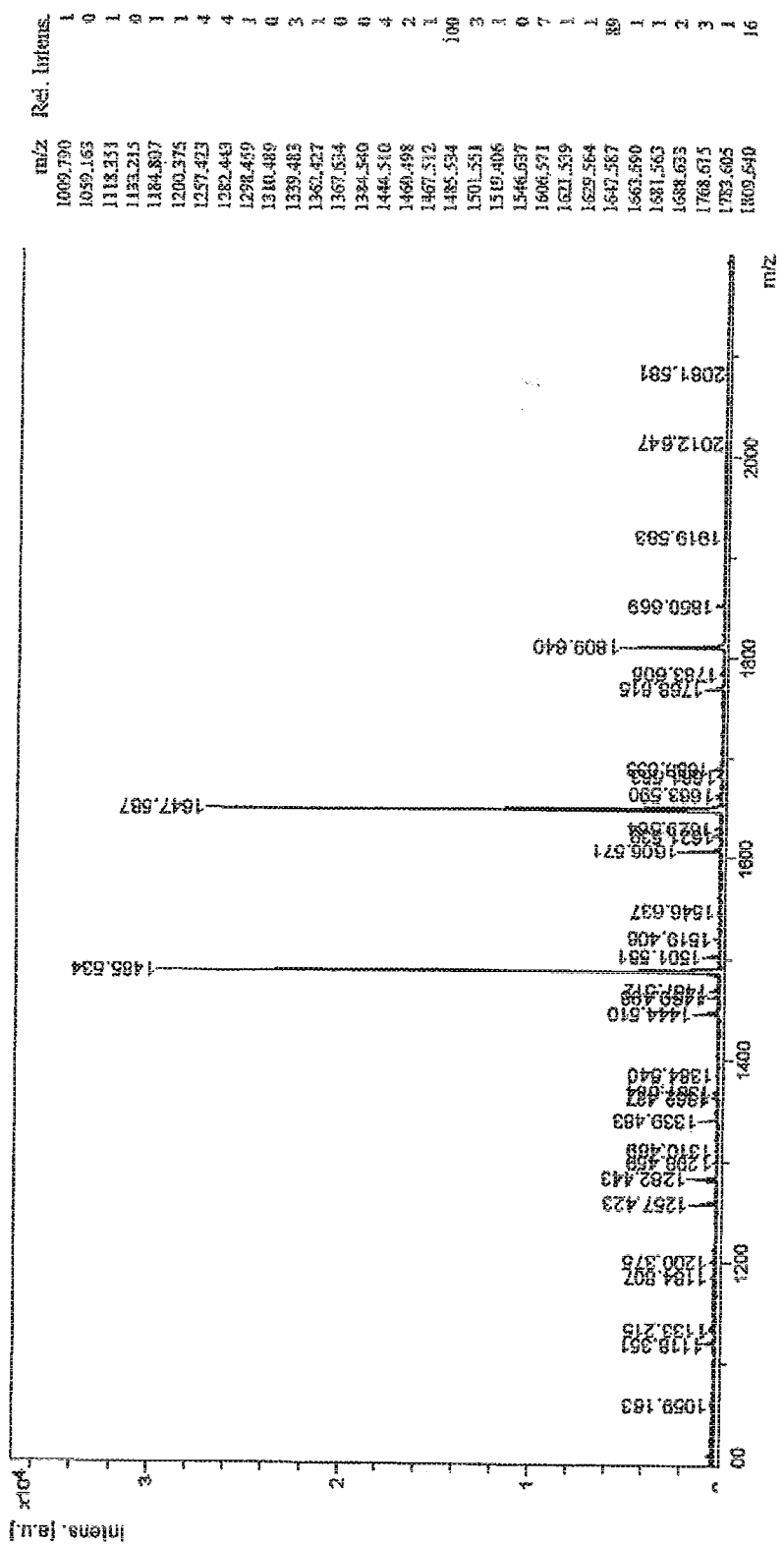

Uttømming av normale
B-celler fra fullblod
C2B8
BHH2-KV1 -wt
BHH2-KV1-GE
B-celle-uttømming (%)
65
45
25
5
-15
0
0,1
1
10
100
1000
Ab-konsentrasjon (ng/ml)
ADCC med
Raji som målceller
C2B8
BHH2-KV1 -wt
BHH2-KV1-GE
Målcelledrepning (%)
65
55
45
35
25
15
5
-5
-15
0,01
0,1
1
10
100
1000
10000
Ab-konsentrasjon (ng/ml)

Fig. 17



m/z	Rel. Intens.
1059.163	1
1118.351	0
1133.215	1
1184.807	0
1200.375	1
1257.423	1
1282.443	4
1298.459	4
1310.489	1
1339.483	0
1362.427	3
1367.634	1
1384.540	0
1444.510	8
1469.498	4
1467.512	2
1485.534	1
1501.551	100
1519.406	3
1546.637	1
1606.571	0
1621.539	7
1629.564	1
1647.587	1
1663.590	89
1681.563	1
1688.633	1
1768.675	2
1783.605	3
1809.640	1
	16

Fig. 18

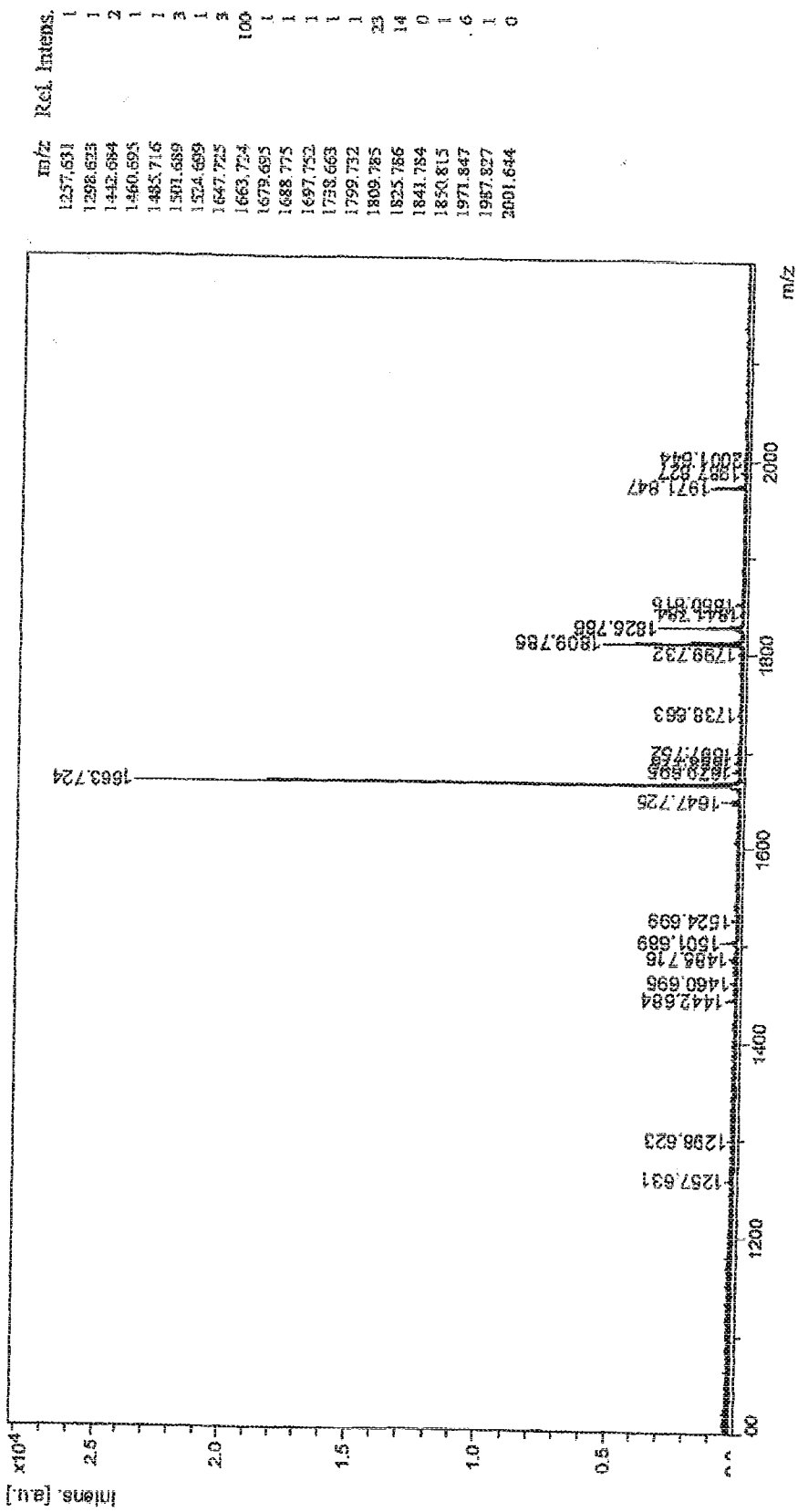

m/z Rel. Intens.
1257.631 1
1298.623 1
1442.684 2
1460.695 1
1485.716 1
1501.689 3
1524.699 1
1647.725 3
1663.724 100
1679.695 1
1688.775 1
1697.752 1
1738.663 1
1799.732 1
1809.785 23
1825.786 14
1841.784 0
1850.815 1
1971.847 6
1987.827 1
2001.644 0
Intens. [a.u.]
x10⁴
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1200
1400
1600
1800
2000
m/z
1257.631
1298.623
1442.684
1460.695
1485.716
1501.689
1524.699
1647.725
1663.724
1679.695
1688.775
1697.752
1738.663
1799.732
1809.785
1825.786
1841.784
1850.815
1971.847
2001.644

Fig. 19

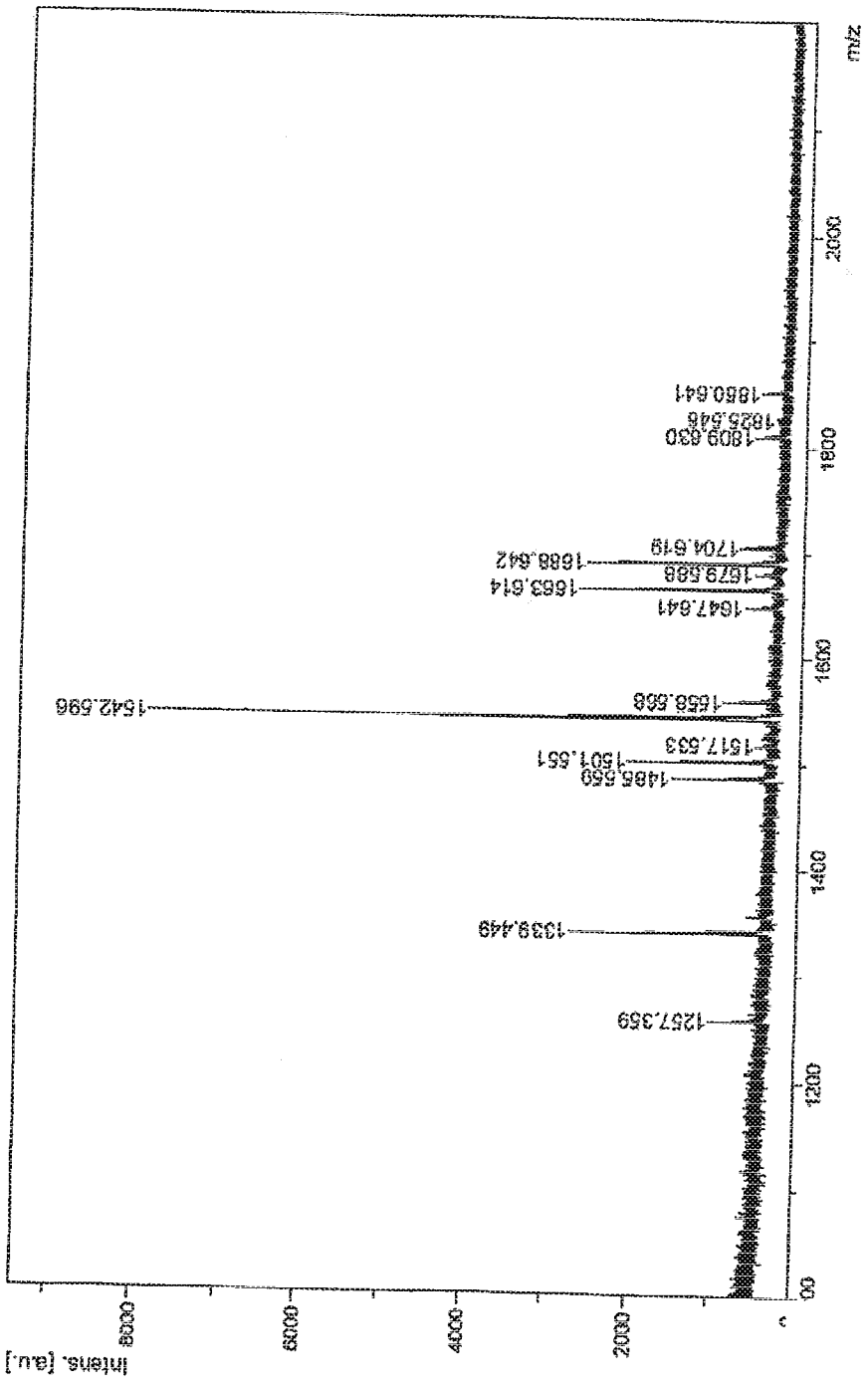

m/z
Rel. Intens.
1257.359 8
1339.449 31
1485.559 16
1501.551 23
1517.533 2
1542.596 100
1558.568 8
1647.641 5
1663.614 32
1679.588 4
1688.642 31
1704.619 6
1809.630 5
1825.546 1
1850.641 4
Intens. [a.u.]
8000
6000
4000
2000
0
400
1200
1400
1600
1800
2000
m/z
1257.359
1339.449
1485.559
1501.551
1517.533
1542.596
1556.568
1647.641
1663.614
1679.588
1688.642
1704.619
1809.630
1825.546
1850.641

Fig. 20

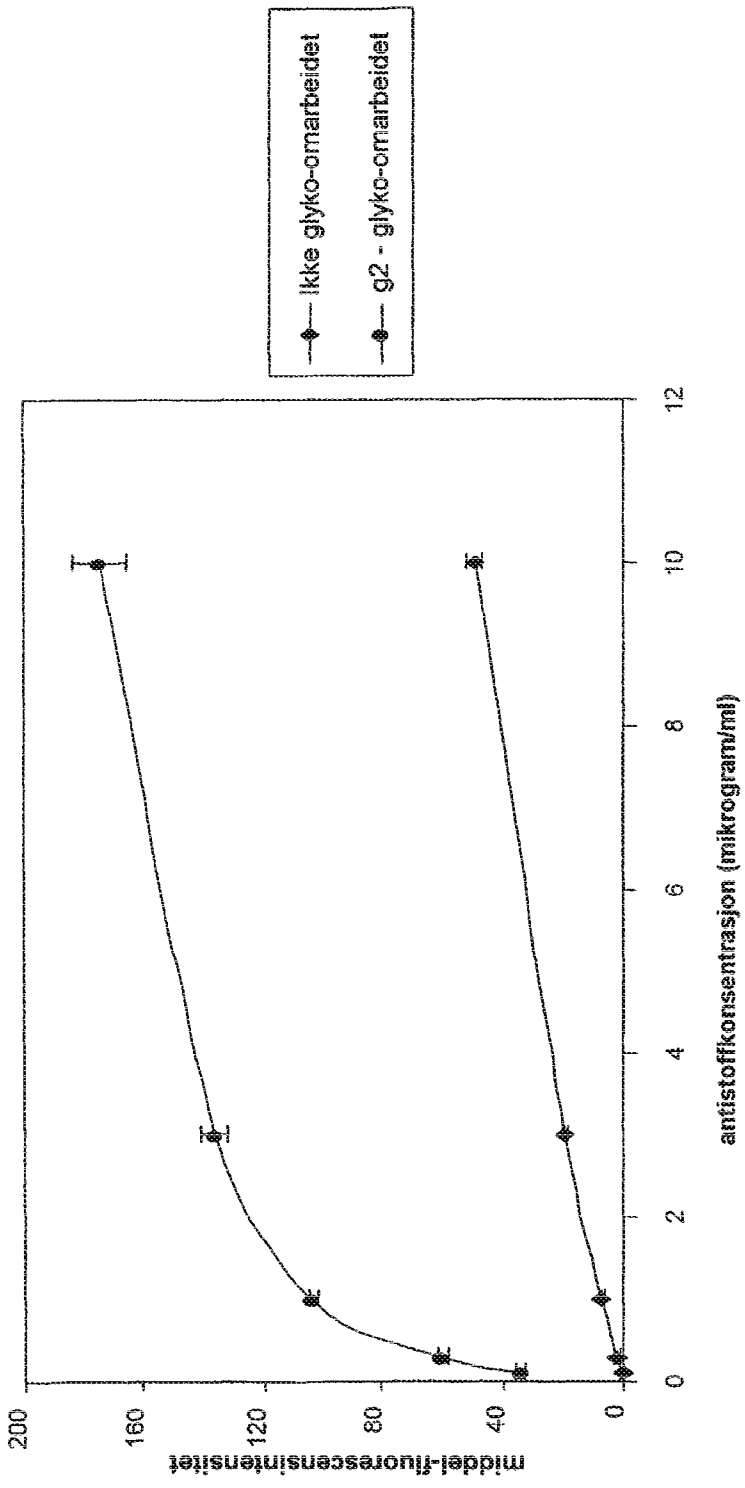
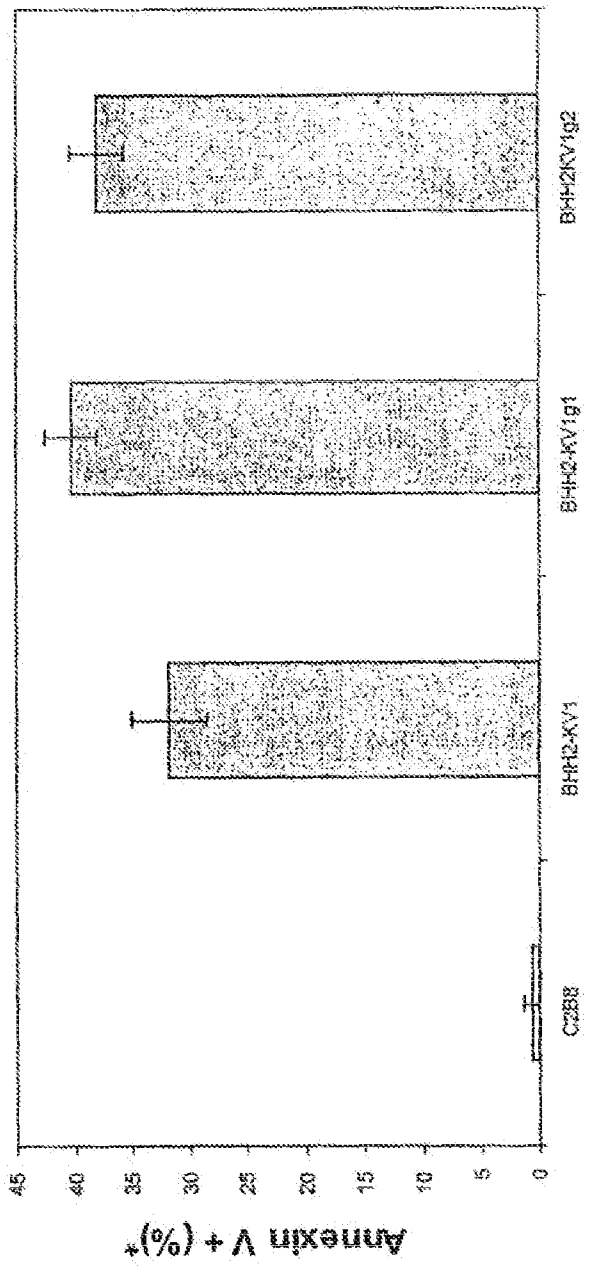

Ab-binding til FcgammaRIII på overflaten av CHO-CD16-celler
ikke glyko-omarbeidet
g2 - glyko-omarbeidet
middel-fluorescensintensitet
antistoffkonsentrasjon (mikrogram/ml)
0
40
80
120
160
200
0
2
4
6
8
10
12

Fig. 21


Apoptose ved anti-CD20-Ab
Z-138 mantelcellelymfom-cellelinje
Annexin V + (%)*
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
C2B8
BHH2-KV1
BHH2-KV1g1
BHH2KV1g2