(12) **PATENT**

(11) **344847** (13) **B1**

(19) NO

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 16/24 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

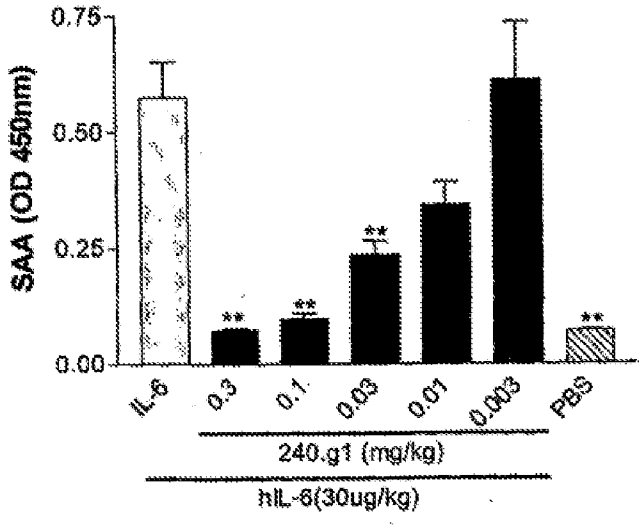
Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20083066	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2006.12.04 PCT/GB2006/004518
(22)	Inng.dag	2008.07.08	(85)	Videreføringsdag	2008.07.08
(24)	Løpedag	2006.12.04	(30)	Prioritet	2005.12.09, US, 60/748,926
(41)	Alm.tilgj	2008.09.08			
(45)	Meddelt	2020.05.25			

(73)	Innehaver	UCB Pharma SA, Allée de la Recherche 60, 1070 BRUSSEL, Belgia
(72)	Oppfinner	Richard Evan Gelinas, c/o UCB Celltech, 208 Bath Road, SL13WE SLOUGH, BERKSHIRE, Storbritannia Mitra Choudhury Singhal, c/o UCB Celltech, 208 Bath Road, SL13WE SLOUGH, BERKSHIRE, Storbritannia Yi Zhang, c/o UCB Celltech, 208 Bath Road, SL13WE SLOUGH, BERKSHIRE, Storbritannia Andrew George Popplewell, c/o UCB Celltech, 208 Bath Road, SL13WE SLOUGH, BERKSHIRE, Storbritannia Ralph Adams, c/o UCB Celltech, 208 Bath Road, SL13WE SLOUGH, BERKSHIRE, Storbritannia
(74)	Fullmektig	TANDBERG INNOVATION AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	**Antistoffmolekyler med spesifisitet for human-IL-6**
(56)	Anførte publikasjoner	WO 2004039826 A, US 5618700 A Matsuda T. ET AL. Establishment of an interleukin 6 (IL 6)/B cell stimulatory factor 2-dependent cell line and preparation of anti-IL 6 monoclonal antibodies. Eur J Immunol. 1988, vol. 18, side 951-956. EP 0983767 A1 DATABASE UnitProt [Online]13 August 1987 (1987.98.13. IL6 human. XP002421397 Database accession no. P05231 EP 1536012 A1 US 5856135 A Gejima R. ET AL. Human single-chain Fv (scFv) antibody specific to human IL-6 with the inhibitory activity on IL-6-signaling. Hum Antibodies. 2002, vol. 11, side 121-129.
(57)	Sammendrag	

Oppfinnelsen vedrører antistoffmolekyler med spesifisitet for antigene determinanter av IL-6, terapeutiske anvendelser av antistoffmolekylene og fremgangsmåter for å fremstille nevnte antistoffmolekyler.



Den foreliggende oppfinnelse vedrører antistoff-molekyler som har spesifisitet for antigene determinanter av IL-6. Den foreliggende oppfinnelsen vedrører også de terapeutiske anvendelser av antistoff-molekylene og fremgangsmåtene for å produsere antistoff-molekylene.

IL-6 er et pleiotropisk multifunksjonelt cytokin produsert av en rekke celletyper. Den ble opprinnelig identifisert som en B-celle-differensieringsfaktor (BSF-2) som induserte den endelige modningen av B-celler til antistoffproduserende celler (Hirano et al., 1986 Nature 324, 73-76). IL-6 er blitt vist å spille en sentral rolle i immunregulering, betennelse, hematopoiese og onkogenese. I immunsystemet induserer IL-6 B-celle-antistoffproduksjon som øker mengden av polyklonalt immunglobulin. Det induserer også interleukin-2 (IL-2)-reseptorekspresjon på T-celler (Nomo et al. 1987, Immunol. letters, 15, 3, 249-253) og fremmer IL-2-produksjon i aktiverte T-celler og induserer derved både veksten og differensieringen av cytotoksiske T-celler (Okada et al., 1988 J Immunol, 141, 5, 1543-1549) IL-6 er også kjent for å bestemme differensieringen av monocytter til makrofager (Chomarat P et al., 2000 Nature Immunol., 6, 510-514).

Funksjonen til IL-6 er ikke begrenset til immunresponsen, siden den virker ved hematopoiese, trombopoiese, osteoklastdannelse, stimulering av hepatisk akutt faserespons som resulterer i økningen av C-reaktivt protein (CRP) og serum-amyloid A (SAA)-protein. Den er kjent for å være en vekstfaktor for epidermale keratinocytter, renale mesangial-celler, myelom og plamacytom-celler (Grossman et al., 1989 Proc. Natl. Acad. Sci., 86, (16) 6367-6371, Horii et al., 1989, J Immunol, 143, 12, 3949-3955, Kawano et al., 1988, Nature 332, 6159, 83-85). IL-6 produseres av et bredt spekter av celletyper, inkludert monocytter/makrofager, fibroblaster, epidermale keratinocytter, vaskulære endotelceller, renale mesangial-celler, gliaceller, kondrocytter, T- og B-celler og noen tumorceller (Akira et al., 1990, FASEB J., 4, 11, 2860-2867). Unntatt tumorceller som konstitutivt produserer IL-6, uttrykker ikke normale celler IL-6, unntatt når de er passende stimulert.

IL-6 er et glykoprotein, et molekyl med 184 aminosyrer med en molekylvekt på 21 til 28 kD avhengig av posttranslasjonelle modifiseringer. Alternative spleisevarianter finnes i noen celletyper (Kishimoto et al., 1995, Blood, 86, 4, 1243-1254). IL-6-reseptor (IL-6R)-komplekset omfattes av to funksjonelt forskjellige membranproteiner, en 80 kD IL-6-spesifikk-bindende kjede (gp80) og en 130 kD signaloverførende kjede (gp130). Selv om IL-6 ikke kan binde gp130 direkte, kan den binde til IL-6R for å danne et ternært kompleks med høyaffinitet av IL-6/IL-6R/gp130. IL-6R binder IL-6 med lav affinitet, IL-6R har imidlertid ikke et intracellulært signaloverføringsdomene, og derfor leder denne ligeringen alene ikke til cellulær aktivering. På samme måte betyr ikke celleoverflate-ekspresjon av IL-6R at cellen er mottagelig for IL-6-stimulering. Proteolytisk spalting leder til frigjøringen av løselig IL-6R (sIL-6R, sgp80) som kan binde sirkulerende IL-6 og øke

halveringstiden til IL-6. For cellulær aktivering bindes IL-6R først til enten cellebundet IL-6R eller sIL-6R, det heterodimere IL-6/IL-6R-komplekset assosieres så med celleoverflate-glykoprotein gp130. Det resulterende treparts heterokomplekset binder et annet IL-6/IL-6R/gp130, og signaloverføring følger (Bravo og Heath 2000, EMBO J., 19, (11), 2399-2411, Boulanger et al., 2003, Science, 300, 5628, 2101-2104), dermed bidrar både cellebundet og løselig IL-6R til celleaktivering. IL-6-signalering gjennom cellebundet IL-6R har blitt kalt *cis*-signalering, mens cellulær aktivering via løselig IL-6R har blitt beskrevet som *trans*-signalering. Celler som uttrykker gp130, men ikke IL-6R, kan bli stimuleret av IL-6 gjennom sIL-6R.

Nøytraliserende, murine antistoffer mot humant IL-6 er kjent for å være i stand til å interferere med bindingen av humant IL-6 til IL-6R (sete 1) eller til gp130 (setene 2 og 3) (Kalai et al., 1997, Eur. J. Biochem. 249, 690-700, Brakenhoff et al., 1990, Journal of Immunology, 145, 561-568, Wending et al., 1993, Journal of Rheumatology, 29, 259-262).

US patent 5 856 135 beskriver omformede, humane antistoffer mot humant IL-6 som blokkerer IL-6-binding til IL-6R. Disse antistoffene ble avledet fra et muse monoklonalt antistoff SK2, hvor de komplementaritetsbestemmende regionene (CDR) fra den variable regionen av museantistoffet SK2 transplanteres inn i de variable regionene av et humant antistoff.

Nøytraliserende, humane auto-antistoffer mot IL-6 er også kjente (Hansen et al., Eur. J. Immunol, 1995, 25, 348-354).

Et sete I kimært, murint/humant anti-IL-6-antistoff ble beskrevet i WO 2004039826 for anvendelse i terapi.

Et humanisert anti-humant IL-6-reseptor-monoklonalt antistoff er i fase III av kliniske studier for behandlingen av reumatoid artritt (Kishimoto 2005, Annu Rev Immunol, 23:1-21). Det har også blitt rapportert at det samme antistoffet er effektivt i et fase II studie av Crohns sykdom. Virkeevnen har også blitt påvist med både anti-IL-6- og anti-IL-6R-antistoffer i lupus-lignende sykdom i NZB/W F_1-mus (Fink et al., 1994 J. Clin. Invest. 94, 585, Mihara et al., 1998, Clin. Exp. Immunol 112, 397). Et nøytraliserende antistoff mot den murine IL-6-reseptoren hemmet kolitt i en adoptiv overføringsmodell for sykdom (Yamamota et al., 2000 Journal of Immunology, 164, 4878, Atreya et al., 2000 Nature Med 6, 583). Den sistnevnte studien påviste også virkeevne med et anti-reseptor-antistoff i IL-10-Knock-out musemodellen for kolitt og i TNBS-modellen for tarmbetennelse.

Vi har nå identifisert et høy-affinitetsnøytraliserende anti-IL-6-antistoff som har spesiel virkeevne *in vivo*, for eksempel i *in vivo*-modellen beskrevet her, spesielt et nøytraliserende antistoff som har spesifisitet for humant IL-6, med en tung kjede som omfatter sekvensen gH13 gitt i SEKV. ID Nr:11 og en lett kjede som omfatter sekvensen gL10 gitt i SEKV. ID Nr:13.

Restene i antistoffets variable domener er konvensjonelt nummerert i henhold til et system utviklet av Kabat et al.. Dette systemet er angitt i Kabat et al., 1987, i Sequences of

Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (heretter "Kabat et al. (ovenfor)"). Dette nummereringssystemet anvendes i den foreliggende beskrivelsen, unntatt hvor annet indikeres.

Kabat-rest-betegnelsene korresponderer ikke alltid direkte med den lineære nummereringen av aminosyre-restene. Den virkelige lineære aminosyre-sekvensen kan inneholde færre eller flere aminosyrer enn i den strikte Kabat-nummereringen som korresponderer med en forkortelse av, eller insersjon i, en strukturell komponent, være seg rammeverk eller komplementaritets-bestemmende region (CDR) av den grunnleggende, variable domene-strukturen. Den korrekte Kabat-nummereringen av rester kan bestemmes for et gitt antistoff ved innretting av rester med homologi i sekvensen til et antistoff med en "standard" Kabat-nummerert sekvens.

CDR til den tunge kjedens variable domene er lokalisert ved restene 31-35 (CDR-H1), restene 50-65 (CDR-H2) og restene 95-102 (CDR-H3) ifølge Kabat-nummererings-systemet. Ifølge Chotia (Chotia, C. og Lesk, A.M.J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)) strekker imidlertid løkken som er ekvivalent med CDR-H1 seg fra rest 26 til rest 32. Dermed omfatter 'CDR-H1' som anvendt her, restene 26 til 35, som beskrevet ved en kombinasjon av Kabat-nummereringssystemet og Chotias topologiske løkke-definisjon.

CDR til den lette kjedens variable domene er lokalisert ved restene 24-34 (CDR-L1), restene 50-56 (CDR-L2) og restene 89-97 (CDR-L3) ifølge Kabat-nummereringssystemet.

Som anvendt her beskriver uttrykket 'nøytraliserende antistoff' et antistoff som er i stand til å nøytralisere den biologiske signalaktiviteten til IL-6, for eksempel ved å blokkere setet 3-bindingen av IL-6 til gp130-reseptoren.

Antistoffene for anvendelse i den foreliggende oppfinnelse kan tilveiebringes ved å anvende en hvilken som helst egnet fremgangsmåte som er kjent i faget. IL-6-polypeptidet eller cellene som uttrykker polypeptidet, kan anvendes for å produsere antistoffer som spesifikt gjenkjenner IL-6. IL-6-polypeptidet kan være det 'modne' polypeptidet eller et biologisk aktivt fragment eller derivater derav. Fortrinnsvis er IL-6-polypeptidet det modne polypeptidet. IL-6-polypeptider kan fremstilles ved fremgangsmåter som er velkjente i faget fra genetisk konstruerte vertceller som omfatter ekspresjonssystemer, eller de kan gjenvinnes fra naturlige, biologiske kilder. I den foreliggende søknaden inkluderer uttrykket "polypeptider" peptider, polypeptider og proteiner. Disse anvendes om hverandre, med mindre annet er spesifisert. IL-6-polypeptidet kan i noen tilfeller være del av et større protein, slik som et fusjonsprotein, for eksempel fusjonert til et affinitetsmerke. Antistoffer som er generert mot IL-6-polypeptidet kan tilveiebringes, hvor immunisering av et dyr er nødvendig, ved å administrere polypeptidene til et dyr, fortrinnsvis et ikke-humant dyr, ved anvendelse av velkjente og rutineprotokoller, se for eksempel Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (red.), bind 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986). Mange varmblodige dyr, slik som kaniner, mus, rotter, sauer, kyr eller griser kan immuniseres. Imidlertid er mus, kaniner, griser og rotter vanligvis foretrukket.

Antistoffer for anvendelse i den foretrukne oppfinnelsen inkluderer hele antistoffer og funksjonelt aktive fragmenter eller derivater derav og kan være monoklonale, humaniserte, fullstendig humane eller kimære antistoffer.

Monoklonale antistoffer kan fremstilles ved hvilken som helst fremgangsmåte som er kjent i faget, slik som hybridom-teknikken (Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), trioma-teknikken, den humane B-celle-hybridom-teknikken (Kozbor et al., 1983, Immunology Today, 4:72) og EBV-hybridom-teknikken (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, s. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).

Antistoffer for anvendelse i oppfinnelsen kan også genereres ved anvendelse av enkelt lymfocytt-antistoff-fremgangsmåter ved å klone og uttrykke immunglobulin-variabel-region-cDNA, som er generert fra enkelt lymfocytter som er valgt for produksjonen av spesifikke antistoffer ved for eksempel fremgangsmåtene som er beskrevet av Babcook, J. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15):7843-78481, WO 92/02551, WO 2004/051268 og internasjonal patentsøknad nr. WO 2004/106377.

Humaniserte antistoffer (som inkluderer CDR-podede antistoffer) er antistoff-molekyler fra ikke-humane arter som har én eller flere komplementaritetsbestemmende regioner (CDR) fra de ikke-humane artene og en rammeverkregion fra et humant immunglobulinmolekyl (se feks. US 5 585 089, WO 91/09967). Det vil li satt pris på at det bare kan være nødvendig å overføre de spesifisitetsbestemmende restene av CDR fremfor hele CDR (se for eksempel Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). Humaniserte antistoffer kan eventuelt ytterligere omfatte én eller flere rammeverkrester avledet fra de ikke-humane artene fra hvilke CDR var avledet.

Kimære antistoffer er de antistoffene som kodes for av immunglobulin-gener som har blitt genetisk konstruert slik at de lette og tunge kjedenes gener er satt sammen av immunglobulin-gen-segmenter som hører til forskjellige arter.

Antistoffene for anvendelse i den foreliggende oppfinnelse kan også genereres ved anvendelse av forskjellige fagvisningsfremgangsmåter som er kjent i faget og inkluderer de som er beskrevet av Brinkman et al. (i J. Immunol.. Methods, 1995, 182: 41-50), Ames et al. (J. Immunol. Methods, 1995 184:177-186), Kettleborough et al. (Eur. J. Immunol. 1994, 24-952-958), Persic et al. (Gene, 1997 187 9-18), Burton et al. (Advances in Immunology, 1994, 57:191-280) og WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401 og US 5 698 426, 5 223 409, 5 403 484, 5 580 717, 5 427 908, 5 750 753, 5 821 047, 5 571 698, 5 427 908, 5 516 637, 5 780 225, 5 658 727, 5 733 743 og 5 969 108.

Fullstendig humane antistoffer er de antistoffene hvor de variable regionene og de konstante regionene (der de er til stede) av både de tunge og de lette kjedene, alle er av human opprinnelse, eller er vesentlig identiske med sekvenser av human opprinnelse og ikke nødvendigvis fra det samme antistoffet. Eksempler på fullstendig humane antistoffer kan inkludere antistoffer som er produsert for eksempel ved fagvisningsfremgangsmåtene

beskrevet ovenfor og antistoffer som er produsert av mus, hvor genene fra variable og konstante deler av de murine immunglobulinene har blitt erstattet med deres humane motstykker, f.eks. som beskrevet i generelle termer i EP 0546073 B1, US 5 545 806, US 5 569 825, US 5 625 126, US 5 633 425, US 5 661 016, US 5 770 429, EP 0438474 B1 og EP 0463151 B1.

Et nøytraliserende antistoff som har spesifisitet for humant IL-6 kan omfatte en tung kjede, hvor det variable domenet av den tunge kjeden omfatter minst én av en CDR som har sekvensen som er gitt SEKV. ID. NR.: 5 for CDR-H1, en CDR som har sekvensen gitt i SEKV. ID. NR.: 6 for CDR-H2 og en CDR som har sekvensen gitt i SEKV. ID. NR.: 7 for CDR-H3.

Et nøytraliserende antistoff som har spesifisitet for humant IL-6 kan omfatte en tung kjede, hvor minst to av CDR-H1, CDR-H2 og CDR-H3 fra det variable domenet til den tunge kjeden, velges fra de følgende: Sekvensen gitt i SEKV. ID. NR.: 5 for CDR-H1, sekvensen gitt i SEKV. ID. NR.: 6 for CDR-H2 og sekvensen gitt i SEKV. ID. NR.: 7 for CDR-H3. For eksempel kan antistoffet omfatte en tung kjede, hvor CDR-H1 har sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 5 og CDR-H2 har sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 6. Alternativt kan antistoffet omfatte en tung kjede hvor CDR-H1 har sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 5, og CDR-H3 har sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 7, eller antistoffet kan omfatte en tung kjede hvor CDR-H2 har sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 6, og CDR-H3 har sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 7. For å unngå tvil, er det forstått at alle permutasjoner er inkludert.

Et nøytraliserende antistoff som har spesifisitet for humant IL-6 er tilveiebragt, som omfatter en tung kjede, hvor det variable domenet til den tunge kjeden omfatter sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 5 for CDR-H1, sekvensen gitt i SEKV. ID. NR.: 6 for CDR-H2 og sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 7 for CDR-H3.

Et nøytraliserende antistoff som har spesifisitet for humant IL-6 kan omfatte en lett kjede, hvor det variable domenet til den lette kjeden omfatter minst én av en CDR som har sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 8 for CDR-L1, en CDR som har sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 9 for CDR-L2, og en CDR som har sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 10 for CDR-L3.

Et nøytraliserende antistoff som har spesifisitet for humant IL-6, kan omfatte en lett kjede, hvor minst to av CDR-L1, CDR-L2 og CDR-L3 fra det variable domenet til den lette kjeden velges fra de følgende: sekvensen gitt i SEKV. ID. NR.: 8 for CDR-L1, sekvensen gitt i SEKV. ID. NR.: 9 for CDR-L2 og sekvensen gitt i SEKV. ID. NR.: 10 for CDR-L3. For eksempel kan antistoffet omfatte en lett kjede hvor CDR-L1 har sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 8 og CDR-L2 har sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 9. Alternativt kan antistoffet omfatte en lett kjede hvor CDR-L1 har sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 8, og CDR-L3 har sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 10, eller antistoffet kan omfatte en lett kjede hvor CDR-L2 har sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 9, og CDR-L3 har

sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 10. For å unngå tvil er det forstått at alle permutasjoner er inkludert.

Et nøytraliserende antistoff som har spesifisitet for humant IL-6 er tilveiebragt, som omfatter en lett kjede, hvor det variable domenet omfatter sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 8 for CDR-L1, sekvensen gitt i SEKV. ID. NR.: 9 for CDR-L2 og sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 10 for CDR-L3.

Det vil anerkjennes at én eller flere aminosyre-substitusjoner, addisjoner og/eller delesjoner kan lages for CDR som er tilveiebrakt ved foreliggende oppfinnelse uten signifikant å endre evnen til antistoffet til å binde til IL-6 og til å nøytralisere IL-6-aktivitet. Effekten av hvilke som helst aminosyre-substitusjon, addisjon og/eller delesjon kan enkelt testes av en fagmann på området, for eksempel ved å anvende fremgangsmåtene som er beskrevet i eksemplene for å bestemme IL-6-binding og nøytralisering. I et eksempel omfatter et antistoff som har spesifisitet for humant IL-6 én eller flere CDR valgt fra CDRH-1 (SEKV. ID. NR.: 5), CDRH-2 (SEKV. ID. NR.: 6), CDRH-3 (SEKV. ID. NR.: 7), CDRL-1 (SEKV. ID. NR.: 8), CDRL-2 (SEKV. ID. NR.: 9) og CDRL-3 (SEKV. ID. NR.: 10) hvor én eller flere aminosyrer i én eller flere CDR har blitt substituert med en annen aminosyre.

Antistoff-molekylene kan omfatte henholdsvis en komplementær lett kjede eller en komplementær tung kjede.

Et antistoff ifølge den foreliggende oppfinnelse omfatter en tung kjede, hvor det variable domenet til den tunge kjeden omfatter sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 5 for CDR-H1, sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 6 for CDR-H2 og sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 7 for CDR-H 3 og en lett kjede hvor det variable domenet til den lette kjeden omfatter sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 8 for CDR-L1, sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 9 for CDR-L2 og sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 10 for CDR-L3.

Antistoffet som har spesifisitet for humant IL-6 kan omfatte en tung kjede, hvor det variable domenet til den tunge kjeden omfatter sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 5 for CDR-H1, sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 6 for CDR-H2 og sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 7 for CDR-H3 og en lett kjede hvor det variable domenet til den lette kjeden omfatter sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 8 for CDR-L1, sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 9 for CDR-L2 og sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 10 for CDR-L3 hvor én eller flere aminosyrer i én eller flere av CDR er blitt substituert med en annen aminosyre. Antistoffet kan omfatte en tung kjede hvor det variable domenet til den tunge kjeden omfatter sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 2 eller en sekvens som har minst 70 %, 80 %, 90 %, 95 % eller 98 % identitet eller likhet med den.

"Identitet" som anvendt her, indikerer at ved hvilken som helst spesiell posisjon i de innrettede sekvensene, er aminosyre-resten identisk mellom sekvensene. "Likhet", som anvendt her, indikerer at ved hvilken som helst spesiell posisjon i de innrettede sekvensene, er aminosyre-resten av en lignende type mellom sekvensene. For eksempel kan leucin være

erstattet med isoleucin eller valin. Andre aminosyrer som ofte kan være erstattet med hverandre, inkluderer:

- fenylalanin, tyrosin og tryptofan (aminosyrer som har aromatiske sidekjeder),
- lysin, arginin og histidin (aminosyrer som har basiske sidekjeder),
- aspartat og glutamat (aminosyrer som har sure sidekjeder),
- asparagin og glutamin (aminosyrer som har amidsidekjeder), og
- cystein og metionin (aminosyrer som har svovelinneholdende sidekjeder).

Grader av identitet og likhet kan enkelt beregnes (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., red., Oxford University Press, New York 1988, Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., red., Academic Press, New York, 1993, Computer Analysis of sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., red., Humana Press, New Jersey, 1994, Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987 and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. og Devereux, J., red., M. Stockton Press, New York, 1991).

Antistoffet kan omfatte en lett kjede hvor det variable domenet fra den lette kjeden omfatter sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 4 eller en sekvens som har minst 70 %, 80 %, 90 %, 95 % eller 98 % identitet eller likhet med den.

Et antistoff kan omfatte en tung kjede, hvor det variable domenet til den tunge kjeden omfatter sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 2, og en lett kjede hvor det variable domenet til den lette kjeden omfatter sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 4.

Antistoffet kan omfatte en tung kjede og en lett kjede, hvor det variable domenet til den tunge kjeden omfatter en sekvens som har minst 60 % identitet eller likhet med sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 2, og det variable domenet til den lette kjeden omfatter en sekvens som har minst 60 % identitet eller liket med sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 4. Fortrinnsvis omfatter antistoffet en tung kjede, hvor det variable domenet til den lette kjeden omfatter en sekvens som har minst 70 %, 80 %, 90 %, 95 % eller 98 % identitet eller likhet med sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 2, og en lett kjede hvor det variable domenet til den lette kjeden omfatter en sekvens som har minst 70 %, 80 %, 90 %, 95 % eller 98 % identitet eller likhet med sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 4.

Et rotteantistoff er beskrevet hvor det variable domenet til den tunge kjeden omfatter sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 2, og det variable domenet til den lette kjeden omfatter sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 4. Dette rotteantistoffet er her referert til som "132E09" eller som "donor"-antistoffet. Den komplette nukleotid- og aminosyre-sekvensen til det variable domenet til den tunge kjeden av rotteantistoffet 132E09 er tilveiebrakt i henholdsvis SEKV. ID. NR.: 1 og 2. Den komplette nukleotid- og aminosyre-sekvensen til det variable domenet til den lette kjeden av rotteantistoffet 132E09 er tilveiebrakt i henholdsvis SEKV. ID. NR.: 3 og 4. CDR som er gitt i SEKV. ID. NR.: 5, 6, 7, 8, 9 og 10 er avledet fra rotteantistoffet 132E09.

Videre kan antistoffet være et CDR-podet antistoff. Som anvendt her, refererer uttrykket "CDR-podet antistoff" til et antistoff hvor den tunge og/eller lette kjeden inneholder én eller flere CDR (inkludert, om ønsket, én eller flere modifiserte CDR) fra et donor-antistoff (f.eks. et rotteantistoff) podet inn i en tung- og/eller lett kjedes variable rammeverksregion til et akseptorantistoff (f.eks. et humant antistoff). For en oversikt, se Vaughan et al., Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1988. Fortrinnsvis har én eller flere CDR blitt tilveiebrakt fra rotteantistoffet 132E09 (SEKV. ID. NR.: 5, 6, 7, 8, 9 og 10). I én utførelsesform, istedenfor at hele CDR blir overført, blir bare én eller flere av de spesifisitets-bestemmende restene fra hvilken som helst av de CDR som er beskrevet ovenfor, overført til det humane antistofframmeverket (se for eksempel Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). I én utførelsesform blir bare de spesifisitets-bestemmende restene fra én eller flere av de CDR som er beskrevet ovenfor, overført til det humane antistofframmeverket. I en annen utførelsesform blir bare de spesifisitetsbestemmende restene fra hvert av de CDR, som er beskrevet ovenfor, overført til det humane antistofframmeverket.

Når CDR eller spesifisitetsbestemmende rester blir podet, kan en hvilken som helst passende rammeverksekvens fra den variable akseptor-regionen anvendes under hensyntagen til klasse/type av donor-antistoffet fra hvilket CDR er avledet, inkludert rotte, mus, primat og humane rammeverkregioner. Et slikt CDR-podet antistoff har minst ett variabelt domene som omfatter humane akseptor-rammeverkregioner så vel som én eller flere CDR som er avledet fra donor-antistoffet som referert til ovenfor. Dermed er et nøytraliserende CDR-podet antistoff tilveiebrakt, hvor det variable domenet omfatter humane akseptor-rammeverkregioner og ikke-humane, fortrinnsvis rotte, donor-CDR.

Eksempler på humane rammeverk som kan anvendes i den foreliggende oppfinnelse er KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY og POM (Kabat et al., ovenfor). For eksempel kan KOL og NEWM anvendes for den tunge kjeden, REI kan anvendes for den lette kjeden og EU, LAY og POM kan anvendes for både den tunge kjeden og den lette kjeden. Alternativt kan humane kimlinje-sekvenser anvendes, sekvensene av disse er tilgjengelige på nettstedet: http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/ .

I et CDR-podet antistoff trenger nødvendigvis ikke de tunge og lette akseptor-kjedene å være avledet fra det samme antistoffet og kan, om ønskelig, omfatte blandingskjeder som har rammeverkregioner som er avledet fra forskjellige kjeder.

Den foretrukne rammeverkregionen for den tunge kjeden til det CDR-podede antistoffet er avledet fra den humane VH3-undergruppe-sekvensen 1-4 3-72 sammen med JH4 (vist i figur 2, SEKV. ID. NR.: 19 og 20). Dermed er et nøytraliserende CDR-podet antistoff tilveiebrakt som omfatter minst én ikke-human donor-CDR, hvor den tunge kjedens rammeverkregion er avledet fra den humane undergruppe-sekvensen 1-4 3-72 sammen med JH4. Sekvensen til humant JH4 er som følger (YFDY)WGQGTLVTVSS (SEKV. ID. NR.: 20). YFDY-motivet er en del av CDR-H3 og er ikke en del av rammeverk 4 (Ravetch, JV. et

al., 1981, Cell, 27, 583-591). Donor-VH-sekvensen er sekvensen 132E09 (SEKV. ID. NR.: 2) som er vist i figur 2 og CDR-donoren (SEKV. ID. NR.: 5, 6 og 7) er understreket.

Den foretrukne rammeverkregionen for den lette kjeden til det CDR-podede antistoffet er avledet fra den humane kimlinje-VK1-undergruppe-sekvensen 2-1-(1) O12 sammen med JK2 som er vist i figur 2 (SEKV. ID. NR.: 21 og 22). Dermed er et nøytraliserende CDR-podet antistoff tilveiebrakt som omfatter minst én ikke-human donor-CDR hvor den lette kjedens rammeverkregion er avledet fra den humane VK1-undergruppe-sekvensen 2-1-(1) O12 sammen med JK2. JK2-sekvensen er som følger: (YT)FGQGTKLEIKR (SEKV. ID. NR.: 22). YT-motivet er en del av CDR-L3 og er ikke en del av rammeverk 4 (Hieter, PA., et al., 1982, J. Biol. Chem., 257, 1516-1522). Donor-sekvensen er VL-sekvensen 132E09 (SEKV. ID. NR.: 4) som er vist i figur 2 og donor CDR (SEKV. ID. NR.: 8, 9 og 10), er understreket.

Også i et CDR-podet antistoff trenger rammeverkregionene ikke å ha nøyaktig den samme sekvensen som de til akseptor-antistoffet. For eksempel kan uvanlige rester forandres til oftere forekommende rester for den akseptorkjede klassen eller typen. Alternativt kan utvalgte rester i akseptor-rammeverkregionene forandres slik at de korresponderer med resten som finnes ved den samme posisjonen i donor-antistoffet (se Reichmann et al., 1998, Nature, 332, 323-324). Slike forandringer burde holdes på det minimum som er nødvendig for å gjenvinne affiniteten til donor-antistoffet. En protokoll for å velge rester i akseptor-rammeverkregionen som kan trenge å bli endret, er angitt i WO 91/09967.

I et CDR-podet antistoff-molekyl ifølge den foreliggende oppfinnelse, hvis den tunge akseptor-kjeden har den humane VH3-sekvensen 1-4 3-72 sammen med JH4 så omfatter akseptor-rammeverkregionene i den tunge kjeden, i tillegg til én eller flere donor-CDR, en donor-rest ved minst posisjon 49 (ifølge Kabat et al. (ovenfor)). Følgelig bilveiebringes et CDR-podet antistoff hvor i det minste resten ved posisjon 49 i det variable domenet til den tunge kjeden er et donor-rest.

I et CDR-podet antistoff-molekyl ifølge den foreliggende oppfinnelse, hvis den lette akseptor-kjeden har den humane undergruppe VK1-sekvensen 2-1-(1) O12 sammen med JK2, så blir ingen donor-rester anvendt i akseptor-rammeverkregionene til den lette kjeden og bare én eller flere donor-CDR overføres.

Donor-rester er rester fra donor-antistoffet, dvs. at antistoffet fra hvilket CDR opprinnelig ble avledet, som i tilfellet med den foreliggende oppfinnelse er rotteantistoffet 132E09.

Følgelig tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse et antistoff hvor den tunge kjedens variable regionen omfatter sekvensen ifølge gH13 (figur 2, SEKV. ID. NR.: 11).

I én utførelsesform ifølge den foreliggende oppfinnelse omfatter antistoffet en tung kjede hvor det variable domenet til den tunge kjeden omfatter en sekvens som har minst 60 % identitet eller likhet med sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 11. Fortrinnsvis omfatter

antistoffet en tung kjede, hvor det variable domenet til den tunge kjeden omfatter en sekvens som har minst 70 %, 80 %, 90 %, 95 % eller 98 % identitet eller likhet med sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 11.

I tillegg tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse et antistoff hvor den lette kjedens variable regionen omfatter sekvensen ifølge gL10 (figur 2, SEKV. ID. NR.: 13).

I én utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen omfatter antistoffet en lett kjede, hvor det variable domenet til den lette kjeden omfatter en sekvens som har minst 60 % identitet eller likhet med sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 13. Fortrinnsvis omfatter antistoffet en lett kjede, hvor det variable domenet til den lette kjeden omfatter en sekvens som har minst 70 %, 80 %, 90 %, 95 % eller 98 % identitet eller likhet med sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 13.

Fortrinnsvis omfatter et CDR-podet antistoff ifølge den foreliggende oppfinnelse en tung kjede som omfatter sekvensen ifølge gH13 (SEKV. ID. NR.: 11) og en lett kjede som omfatter sekvensen ifølge gL10 (SEKV. ID. NR.: 13).

I én utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse omfatter antistoffet en tung kjede og en lett kjede, hvor det variable domenet til den tunge kjeden omfatter en sekvens som har minst 60 % identitet eller likhet med sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 11 og det variable domenet til den lette kjeden som omfatter en sekvens som har minst 60 % identitet eller likhet med sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 13. Fortrinnsvis omfatter antistoffet den tunge kjeden, hvor det variable domenet til den lette kjeden omfatter en sekvens som har minst 70 %, 80 %, 90 %, 95 % eller 98 % identitet eller likhet med sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 11 og en lett kjede hvor det variable domenet til den lette kjeden omfatter en sekvens som har minst 70 %, 80 %, 90 %, 95 % eller 98 % identitet eller likhet med sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 13.

Antistoff-molekylene ifølge den foreliggende oppfinnelse kan omfatte et komplett antistoff-molekyl som har full lengde tunge og lette kjeder eller fragment derav og kan være Fab, modifiserte Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, enkelt domene-antistoffer, scFv-, bi-, tri- eller tetravalente antistoffer, Bis-scFv, diastoffer, triastoffer, tetrastoffer og epitop-bindende fragmenter av hvilke som helst av de ovenfor (se for eksempel Holliger og Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136, Adair og Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217). Fremgangsmåtene for å utforme og fremstille disse antistoff-fragmentene er velkjente i faget (se for eksempel Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Andre antistoff-fragmenter for anvendelse i den foreliggende oppfinnelse inkluderer Fab- og Fab'-fragmentene som er beskrevet i de internasjonale patentsøknadene WO2005/003169, WO2005/003170 og WO2005/003171. Multivalente antistoffer kan omfatte multiple spesifisiteter eller kan være monospesifikke (se for eksempel WO92/22853 og WO05/113605).

De konstante regiondomenene til antistoff-molekylet ifølge den foreliggende oppfinnelse, hvis til stede, kan bli valgt med hensyntagen til den foreslåtte funksjonen til

antistoff-molekylet og spesielt effektorfunksjonene som kan være nødvendige. For eksempel kan de konstante regiondomenene være humane IgA-, IgD-, IgE-, IgG- eller IgM-domener. Spesielt kan humane IgG-konstante regiondomener anvendes, spesielt av IgG1- og IgG3-isotypene når antistoff-molekylet er ment for terapeutiske anvendelser og antistoff-effektor-funksjoner er nødvendige. Alternativt kan IgG2- og IgG4-isotypene anvendes når antistoff-molekylet er ment for terapeutiske formål og antistoff-effektorfunksjonene ikke er nødvendige, f. eks. for bare å blokkere IL-6-aktivitet. Det vil settes pris på at sekvens-varianter av disse konstante regiondomene også kan anvendes. For eksempel kan IgG-molekyler, hvor serinet i posisjon 241 har blitt endret til prolin, som beskrevet i Angal et al, Molecular Immunology, 1993, 30 (1), 105-108, anvendes. Spesielt foretrukket er det konstante domenet til IgG4 som omfatter denne forandringen. Det vil også forstås av en fagmann på området at antistoffer kan undergå forskjellige posttranslasjonelle modifikasjoner. Typen og omfanget av disse modifikasjonene avhenger ofte av verts-cellelinjen som anvendes for å uttrykke antistoffet så vel som dyrkingsbetingelsene. Slike modifikasjoner kan inkludere variasjoner i glykosylering, metionin-oksidering, diketopiperizin-dannelse, aspartat-isomerisering og asparagin-deamidering. En hyppig modifisering er et tap av en karboksy-termimal, basisk rest (slik som lysin eller arginin) som følge av virkningen av karboksy-peptidaser (som beskrevet i Harris, RJ. Journal of Chromoatography 705:129-134, 1995). Følgelig kan den C-terminale lysin-resten til den tunge antistoff-kjeden ifølge SEKV. ID. NR.: 16 være fraværende.

I en foretrukket utførelsesform er antistoffet som er tilveiebrakt ved den foreliggende oppfinnelse et nøytraliserende antistoff som har spesifisitet for humant IL-6, hvor den tunge kjedens konstante region omfatter den humane, konstante regionen IgG4, hvor serin-resten i posisjon 241 er blitt substituert med prolin som beskrevet i Angal et al., ovenfor. Følgelig tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse et antistoff hvor den tunge kjeden omfatter eller består av sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 16. Fortrinnsvis er den lette kjedens konstante region cKappa.

I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse et antistoff hvor den tunge kjeden omfatter eller består av sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 16 og den lette kjeden omfatter eller består av sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 18.

I én utførelsesform av oppfinnelsen omfatter antistoffet en tung kjede, hvor den tunge kjeden omfatter en sekvens som har minst 60 % identitet eller likhet med sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 16. Fortrinnsvis omfatter antistoffet en tung kjede, hvor den tunge kjeden omfatter en sekvens som har minst 70 %, 80 %, 90 %, 95 % eller 98 % identitet eller likhet med sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 16.

I én utførelsesform av oppfinnelsen omfatter antistoffet en lett kjede, hvor den lette kjeden omfatter en sekvens som har minst 60 % identitet eller likhet med sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 18. Fortrinnsvis omfatter antistoffet en lett kjede, hvor den lette kjeden

omfatter en sekvens som har minst 70 %, 80 %, 90 %, 95 % eller 98 % identitet eller likhet med sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 18.

I én utførelsesform av oppfinnelsen omfatter antistoffet en tung kjede og en lett kjede, hvor den tunge kjeden omfatter en sekvens som har minst 60 % identitet eller likhet med sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 16, og den lette kjeden som omfatter en sekvens som har minst 60 % identitet eller likhet med sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 18. Fortrinnsvis omfatter antistoffet en tung kjede, hvor den tunge kjeden omfatter en sekvens som har minst 70 %, 80 %, 90 %, 95 % eller 98 % identitet eller likhet med sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 16 og en lett kjede, hvor den lette kjeden omfatter en sekvens som har minst 70 %, 80 %, 90 %, 95 % eller 98 % identitet eller likhet med sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 18.

Også tilveiebrakt er en spesifikk region eller epitop av humant IL-6 som er bundet av et antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse, spesielt et antistoff som omfatter en hvilken som helst av CDR-H1 (SEKV. ID. NR.: 5), CDR-H2 (SEKV. ID. NR.: 6), CDR-H3 (SEKV. ID. NR.: 7), CDR-L1 (SEKV. ID. NR.: 8), CDR-L2 (SEKV. ID. NR.: 9) eller CDR-L3 (SEKV. ID. NR.: 10), for eksempel antistoff 132E09 eller antistoffer som omfatter den tunge kjedens variable region-sekvensen gH13 (SEKV. ID. NR.: 11) og/eller den lette kjedens variable region-sekvensen gL10 (SEKV. ID. NR.: 13).

Denne spesifikke regionen eller epitopen av det humane IL-6-polypeptidet kan identifiseres ved en hvilken som helst passende epitop-kartleggingsmetode som er kjent i faget, i kombinasjon med et hvilket som helst av antistoffene som er tilveiebrakt ved den foreliggende oppfinnelse. Eksempler på slike fremgangsmåter inkluderer screening av peptider av varierende lengder som er avledet fra IL-6 for binding til antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelse, med de minste fragmentene som spesifikt kan binde til antistoffet som inneholder sekvensen til epitopen som gjenkjennes av antistoffet. IL-6-peptidene kan produseres syntetisk eller ved proteolytisk spalting av IL-6-polypeptidet. Peptider som binder antistoffet kan identifiseres ved, for eksempel, massespektrometrisk analyse. I et annet eksempel kan NMR-spektroskopi anvendes for å identifisere epitopen som er bundet av et antistoff ifølge den foreliggende oppfinnelse, som beskrevet i eksemplene her. Når det er identifisert, kan epitop-fragmentet som binder et antistoff ifølge den foreliggende oppfinnelse anvendes, om krevet, som et immunogen for å tilveiebringe ytterligere nøytraliserende antistoffer som binder den samme epitopen.

I ett eksempel omfatter epitopen til humant IL-6 som er bundet av et antistoff ifølge den foreliggende oppfinnelse, minst aminosyre-restene S47, C50, E93, R104, F105, E106, T149, K150, A153, Q156, Q159 og S169 fra humant IL-6 (nummerering av restene ifølge Boulanger et al., Science, 300, 2101-2104). I ett eksempel omfatter epitopen til humant IL-6 som er bundet av et antistoff ifølge den foreliggende oppfinnelse, aminosyre-restene S47, C50, E93, R104, F105, E106, T149, K150, A153, Q156, Q159 og S169 og én eller flere rester valgt fra C44, S53, A58, V96, Q152, Q154, N155, W157, T163, L165 og E172.

I et eksempel omfatter epitopen til humant IL-6 som er bundet av et antistoff ifølge den foreliggende oppfinnelse, aminosyre-restene C44, S47, C50, S53, A58, E93, V96, R104, F105, E106, T149, K150, A153, Q154, N155, Q156, W157, Q159, T163, L165, S169 og E172.

Et nøytraliserende antistoff som har spesifisitet for humant IL-6 kan binde til en epitop på modent humant IL-6, som omfatter aminosyre-restene S47, C50, E93, R104, F105, E106, T149, K150, A153, Q156, Q159 og S169.

Et nøytraliserende antistoff som har spesifisitet for humant IL-6 kan binde til en epitop på modent humant IL-6 som omfatter aminosyre-restene S47, C50, E93, R104, F105, E106, T149, K150, A153, Q156, Q159 og S169 og én eller flere rester valgt fra C44, S53, A58, V96, Q152, Q154, N155, W157, T163, L165 og E172.

Et nøytraliserende antistoff som har spesifisitet for humant IL-6 kan binde til en epitop på modent humant IL-6 som omfatter aminosyre-restene C44, S47, C50, S53, A58, E93, V96, R104, F105, E106, T149, K150, Q152, A153, Q154, N155, Q156, W157, Q159, T163, L165, S169 og E172.

Det vil være anerkjent at restene som er navngitt ovenfor også kan nummereres basert på aminosyre-nummereringen til den ikke-prosesserte forløperen til IL-6 (Swiss Prot aksesjonsnummer P05231). Ved anvendelse av denne nummereringen blir restene som er nummerert ovenfor ifølge Boulanger et al., ovenfor, som C44, S47, C50, S53, A58, E93, V96, R104, F105, E106, T149, K150, Q152, A153, Q154, N155, Q156, W157, Q159, T163, L165, S169 og E172 til henholdsvis C72, S75, C78, S81, A86, E121, V124, R132, F133, E134, T177, K178, Q180, A181, Q182, N183, Q184, W185, Q187, T191, L193, S197 og E200.

Fortrinnsvis blokkerer et antistoff ifølge den foreliggende oppfinnelse bindingen av gp130 reseptoren til setet 3 på humant IL-6.

Antistoffer som kryssblokkerer bindingen av antistoffene ifølge den foreliggende oppfinnelse til IL-6 kan være tilsvarende nyttige til å nøytralisere IL-6-aktivitet.

Antistoff-molekylene ifølge den foreliggende oppfinnelse har fortrinnsvis en høy bindingsaffinitet for humant IL-6, fortrinnsvis pikomolar. Affinitet kan måles ved anvendelse av en hvilken som helst hensiktsmessig fremgangsmåte som er kjent i faget, inkludert BIAcore som beskrevet i eksemplene her. Affinitet er fortrinnsvis målt ved anvendelse av rekombinant humant IL-6 som beskrevet i eksemplene her. Et antistoff-molekyl ifølge den foreliggende oppfinnelse har fortrinnsvis en bindingsaffinitet for humant IL-6 på mindre enn 500 pM. Et antistoff-molekyl ifølge den foreliggende oppfinnelse har fortrinnsvis en bindingsaffinitet for humant IL-6 på mindre enn 50 pM. I én utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse har et antistoff-molekyl dermed en bindingsaffinitet på mellom omtrent 1 og omtrent 500 pM. I én utførelsesform har antistoff-molekylet ifølge den foreliggende oppfinnelse en bindingsaffinitet på mellom omtrent 1 og omtrent 50 pM. Antistoff-molekylet ifølge foreliggende oppfinnelse har fortrinnsvis en bindingsaffinitet for

humant IL-6 på mellom omtrent 1 og omtrent 20 pM. I én utførelsesform har antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelse en bindingsaffinitet for humant IL-6 på mellom 8 og 12 pM. Det vil være anerkjent at affiniteten til antistoffene som er tilveiebrakt ved den foreliggende oppfinnelse kan endres ved anvendelse av en hvilken som helst hensiktsmessig fremgangsmåte som er kjent i faget. Den foreliggende oppfinnelse vedrører derfor også varianter av antistoff-molekylene ifølge den foreliggende oppfinnelse, som har en forbedret affinitet for humant IL-6. Slike varianter kan tilveiebringes ved flere affinitetsmodnings-protokoller, inkludert mutering av CDR (Yang et al. J. Mol. Biol. 254, 392-403, 1955), kjedeomstokking (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), anvendelse av muterende stammer av *E. coli* (Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), DNA-omstokking (Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol. 8, 724-733, 1997) fagfremvisning (Thompson et al. J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) og seksuell PCR (Craneri et al., Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan et al. (ovenfor) diskuterer disse fremgangsmåtene for affinitetsmodning.

Antistoff-molekylene ifølge den foreliggende oppfinnelse nøytraliserer fortrinnsvis IL-6-aktivitet, for eksempel i *in vitro*- og *in vivo*-analysene som er beskrevet i eksemplene. I én utførelsesform binder disse antistoffene til sete 3 på humant IL-6.

I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse et nøytraliserende antistoff som har spesifisitet for humant IL-6 som er i stand til å inhibere aktiviteten til 0,0380 nM humant IL-6 med 50 % ved en konsentrasjon på mindre enn 100 pM hvor den inhibitoriske aktiviteten blir målt av det IL-6 som induserte proliferering av T1165-celler. I én utførelsesform er konsentrasjonen av antistoff som inhiberer IL-6 med 50 % mindre enn 50 pM, mer foretrukket mindre enn 20 pM. Det humane IL-6 som anvendes i analysen, er fortrinnsvis humant, rekombinant IL-6. I én utførelsesform er det nøytraliserende antistoffet et humanisert eller fullstendig humant antistoff.

I en annen utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse et nøytraliserende antistoff som har spesifisitet for humant IL-6 som er i stand til å inhibere aktiviteten til 3,84 nM humant IL-6 med 50 % ved en konsentrasjon på mindre 1 nM, hvor nevnte inhibitoriske aktivitet måles på produksjonen av MCP-1 med HUVEC i respons til humant IL-6 og sIL-6R. Fortrinnsvis er det humane IL-6 som anvendes i analysen humant, rekombinant IL-6. I én utførelsesform er det nøytraliserende antistoffet et humanisert eller fullstendig humant antistoff.

Om ønskelig kan et antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse konjugeres til ett eller flere effektor-molekyler. Det vil være anerkjent at i én utførelsesform kan effektor-molekylet omfatte et enkelt effektor-molekyl eller to eller flere slike molekyler, slik koblet at det dannes en enkelt gruppe som kan kobles til antistoffene ifølge den foreliggende oppfinnelse. Der det er ønskelig å tilveiebringe et antistoff-fragment som er koblet til et effektor-molekyl, kan dette fremstilles ved standard kjemiske eller rekombinante DNA-prosedyrer, hvor antistoff-fragmentet er koblet enten direkte eller via et koblings-middel til effektor-

molekylet. Teknikker for å konjugere slike effektor-molekyler til antistoffer er velkjent i faget (se Hellstrøm et al., Controlled Drug Delivery, 2. utg., Robinson et al., red., 1987, s. 623-53, Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev., 62:119-58 og Dubowchik et al., 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123). Spesielle kjemiske prosedyrer inkluderer for eksempel de som er beskrevet i WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 og WO 03031581. Der effektor-molekylet er et protein eller polypeptid kan koblingen alternativt oppnås ved anvendelse av rekombinante DNA-prosedyrer, for eksempel som beskrevet i WO 86/01533 og EP 0392745.

Uttrykket "effektor-molekyl" som anvendt her, inkluderer for eksempel antineoplastiske midler, medikamenter, toksiner, biologisk aktive proteiner, for eksempel enzymer, andre antistoffer eller antistoff-fragmenter, syntetisk eller naturlig forekommende polymerer, nukleinsyrer og fragmenter derav, for eksempel DNA, RNA og fragmenter derav, radionuklider, spesielt radiojod, radioisotoper, chelaterte metaller, nanopartikler og reportergrupper, slik som fluorescerende forbindelser eller forbindelser som kan detekteres ved NMR- eller ESR-spektroskopi.

Eksempler på effektor-molekyler kan inkludere cytotoksiner eller cytotoksiske midler, inkludert et hvilket som helst middel som er skadelig for (f.eks. dreper) celler. Eksempler inkluderer kombrestatiner, dolastatiner, epotiloner, staurosporiner, maytansinoider, spongistatiner, rizoksin, halikondriner, roridiner, hemiasterliner, taksol, cytochalasin B, gramisidin D, etidiumbromid, emetin, mitomycin, etoposid, tenoposid, vinkristin, vinblastin, kolchisin, doksorubisin, daunorubisin, dihydroksyantrasindion, mitoksantron, mitramysin, aktinmysin D, 1-dehydrotestosteron, glukokortikoider, prokain, tetrakain, lidokain, propranolol og puromysin og analoger eller homologer derav.

Effektor-molekyler inkluderer også antimetabolitter (f.eks. metotreksat, 6-merkapto-purin, 6-tioguanin, cytarabin, 5-fluorurasildekarbazin), alkylerende midler (f.eks. meklor-etamin, tioepaklorambusil, melfalan, karmustin, (BSNU) og lomustin (CCNU), syklotosfamid, busulfan, dibrommannitol, streptozotisin, mitomysin C og sis-diklordiaminplatinum (II) (DDP) sisplatin), antrasykliner (f.eks. daunorubisin (tidligere daunomysin) og doksorubisin), antibiotika (f.eks. daktinomysin (tidligere aktinomysin), bleomysin), mitramysin, antramysin (AMC), kalicheamisiner eller duokarmysiner) og anti-mitotiske midler (f.eks. vinkristin og vinblastin).

Andre effektor-molekyler kan inkludere chelaterte radionuklider, slik som ^{111}In og ^{90}Y, Lu^{177}, Bismuth^{213}, Californium^{252}, Iridium^{192} og Tungsten^{188}/Rhenium^{188} eller medikamenter slik som alkylfosfocholiner, topoisomerase-I-inhibitorer, taksoider og suramin.

Andre effektor-molekyler inkluderer proteiner, peptider og enzymer. Enzymer av interesse inkluderer proteolytiske enzymer, hydrolaser, lyaser, isomeraser, transferaser. Proteiner, polypeptider og peptider av interesse inkluderer immunglobuliner, toksiner, slik som abrin, risin A, pseudomonas eksotoksin, eller difteritoksin, et protein, slik som insulin, tumornekrosefaktor, α-interferon, β-interferon, nervevekstfaktor, plateavlede vekstfaktor

eller vevsplasminogenaktivator, et trombotisk middel eller et anti-angiogent middel, f.eks. angiostatin eller endostatin eller en biologisk responsmodifikator, slik som et lymfokin, interleukin-1, (IL-1), intelukin-2 (IL-2), interleukin-6 (IL-6) , granulosyttmakrofag-kolonistimulerende faktor (GM-CSF), granulosytt-kolonistimulerende faktor (G-Csf), nervevekstfaktor (NGF) eller annen vekstfaktor og immunglobuliner.

Andre effektor-molekyler kan inkludere detekterbare substanser som er nyttige, for eksempel i diagnose. Eksempler på detekterbare substanser inkluderer forskjellige enzymer, prostetiske grupper, fluorescerende materialer, luminescerende materialer, bioluminescerende materialer, radioaktive nuklider, positronutsendende metaller (for anvendelse i positronemisjonstomografi) og ikke-radioaktive paramagnetiske metallioner. Se generelt U.S. patent nr. 4 741 900 for metallioner som kan konjugeres til antistoffer for anvendelse som diagnostika. Passende enzymer inkluderer pepperrotperoksidase, alkalisk fosfatase, beta-galaktosidase eller acetylcholinesterase, hensikstmessige prostetiske grupper inkluderer streptavidin, avidin og biotin, hensiktsmessige fluorescerende materialer inkluderer umbelliferon, fluorescein, fluoresceinisotiocyanat, rodamin, diklortrazinylamin-fluorescein, dansylklorid og fykoerytrin, hensiktsmessige luminescerende materialer inkluderer luminol, hensiktsmessige bioluminescerende materialer inkluderer lusiferase, lusiferin og aequorin og hensiktsmessige radioaktive nuklider inkluderer ^{125}I, ^{131}I, ^{111}In og ^{99}Tc.

I et annet eksempel kan effektor-molekylet(ene) øke halveringstiden til antistoffet *in vivo* og/eller redusere immunogenisiteten til antistoffet og/eller forsterke leveringen av et antistoff over en epitelbarriere til immunsystemet. Eksempler på hensiktsmessige effektor-molekyler av denne typen inkluderer polymerer, albumin, albuminbindende proteiner eller albuminbindende forbindelser, slik som de som er beskrevet i WO 05/117984 (publisert 15.12.05).

Der effektor-molekylet er en polymer, kan det generelt sett være en syntetisk eller en naturlig forekommende polymer, for eksempel en eventuelt substituert rett eller forgrenet kjede av polyalkylen, polyalkenylen eller polyoksyalkylenpolymer eller et forgrenet eller ikke-forgrenet polysakkarid, f.eks. et homo- eller hetero-polysakkarid.

Spesielle eventuelle substituenter som kan være til stede på de ovenfor nevnte, syntetiske polymerene, inkluderer én eller flere hydroksy-, metyl- eller metoksygrupper.

Spesielle eksempler på syntetiske polymerer inkluderer eventuelt substituerte, rette eller forgrenede kjeder av poly(etylenglykol, poly(propylenglykol), poly(vinylalkohol) eller derivater derav, spesielt eventuelt substituert poly(etylenglykol), slik som metoksypoly-(etylenglykol) eller derivater derav.

Spesielle naturlige forekommende polymerer inkluderer laktose, amylose, dekstran, glykogen eller derivater derav.

"Derivater" som anvendt her, er ment å inkludere reaktive derivater, for eksempel tiol-selektive, reaktive grupper, slik som maleimider og lignende. Den reaktive gruppen kan

være koblet direkte gjennom et linker-segment til polymeren. Det vil være anerkjent at resten i en slik gruppe i noen tilfeller vil danne del av produktet som den lenkende gruppen mellom antistoff-fragmentet og polymeren.

Størrelsen på polymeren kan varieres som ønsket, men vil vanligvis være på en gjennomsnittlig molekylvekt i området fra 500 Da til 50 000 Da, fortrinnsvis fra 5 000 til 40 000 Da og mer foretrukket, fra 20 000 til 40 000 Da. Polymerstørrelsen kan spesielt velges på basis av den tilsiktede anvendelse av produktet, for eksempel evnen til å bli lokalisert til visse vev, slik som tumorer eller forlenge sirkulerende halveringstid (for oversikt se Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 54, 531-545). Følgelig når produktet for eksempel er ment å forlate sirkulasjonen og penetrere vev, for eksempel for anvendelse i behandlingen av en tumor, kan det være fordelaktig å anvende en polymer med lav molekylvekt, for eksempel med en molekylvekt på omtrent 5 000 Da. For applikasjoner der produktet forblir i sirkulasjonen, kan det være fordelaktig å anvende en polymer med høyere molekylvekt, for eksempel en med molekylvekt i området fra 20 000 Da til 40 000 Da.

Spesielt foretrukne polymerer inkluderer en polyalkylen-polymer, slik som en poly(etylenglykol) eller spesielt en metoksypoly(etylenglykol) eller et derivat derav, og spesielt med en molekylvekt i området fra omtrent 15 000 Da til omtrent 40 000 Da.

I et eksempel er antistoffer for anvendelse i den foreliggende oppfinnelse koblet til poly(etylenglykol) (PEG) funksjonelle grupper. I et spesielt eksempel er antistoffet et antistoff-fragment, og PEG-molekylene kan være koblet gjennom en hvilken som helst tilgjengelig, funksjonell gruppe fra aminosyre-sidekjede eller terminal aminosyre som er lokalisert i antistoff-fragmentet, for eksempel en hvilken som helst fri amino-, imino-, tiol-, hydroksyl- eller karboksylgruppe. Slike aminosyrer kan forekomme naturlig i antistoff-fragmentet eller kan konstrueres i fragmentet ved anvendelse av rekombinante DNA-metoder (se for eksempel US 5 219 996, US 5 667 425, WO 98/25971). I et eksempel er antistoff-molekylet ifølge den foreliggende oppfinnelse et modifisert Fab-fragment, hvor modifikasjonen er tilføringen av én eller flere aminosyrer til den C-terminale enden av dets tung kjede for å tillate tilkoblingen av et effektor-molekyl. De tilføyde aminosyrene danner fortrinnsvis en modifisert hengselregion som inneholder én eller flere cysteinrester til hvilke effektor-molekylet kan kobles. Multiple seter kan anvendes for å koble to eller flere PEG-molekyler.

PEG-molekyler er fortrinnsvis kovalent koblet gjennom en tiol-gruppe fra minst én cysteinrest som er lokalisert i antistoff-fragmentet. Hvert polymer-molekyl som er koblet til det modifiserte antistoff-fragmentet, kan være kovalent koblet til svovelatomet på en cysteinrest, som er lokalisert i fragmentet. Den kovalente koblingen vil vanligvis være en disulfid-binding eller spesielt, en svovel-karbonbinding. Der en tiol-gruppe anvendes som koblingspunkt, kan passende aktiverte effektor-molekyler, for eksempel tiol-selektive derivater, slik som maleimider og cysteinderivater, anvendes. En aktivert polymer kan anvendes som utgangsmaterialet i fremstillingen av polymer-modifiserte antistoff-

fragmenter som beskrevet ovenfor. Den aktiverte polymeren kan være hvilken som helst polymer som inneholder en tiol-reaktiv gruppe, slik som en α-halokarboksylsyre eller ester, for eksempel jodacetamid, et imid, for eksempel maleimid, en vinylsulfon eller en disulfid. Slike utgangsmaterialer kan tilveiebringes kommersielt (for eksempel fra Nektar, tidligere Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA) eller kan fremstilles fra kommersielt tilgjengelige utgangsmaterialer ved anvendelse av konvensjonelle, kjemiske prosedyrer. Spesielle PEG-molekyler, inkludert 20K metoksy-PEG-amin (kan tilveiebringes fra Nektar, tidligere Shearwater, Rapp Polymere og SunBio) og M-PEG-SPA (kan tilveiebringes fra Nektar, tidligere Shearwater).

I én utførelsesform er antistoffet et modifisert Fab-fragment eller diFab som er PEGylert, dvs. har PEG (poly(etylenglykol)) kovalent koblet dertil, f. eks. ifølge fremgangsmåtene som er beskrevet i EP 0948544 eller EP 1090037 (se også "Poly(ethylenglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (red.), Plenum Press, New York, "Poly(ethylenglycol) Chemistry and Biological Applications", 1977, J. Milton Harris og S. Zalipsky (red.), American Chemical Society, Washington DC og "Bioconjugation Protein Coupling Techiques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam og A. Dent, Grove Publishers, New York, Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545). I ett eksempel er PEG koblet til et cystein i hengselregionen. I ett eksempel har ett PEG-modifisert Fab-fragment en maleimid-gruppe kovalent koblet til enkel tiolgruppe i en modifisert hengselregion. En lysinrest kan være kovalent koblet til maleimid-gruppen, og til hver av amingruppene på lysinresten kan det være koblet en metoksypoly(etylenglykol)-polymer som har en molekylvekt på omtrent 20 000 Da. Den totale molekylvekten til PEG som er koblet til Fab-fragmentet, kan derfor være omtrent 40 000 Da.

I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse et nøytraliserende antistoff-molekyl som har spesifisitet for humant IL-6, som er et modifisert Fab-fragment som har en tung kjede som omfatter sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 11 og en lett kjede som omfatter sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 13 og har en modifisert hengselregion som inneholder minst én cysteinrest til hvilket et effektor-molekyl er koblet ved den C-terminale enden av dets tung kjede. Effektor-molekylet er fortrinnsvis PEG og er koblet ved anvendelse av fremgangsmåtene som er beskrevet i (WO 98/25971 og WO 2004072116) hvorved en lysyl-maleimid-gruppe er koblet til cysteinresten ved den C-terminale enden til den tunge kjeden, og hver aminogruppe til lysyl-resten har kovalent koblet til dem en metoksypoly(etylenglykol)-rest som har en molekylvekt på omtrent 20 000 Da. Den totale molekylvekten til PEG som er koblet til antistoffet, er derfor omtrent 40 000 Da.

I et annet eksempel kan effektor-molekyler kobles til antistoff-fragmenter ved anvendelse av fremgangsmåtene som er beskrevet i de internasjonale patentsøknadene WO 2005/003169, WO 2005/003170 og WO 2005/003171.

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også en isolert DNA-sekvens som koder for de(n) tunge og/eller lette kjeden(e) til et antistoff-molekyl ifølge foreliggende oppfinnelse. Fortrinnsvis koder DNA-sekvensen for den tunge eller den lette kjeden av et antistoff-molekyl ifølge den foreliggende oppfinnelse. DNA-sekvensen ifølge den foreliggende oppfinnelse kan omfatte syntetisk DNA, for eksempel produsert ved kjemisk prosessering, cDNA, genomisk DNA eller en hvilken som helst kombinasjon derav.

DNA-sekvenser som koder for et antistoff-molekyl ifølge den foreliggende oppfinnelse, kan tilveiebringes ved fremgangsmåter som er velkjente for fagfolk på området. For eksempel kan DNA-sekvenser som koder for en del av eller hele antistoffets tunge og lette kjeder, syntetiseres som ønsket fra de bestemte DNA-sekvensene eller på basis av de korresponderende aminosyre-sekvensene.

DNA som koder for akseptor-rammeverk-sekvenser er vidt tilgjengelige for fagfolk på området og kan lett syntetiseres på basis av deres kjente aminosyre-sekvenser.

Standard teknikker for molekylærbiologi kan anvendes for å fremstille DNA-sekvenser som koder for antistoff-molekylet ifølge den foreliggende oppfinnelse. Ønskede DNA-sekvenser kan syntetiseres fullstendig eller delvis ved anvendelse av oligonukleotid-synteseteknikker. Sete-spesifikk mutagenese og polymerasekjedereaksjon (PCR)-teknikker kan anvendes etter behov.

Eksempler på egnede DNA-sekvenser er tilveiebrakt i SEKV. ID. NR.: 1, SEKV. ID. NR.: 3, SEKV. ID. NR.: 12, SEKV. ID. NR.: 14, SEKV. ID. NR.: 15 og SEKV. ID. NR.: 17. Nukleotidene 1-57 i SEKV. ID. NR.: 15 og 1-60 i SEKV. ID. NR.: 17 koder for signal-peptidsekvensen fra museantistoff B72,3 (Whittle et al., 1987, Protein Eng. 1(6) 499-505.) som er spaltet for å gi et nøytraliserende antistoff-molekyl ifølge den foreliggende oppfinnelse. Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer dermed også en isolert DNA-sekvens som koder for den tunge kjeden til et antistoff ifølge den foreliggende oppfinnelse, som omfatter nukleotidene 58-2008 ifølge SEKV. ID. NR.: 15. Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også en isolert DNA-sekvens som koder for den lette kjeden til et antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse som omfatter nukleotidene 61-705 ifølge SEKV. ID. NR.: 17.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører også en klonings- eller ekspresjonsvektor som omfatter én eller flere DNA-sekvenser ifølge den foreliggende oppfinnelse. Følgelig er en klonings- eller ekspresjonsvektor tilveiebrakt som omfatter én eller flere DNA-sekvenser som koder for et antistoff ifølge den foreliggende oppfinnelse. Fortrinnsvis omfatter klonings- eller ekspresjonsvektoren to DNA-sekvenser, som henholdsvis koder for den lette kjeden og den tunge kjeden til antistoff-molekylet ifølge den foreliggende oppfinnelse. Fortrinnsvis omfatter en vektor ifølge den foreliggende oppfinnelse sekvensene som er gitt i SEKV. ID. NR.: 15 og 17. Nukleotidene 1-57 ifølge SEKV. ID. NR.: 15 og 1-60 ifølge SEKV. ID. NR.: 17 koder for signalpeptid-sekvensen fra museantistoffet B72,3 som mest foretrukket er spaltet for å gi et nøytraliserende antistoff-molekyl ifølge den foreliggende oppfinnelse.

Vanlige fremgangsmåter med hvilke vektorene kan konstrueres, og fremgangsmåter for transfeksjon og dyrking er velkjent for fagfolk på området. Med hensyn til dette er det gjort referanse til "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F.M. Ausubel (red.), Wiley Interscience, New York og Maniatis-Manualen som er produsert av Cold Spring Harbor Publishing.

Også tilveiebrakt er en vertscelle som omfatter én eller flere klonings- eller ekspresjons-vektorer som omfatter én eller flere DNA-sekvenser som koder for et antistoff ifølge den foreliggende oppfinnelse. Et hvilket som helst hensiktsmessig system av vertscelle/vektor kan anvendes for ekspresjon av DNA-sekvensene som koder for antistoff-molekylet ifølge den foreliggende oppfinnelse. Bakterielle, for eksempel *E. coli,* og andre mikrobielle systemer kan anvendes, eller eukaryote, for eksempel pattedyrvertcelle-ekspresjonssystemer kan også anvendes, se Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181. Egnede pattedyrvertceller inkluderer CHO, NS0, myelom- eller hybridomceller. Eksempler på egnede ekspresjonssystemer inkluderes glutaminsyntase-ekspresjonssystemet beskrevet i WO 87/04462.

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også en fremgangsmåte for fremstilling av et antistoff-molekyl ifølge den foreliggende oppfinnelse som omfatter å dyrke en vertscelle som inneholder en vektor ifølge den foreliggende oppfinnelse under betingelser som er egnet for å lede til ekspresjon av protein fra DNA som koder for antistoff-molekylet ifølge den foreliggende oppfinnelse og å isolere antistoff-molekylet.

Antistoff-molekylet kan omfatte bare et tung eller lett kjede polypeptid, i hvilket tilfelle bare en tung kjede eller lett kjede polypeptidkodende sekvens trenger å anvendes for å transfektere vertscellene. For fremstilling av produkter som omfatter både tunge og lette kjeder, kan cellelinjen transfekteres med to vektorer, en første vektor som koder for et lett kjede polypeptid og en andre vektor som koder for et tung kjede polypeptidkjede. Alternativt kan én enkel vektor anvendes, der vektoren inkluderer sekvenser som koder for lett og tung kjede polypeptider.

I og med at antistoffene ifølge den foreliggende oppfinnelse er formålstjenlige i behandlingen og/eller profylaksen av en patologisk tilstand, tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse også en farmasøytisk eller diagnostisk sammensetning som omfatter et antistoff-molekyl ifølge den foreliggende oppfinnelse i kombinasjon med én eller flere av et farmasøytisk akseptabelt hjelpestoff, fortynningsmiddel eller bærer. Følgelig er det tilveiebrakt anvendelse av et antistoff ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et medikament. Sammensetningen vil vanligvis tilføres som del av en steril, farmasøytisk sammensetning som normalt vil inkludere en farmasøytisk akseptabel bærer. En farmasøytisk sammensetning ifølge den foreliggende oppfinnelse kan i tillegg omfatte en farmasøytisk akseptabel adjuvans.

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også en fremgangsmåte for fremstilling av en farmasøytisk eller diagnostisk sammensetning som omfatter å tilføre og blande

antistoff-molekylet ifølge den foreliggende oppfinnelse sammen med én eller flere farmasøytisk akseptable hjelpestoffer, fortynningsmidler eller bærere.

Antistoff-molekylet kan være den eneste aktive ingrediensen i den farmasøytiske eller diagnostiske sammensetningen eller kan være ledsaget av andre aktive ingredienser, inkludert andre antistoff-ingredienser, for eksempel anti-TNF, anti-IL-1β, anti-T-celle, anti-IFNγ eller anti-LPS-antistoffer eller ikke-antistoff-ingredienser, slik som xantiner.

De farmasøytiske sammensetningen omfatter fortrinnsvis en terapeutisk effektiv mengde av antistoffet ifølge oppfinnelsen. Uttrykket "terapeutisk effektiv mengde" som anvendt her, refererer til en mengde av et terapeutisk middel som kreves for å behandle, lindre eller forhindre en målrettet sykdom eller tilstand, og å utvise en detekterbar, terapeutisk eller preventiv effekt. For et hvilket som helst antistoff kan den terapeutisk effektive mengden estimeres initielt enten i celledyrkingsanalyser eller i dyremodeller, vanligvis i gnagere, kaniner, hunder, griser eller primater. Dyremodellen kan også anvendes for å bestemme det hensiktsmessige konsentrasjonsområdet og administreringsveien. Slik informasjon kan så anvendes for å bestemme formålstjenlige doser og administreringsveier hos mennesker.

Den nøyaktige, terapeutisk effektive mengden for et human individ vil avhenge av alvorlighetsgraden av sykdomstilstanden, den generelle helsen til individet, alderen, vekten og kjønnet til individet, dietten, tid og frekvens for administrering, legemiddel-kombinasjon(er), reaksjonsfølsomheter og toleranse/respons for terapi. Denne mengden kan bestemmes ved rutine-eksperimentering og er innenfor klinikernes dom. Vanligvis vil en terapeutisk, effektiv mengde være fra 0,01 mg/kg til 50 mg/kg, fortrinnsvis 0,1 mg/kg til 20 mg/kg. Farmasøytiske sammensetninger kan praktisk presenteres i enhetsdoseringsformer som inneholder en forutbestemt mengde av et aktivt middel ifølge oppfinnelsen per dose.

Sammensetningene kan administreres individuelt til en pasient eller kan administreres i kombinasjon (f.eks. samtidig, sekvensielt eller separat) med andre midler, legemidler eller hormoner.

Dosen som antistoff-molekylet ifølge den foreliggende oppfinnelse administreres med, avhenger av naturen av tilstanden som skal behandles, graden av den foreliggende betennelsen og av om antistoff-molekylet anvendes profylaktisk eller for å behandle en eksisterende tilstand.

Dosefrekvensen vil avhenge av halveringstiden til antistoff-molekylet og varigheten av dets effekt. Hvis antistoff-molekylet har en kort halveringstid (f.eks. 2 til 10 timer), kan det være nødvendig å gi én eller flere doser per dag. Alternativt, hvis antistoff-molekylet har en lang halveringstid (f.eks. 2 til 15 dager eller 2 til 30 dager) kan det bare være nødvendig å gi en dosering én gang per dag, én gang per uke eller til og med én gang hver 1 eller 2 måneder.

Den farmasøytisk akseptable bæreren burde ikke i seg selv indusere produksjonen av antistoffer som er skadelige for individet som mottar sammensetningen og burde ikke

være toksisk. Egnede bærere kan være store, sent metaboliserte makromolekyler, slik som proteiner, polypeptider, liposomer, polysakkarider, polymelkesyrer, polyglykolsyrer, polymere aminosyrer, aminosyre-kopolymerer og inaktive viruspartikler.

Farmasøytisk akseptable salter kan anvendes, for eksempel mineralsyresalter, slik som hydroklorider, hydrobromider, fosfater og sulfater, eller salter av organiske syrer, slik som acetater, propionater, malonater og benzoater.

Farmasøytisk akseptable bærere i terapeutiske sammensetninger kan i tillegg inneholde væsker, slik som vann, saltløsning, glyserol og etanol. I tillegg kan hjelpestoffer, slik som fuktemidler eller emulgatorer eller pH-buffrende substanser være til stede i slike sammensetninger. Slike bærere muliggjør at de farmasøytiske sammensetningene formuleres som tabletter, piller, drops, kapsler, væsker, geler, siruper, oppslemminger og suspensjoner, for inntak av pasienten.

Foretrukne former for administrering inkluderer former som er egnede for parenteral administrering, f. eks. ved injeksjon eller infusjon, for eksempel ved doseinjeksjon eller kontinuerlig infusjon. Når produktet er for injeksjon eller infusjon, kan det ta form av en suspensjon, løsning eller emulsjon i en oljeaktig eller væskeaktig bærer, og den kan inneholde formuleringsmidler, slik som suspenderende, konserverende, stabiliserende og/eller dispergerende midler. Alternativt kan antistoff-molekylet være i tørr form, for rekonstitusjon før anvendelse med en hensiktsmessig, steril væske.

Når de er formulert, kan sammensetningene ifølge oppfinnelsen administreres direkte til individet. Individene som skal behandles, kan være dyr. Det er imidlertid foretrukket at preparatene er tilpasset for administrering til humane individer.

De farmasøytiske sammensetningene ifølge denne oppfinnelsen kan administreres ved en hvilken som helst antall veier inkludert orale, intravenøse, intramuskulære, intraarterielle, intramedulære, intratekale, intraventrikulære, transdermale, transkutane (for eksempel, se WO 98/20734), subkutane, intraperitoneale, intranasale, enterale, topikale, sublinguale, intravaginale eller rektale veier. Hyposprayer kan også anvendes for å administrere de farmasøytiske sammensetningene ifølge oppfinnelsen. Typisk kan de terapeutiske sammensetningen fremstilles til å være injiserbare, enten som væskeløsninger eller suspensjoner. Faste former som er egnet for løsning i, eller suspensjon i væskebærere før injeksjon, kan også fremstilles.

Direkte levering av sammensetningene vil vanligvis utføres ved injeksjon, subkutant, intraperitonealt, intravenøst eller intramuskulært, eller levert til det interstitielle vevsrommet. Sammensetningene kan også administreres til en lesjon. Doseringsbehandling kan være et enkelt doseringsskjema eller et multidoseringsskjema.

Det vil anerkjennes at den aktive ingrediensen i sammensetningen vil være et antistoff-molekyl. Som sådant vil det være mottakelig for degradering i mage-tarmkanalen. Dersom sammensetningen skal administreres ved en vei som anvender mage-tarmkanalen,

må dermed sammensetningen inneholde midler som beskytter antistoffet fra degradering, men som frigjør antistoffet idet det har blitt absorbert fra mage-tarmkanalen.

En nøye diskusjon av farmasøytisk akseptable bærere er tilgjengelig i Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

Det er også tenkt at antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelse kan administreres ved anvendelse av genterapi. For å oppnå dette, introduseres DNA-sekvenser som koder for de tunge og lette kjedene til antistoff-molekylet under kontroll av hensiktsmessige DNA-komponenter til en pasient, slik at antistoff-kjedene uttrykkes fra DNA-sekvensene og settes sammen *in situ*.

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også et antistoff-molekyl for anvendelse i kontrollen av betennelsessykdommer. Fortrinnsvis kan antistoff-molekylet anvendes for å redusere betennelsesprosessen eller for å forhindre betennelsesprosessen.

Også tilveiebrakt er et antistoff-molekyl ifølge den foreliggende oppfinnelse for anvendelse i behandlingen og/eller profylaksen av en patologisk forstyrrelse som er mediert av IL-6 eller assosiert med et økt nivå av IL-6. Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer ytterligere anvendelse av et antistoff-molekyl ifølge den foreliggende oppfinnelse i fremstillingen av et medikament for behandlingen og/eller profylaksen av en patologisk forstyrrelse som er mediert av IL-6 eller assosiert med et økt nivå av IL-6. Den patologiske tilstanden er fortrinnsvis valgt fra gruppen bestående av infeksjoner (virus, bakterier, sopp og parasitt), endotoksisk sjokk assosiert med infeksjon, artritt, reumatoid artritt, psoriatisk artritt, systemisk barnereumatisme, (JIA), systemisk lupus erytemotosus (SLE), astma, bekkenbetennelsessykdom, Alzheimers sykdom, Crohns sykdom, ulcerøs kolitt, irritabelt tarmsyndrom, Castlemans sykdom, ankyloserende spondylitt, dermatomyositt, uveitt, Peyronis sykdom, søliaki, galleblæresykdom, Pilonidal sykdom, peritonitt, psoriasis, vaskulitt, kirurgiske vedheft, slag, diabetes type I, Lyme artritt, meningoencefalitt, immunmedierte betennelsesforstyrrelser i det sentrale og perifere nervesystemet, slik som multippel sklerose og Guillain-Barr-syndrom, andre autoimmune forstyrrelser, pankreatitt, traumer (kirurgi), transplantat-mot-vertsreaksjon, transplantatavstøtning, kreft (både faste tumorer, slik som melanom, hepatoblastom, sarkom, plateepitel-karsinom, overgangs-cellekreft, ovariekreft og hematologiske maligniteter og spesielt akutt myelogen leukemi, kronisk myelogen leukemi, magekreft og kolonkreft), hjertesykdom, inkludert iskemiske sykdommer, slik som myokardisk infarkt, så vel som aterosklerose, intravaskulær koagulering, benresorpsjon, brannskade pasienter, osteoporose, periodontitt og hypoklorhydia.

Den patologiske forstyrrelsen er fortrinnsvis reumatoid artritt eller systemisk lupus erytemotosus (SLE).

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også et antistoff-molekyl ifølge den foreliggende oppfinnelse for anvendelse i behandlingen eller profylaksen av smerte.

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer ytterligere anvendelsen av et antistoff-molekyl ifølge den foreliggende oppfinnelse i fremstillingen av et medikament for behandlingen eller profylaksen av smerte.

Et antistoff-molekyl ifølge den foreliggende oppfinnelse kan benyttes i hvilken som helst terapi der det er ønsket å redusere effektene av IL-6 i menneske- eller dyrekroppen. IL-6 kan være sirkulerende i kroppen eller kan være til stede i et uønsket høyt nivå, lokalisert til et spesielt sete i kroppen, for eksempel et sete med betennelse.

Et antistoff-molekyl ifølge den foreliggende oppfinnelse anvendes fortrinnsvis for kontrollen av betennelsessykdom.

Den foreliggende beskrivelsen omtaler også en fremgangsmåte for å behandle menneske- eller dyreindivider som lider av, eller har risiko for en forstyrrelse som er mediert av IL-6, der fremgangsmåten omfatter å administrere til individet en effektiv mengde av antistoff-molekylet ifølge den foreliggende oppfinnelse.

Antistoff-molekylet ifølge den foreliggende oppfinnelse kan også anvendes i diagnose, for eksempel i *in vivo*-diagnosen og visualiseringen av sykdomstilstander som involverer IL-6.

Den foreliggende oppfinnelse er videre beskrevet ved illustrasjon bare i de følgende eksemplene, som refererer til de ledsagede figurene, hvor:

Figur 1 viser podingsutformingen for 240.g1 tung (figur 2a, SEKV. ID. NR.: 11) og lett kjede (figur 2b, SEKV. ID. NR.: 13) sekvenser. Symbolet (|) uthever forskjeller mellom donor:akseptor:podet rammeverksekvenser. CDR er enkelt understreket. Disse er som definert ved Kabat, bortsett for CDR-H1 som omfatter både Kabat- og Chotia-definisjoner. Dobbelt-understrekede sekvenser er donor-rammeverkrester som er beholdt i podingene.

Figur 2a viser den translerte sekvensen til 240.gI IgG4 tung kjede som viser intron/ekson-grenser.

Figur 2b viser den translerte sekvensen til 240.g1 lett kjede som viser intron/ekson-grenser.

Figur 3a viser inhiberingen av humant rekombinant, humant pattedyr-avledet, Rhesus-, synomolgus- og muse-IL-6-indusert proliferasjon av T1165-celler med 240.g1-antistoff.

Figur 3b viser inhiberingen av humant rekombinant IL-6 og sIL-6R-indusert MCP-1-produksjon i HUVEC med 240-g1-antistoff.

Figur 3c viser inhiberingen av IL-17 indusert endogent IL-6 og sIL-6R-indusert MCP-1-produksjon i HUVEC med 240.g1-antistoff.

Figur 4. *In vivo*-nøytralisering av hIL-6-indusert SAA i mus ved administrering av CA030_240.g1 (sete 3 antistoff) n=7-8/gruppe, unntatt PBS n=6. Statistisk analyse med ANOVA med Bonferroni posttest, **P<0,01, sammenlignet med IL-6 alene.

DNA-manipuleringer og generelle fremgangsmåter

E. coli-stamme i INVαF' (Invitrogen) ble anvendt for transformasjon og rutinemessig dyrking. DNA-restriksjons- og modifiseringsenzymer ble tilveiebrakt fra Roche Diagnostics

Ltd. og New England Biolabs. Plasmid-opparbeidelser ble utført ved anvendelse av Maxi Plasmid rensesett (QIAGEN, katalognr. 12165). DNA-sekvenseringsreaksjoner ble utført ved anvendelse av ABI Prism Big Dye terminator sequencing kit (katalog nr. 4304149) og kjørt på en ABI 3100 automatisert sekvenseringsmaskin (Applied Biosystems). Data ble analysert ved anvendelse av programmet Auto Assembler (Applied Biosystems). Oligonukleotider ble tilveiebrakt fra INVITROGEN. Syntetiske gener ble bygget hos Entelechon. Konsentrasjonen av Fab og IgG ble bestemt ved anvendelse av sammenstillings-ELISA.

Eksempel 1: Isolering av 132E09

Rotter ble immunisert ved subkutan injeksjon av rekombinant humant IL-6 (Preprotech) ved tre ukentlige intervaller, initielt med Freunds komplette adjuvans, og deretter med Freunds ufullstendige adjuvans. Milter ble høstet én til to uker etter siste immunisering, og enkeltcelle-suspensjoner ble fremstilt. Lymfocytter fra immuniserte rotter ble dyrket i nærvær av tymom-EL4-celler fra bestrålte mus og kanin T-celle kondisjonert medium i én uke i 96-brønners mikrotiter plater. Supernatanter ble screenet for tilstedeværelsen av antistoffer som var spesifikke for humant-IL-6 i ELISA. Positive prøver ble ytterligere screenet for evnen til å nøytralisere de biologiske effektene av humant IL-6 i en DS1-cellelinje-analyse (Bock et al., 1993, Cytokine, 5, 480-489).

Individuelle B-celler som utskiller antistoff med passende bindingskarakteristikker, ble isolert fra positive mikrotiter brønner i henhold til Selected Lymphocyte Antibody Method (Babcook et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 7843-7848, WO92/02551) og tunge og lette kjeders variable region-gener ble klonet via revers transkripsjons-PCR fra enkelt B-celler fra rotte. Variable regioner ble uttrykt i rekombinant IgG-format for å bekrefte binding og antistoff 132E09 ble valgt for humanisering og videre studie. Den variable region-sekvensen fra rotte ble registrert som CA030_00240.

V-region-sekvensene er vist i SEKV. ID. NR.: 1 til 4.

Eksempel 2: CDR-poding av 132E09

En serie av humaniserte VL- og VH-regioner ble utformet, hvor de CDR-hypervariable regionene pluss et varierende antall av rammeverk-rester fra 132E09 ble podet på humane V-region-akseptor-rammeverk.

Ti podede VL-regioner (gL1-10) ble utformet, og gener ble bygget ved oligonukleotid-sammenstilling og PCR-mutagenese. Totalt 13 podede VH-regioner ble også konstruert (gH1-13) ved anvendelse av to forskjellige rammeverk-regioner, VH3 1-4 3-72 og VH3 1-3 3-21. De lett kjede podede sekvensene ble subklonet i den humane lett kjede-ekspresjonsvektoren pKH10.1 som inneholder det DNA som koder for den humane C-kappa konstante regionen (Km3 allotype). De tung kjede kodede sekvensene ble subklonet i den humane gamma-4 ekspresjonsvektoren pVhg4P FL, som inneholder DNA som koder for den humane gamma-4 konstante regionen som inneholder den hengsel-stabiliserende

mutasjonen S241P (Angal et. al, ovenfor). Plasmider ble ko-transfektert inn i CHO-celler, og antistoffene som ble produsert ble screenet for aktivitet i IL-6-bindings og *in vivo*-analyser. Transfeksjoner av CHO-celler ble utført ved anvendelse av Lipofektamin 2000-prosedyren ifølge produsentens instruksjoner (InVitrogen, katalognr. 11668).

Av de 13 tung kjede podingene produsert, inneholdt to bare en enkelt rammeverk-donor-rest (Ala) i posisjon 49, og disse ble produsert ved anvendelse av begge de to forskjellige tung kjede rammeverkene. VH3 1-3 3-21-podingen ble dårlig uttrykt i CHO-celler og viste redusert affinitet for IL-6. I motsetning ble podingen som anvender VH3 1-4 3-72-rammeverket uttrykt godt og beholdt affiniteten til donor-antistoffet. Denne tung kjede podingen som omfatter en enkelt rammeverk-donor-rest, ble valgt i kombinasjon med lett kjede podingen gL10, hvor bare CDRene ble overført.

Figur 1 viser en innretting mellom donorrotte-sekvensen 132E09 og de humane akseptor-rammeverkene. Den tunge kjedens akseptor-rammeverk er den humane kimlinje-sekvensen VH3 1-3 3-72, hvor rammeverk 4 kommer fra denne delen av den JH4-kimlinje-JH-regionen. Den lette kjedens akseptor-rammeverk er den humane kimlinje-sekvensen VK1 2-1-(1) O12, med rammeverk 4 som kommer fra denne delen av den humane JK2-kimlinje-JK-regionen. Podesekvensene for gH13 og gL 10 er vist i figur 1 (SEKV. ID. NR.: 11, 12, 13 og 14). Dette podede antistoffet ble betegnet CA030_00240.g1. Dette ble produsert som et helt IgG4 som omfatter serin til prolin-substitusjonen i posisjon 241 som beskrevet ovenfor. De komplette, translerte tung- og lett kjede sekvensene er vist i henholdsvis figurene 2a og 2b. Den fullstendige aminosyre-sekvensen til den tunge kjeden er tilveiebrakt i SEKV. ID. NR.: 16, og den lette kjeden i SEKV. ID. NR.: 18. DNA-sekvensen som koder for den tunge og den lette kjeden er tilveiebrakt i henholdsvis SEKV. ID. NR.: 15 og 17. Nukleotidene 1-57 i SEKV. ID. NR.: 15 og i figur 2a koder for signalpeptid-sekvensene fra museantistoff B72.3 VH og nukleotidene 1-60 i SEKV. ID. NR.: 17 og i figur 2b koder for signalpeptid-sekvensene fra museantistoff B72.3 VL.

Museantistoff B72.3 er beskrevet i Whittle et al., 1987, Protein Eng. 1(6) 499-505.

Eksempel 3: Bindingsaffinitet

Bindingsaffinitetsmålinger av CA030_00240.g1

BIAcore-teknologien måler bindingen mellom biomolekyler i sann tid og uten behovet om merking. Én av interaktantene, kalt liganden, er enten immobilisert direkte eller fanget på den immobiliserte overflaten mens den andre, kalt analytten, strømmer i løsning over den fangede overflaten. Sensoren detekterer forandringen i masse på sensoroverflaten, når analytten binder liganden for å danne et kompleks på overflaten. Dette korresponderer til assosiasjonsprosessen. Dissosiasjonsprosessen er monitorert når analytten erstattes med buffer. I BIAcore-affinitetsanalysen er liganden CA030_00240.g1 hele IgG4, og analytten er humant IL-6.

Instrument

BIACORE 3000, Biacore AB, Uppsala, Sverige.

Sensorbrikke

CM5 (forskningskvalitet) katalog nr. BR-1001-14, Biacore AB, Uppsala, Sverige. Brikker ble lagret ved 4 °C.

BIAnormaliseringsløsning

70 % (vekt/vekt) glyserol. Del av BIAmaintenance Kit, katalognr.: BR-1002-51, Biacore AB, Uppsala, Sverige. BIAmaintenance Kit ble lagret ved 4 °C.

Aminkoblingssett

Katalognr.: BR-1000-50, Biacore AB, Uppsala, Sverige.

Etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)karbodiimidhydroklorid (EDC). Laget til 75 mg/ml i destillert vann og lagret i 200 µl-alikvoter ved -70 °C.

N-hydroksysuksinimid (NHS). Laget til 11,5 mg/ml i destillert vann og lagret i 200 µl-alikvoter ved -70 °C.

1 M etanolaminhydroklorid-NaOH pH 8,5. Lagret i 200 µl-alikvoter ved -70 °C-

Buffere

Kjørebuffer: HBS-EP (som er 0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005 % Surfactant P 20). Katalog nr.: BR-1001-88, Biacore AB, Uppsala, Sverige. Buffer lagret ved 4 °C.

Immobiliseringsbuffer: Acetat 5,0 (som er 10 mM natriumacetat pH 5,0). Katalognr.: BR-1003-51, Biacore AB, Uppsala, Sverige. Buffer lagret ved 4 °C.

Ligandfanging

Affinipure-F(ab')-fragment-goat-anti-human-IgG, Fc-fragment specific, Jackson ImmunoResearch Inc (Pennsylvania, USA), katalognr.: 109-006-098. Reagens lagret ved 4 °C.

Analytt

Recombinant human IL-6 (R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, Oxon. Katalog nr 206-IL-050, lot nr. A131402A) lagret ved -70 °C og tint én gang for hver analyse.

Rekombinant synomologusape IL-6 og rekombinant Rhesus-ape IL-6 ble produsert ved forbigående transfeksjon av CHO-celler. Materialet ble anvendt som urenset og ikke-kvantifisert celledyrkings-supernatant.

Regenereringsløsning

40 nM HCl fremstilt ved fortynning med destillert vann fra en 11,6 M stamløsning (BDH, Poole, England. Katalog nr.: 101254H).

5 mM NaOH fremstilt ved fortynning med destillert vann fra en 50 mM stamløsning. Katalog nr.: BR-1003-58, Biacore AB, Uppsala, Sverige.

Analysemetode

BIA (Biamolekylær Interaksjons-Analyse) ble utført ved anvendelse av en BIAcore 3000 (BIAcore AB). Affinipure F(ab')$_2$-Fragment-goat-anti-human IgG, Fc-fragment spesific (Jackson ImmunoResearch) ble immobilisert på en CM5 sensorbrikke via aminkoblingskjemi til et innfangnings-nivå på ≈5000 responsenheter (RU). HBS-EP-buffer (10 mM HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005 % Surfactant P20, BIAcore AB) ble anvendt som kjørebufferen med en væskestrømshastighet på 10 μl/min. En 10 μl-injeksjon av CA030_240.g1 ved 4 μg/ml ble anvendt for innfangning med det immobiliserte anti-humane IgG-Fc. Humant IL-6 ble titrert over innfanget CA030_240.g1 ved forskjellige konsentrasjoner ved en væskestrømshastighet på 30 μl/min. Overflaten ble regenerert ved en 10 μl injeksjon av 40 mM HCl, etterfulgt av en 5 μl injeksjon av 5 mM NaOH ved en væskestrøm-hastighet på 10 μl/min.

Bindingskurver for bakgrunns-subtraksjon ble analysert ved anvendelse av BIAevaluerings-programvaren (versjon 3,2) etter standard prosedyrer. Kinetiske parametere ble bestemt fra tilpasningsalgoritmen.

Én porsjon av CA030_240.g1 ble anvendt i denne studien. Affiniteten ble målt ved humane IL-6-konsentrasjoner ved eller under 20 nM. Affinitetsverdien som ble bestemt for CA030_240.g1 var i området 9,02-10,50 pM med en middelverdi ± s.e.m. på 9,76 ± 0,74 pM (tabell 1.1). Det var ikke mulig å måle affiniteten med det humane IL-6 immobilisert på BIAcore brikken fordi immobilisering av IL-6 resulterte i tap av nativ konformasjon.

Fordi det ikke var mulig å kvantitere synomologusape eller Rhesus-ape IL-6, var det heller ikke mulig å bestemme virkelige kinetiske parametere for deres interaksjon med CA030_00240.g1. Visuell inspeksjon av bindingssensogrammene indikerer imidlertid at CA030_00240.g1 binder til disse ikke-humane primat-IL-6 med en tilsvarende affinitet som for humant IL-6.

Tabell 1.1: Affinitet av CA030_240.g1 for humant IL-6

Referanse	**k_a ($M^{-1}s^{-1}$)**	**k_d (s^{-1})**	**K_d (M)**	**K_dpM**
10017474/39-51	7,31E+05	7,68E-06	1,05E-11	**10,5**
10017474/39-51	8,52E+05	7,68E-06	9,02E-12	**9,02**

Eksempel 5: *In vitro*-nøytraliseringsanalyser

Styrken til antistoff CA030_00240.g1, heretter forkortet til 240.g1, ble bestemt ved anvendelse av to forskjellige analyser. Den første analysen anvendte en muse-IL-6-avhengig cellelinje, kalt T1165, som proliferer i respons til mus, Rhesus, synomolgus og menneske IL-6 fra. Denne direkte signaleringen av IL-6 til IL-6-reseptor på celleoverflaten i forbindelse med en signalreseptor-subenhet kalt gp130 er kalt *cis*-signalering. Den andre analysen anvendte endotelceller fra human navlestreng (HUVEC) stimulert med IL-6 pluss løselig IL-6-reseptor (IL-6R) hvor avlesning var produksjon av monocytt-kjemoatraktantprotein-1 (MCP-1). I denne analysen var IL-6 enten tilsatt eksogent eller kunne produseres ved å stimulere HUVEC med det cytokinet interleukin-17 (IL-17). Disse to analysevariantene ble benevnt *trans*-signalering, siden HUVEC ikke uttrykker IL-6R og bare kan respondere, dvs. produsere MCP-1 når IL-6 og løselig IL-6R begge tilsettes eksogent.

Ved å anvende disse forskjellige analysene, var det mulig å generere ND50 (nøytraliserende dose 50 %)-verdier for 240.g1 mot menneske (rekombinant og naturlig), Rhesus, synomolgus og mus IL-6.

Materialer

Dyrkingsmedium

T1165-dyrkningsmedium-RPMI1640, supplert med 10 % føtalt kalveserum, penicillin (100 enheter/ml), streptomycin (50 μg/ml), glutamin (2 mM) og 10 ng/ml av humant, rekombinant IL-6, R&D systems, UK.

HUVEC-dyrkningsmedium – storskala endotelcelle basalmedium (LVCBM) TCS Cellworks, UK, storskala endotelcelle vekstsupplement TCS Cellworks, UK og antibiotika supplement TCS Cellworks, UK.

CA 030 00240.g1 produsert internt ved en konsentrasjon på 6,83 mg/ml i PBS.

Humant IL-6 R&D systems, UK, humant mammalsk avledet IL-6 (avledet internt fra CHO-transfeksjon med humant IL-6 10017108/67), Rhesus IL-6 (avledet internt fra CHO-transfeksjon med Rhesus IL-6 10017108/67), synomolgus IL-6 (avledet internt fra CHO-transfeksjon med synomolgus IL-6 10017108/67), muse-IL-6 R&D systems, UK. Anti-humant MCP-1 innfangningsantistoff (555055) og anti-humant MCP-1 deteksjonsantistoff (554664) og humant, rekombinant MCP-1 (890225), BD Biosciences, CA. Streptavidin-HRP (AMDEX) Amerham bioscience, UK. Thrombin Merck Biosciences, Darmstadt, Tyskland sIL-6 R&D systems, UK. Humant IL-17 R&D systems, UK.

T1165-analyse - CELLTITER 96 AQueous Promega, CA.

TM Blue (Serologicals, GA).

Måling av 240.g1-aktivitet ved anvendelse av den IL-6-avhengige prolifereringen av T1165-celler

T1165-celler ble tint 4 dager før anvendelse og dyrket i RPMI1640, supplert med 10 % FCS, antibiotika, glutamin og 10 ng/ml av humant IL-6. Celle-viabilitet ble målt ved anvendelse av trypanblå eksklusjon, bare celler som ble bedømt til å være minst 90 % levende, ble anvendt. Før anvendelse ble celler vasket to ganger i RPMI1640 i fravær av humant IL-6. Celler ble deretter talt og fordelt i 96-brønners flatbunnede plater ved en tetthet på $5x10^4$/celler per brønn. I separate plater ble en seriell fortynning av 240.g1 inkubert i nærvær av enten humant rekombinant, humant pattedyr-avledet (også referert til som humant CHO IL-6), Rhesus-, synomolgus- eller muse-IL-6 ved en fast konsentrasjon på 1 ng/ml (0,038 nM). Det pre-blandede komplekset av 240.g1 og IL-6 ble så overført til brønner som inneholdt T1165-celler som ble inkubert i 48 timer ved 37 °C i en fuktgjort 5 % CO_2-atmosfære. Under de siste seks timene av inkuberingen ble 20 ml av CELLTITER 96 AQueous tilsatt for å bestemme antallet av prolifererende celler. Inhiberingen av IL-6-avhengig proliferering av T1165 celler med 240.g1 ble uttrykt som en prosentandel inhibering av brønner som ble behandlet med IL-6 bare minus kontrollbrønner som inneholdt celler, men ikke IL-6.

Aktiviteten av 240.g1 mot humant rekombinant-, humant pattedyravledet-, Rhesus-, synomolgus-, og muse-IL-6-indusert proliferering av cellelinjen T1165 kan ses i figur 3a. 240.g1 inhiberte kraftig humant rekombinant-, humant pattedyravledet-, Rhesus-, synomolgus-, men ikke muse-IL-6-aktivitet.

ND50 for humant rekombinant IL-6 var 1,1 ± 0,5 ng/ml (7,26 ± 3,3 pM). ND50 for humant pattedyravledet IL-6 var 3,6 ± 2,4 ng/ml (23,76 ± 15,84 pM). ND50 for Rhesus IL-6 var 2,2 ± 1,1 ng/ml (14,52 ± 7,26 pM). ND50 for synomolgus IL-6 var 5,4 ± ng/ml (35,64 ± 7,26 pM).

Måling av 240.g1-aktivitet ved anvendelse av IL-6 og løselig IL-6-reseptor-indusert MCP-1-produksjon i HUVEC

HUVEC (TCS Cellworks, UK) ble dyrket i storskala-endotelcelle-basalmedium (LVECBM), og cellekulturene ble ikke splittet mer enn fem ganger. Cellene ble dyrket til 75 % konfluens før anvendelse. Cellene ble løsnet ved anvendelse av trypsin/EDTA, resuspendert og vasket én gang i nylaget LVECBM. Cellene ble så talt og fordelt i 96-brønners flatbunnede plater ved en tetthet på $2x10^4$/celler per brønn. Cellene ble så dyrket over natt ved 37 °C i en fuktgjort 5 % CO_2-atmosfære. Den neste dag ble cellene vasket i nylaget medium, supplert med biotinylert trombin (3 U/ml) og satt til side. I separate plater ble en seriell fortynning av 240.g1 inkubert i nærvær av humant rekombinant IL-6 (50 ng/ml, 3,84 nM) og sIL-6R ved en fast konsentrasjon på 500 ng/ml (10,15 nM. I tillegg ble 240.g1 også inkubert med humant rekombinant IL-17 (25 ng/ml, 1,18 nM), som stimulerer HUVEC til å produsere IL-6, og sIL-6R ved en fast konsentrasjon på 500 ng/ml (10,15 nM).

Det pre-blandede komplekset av 240.g1 og IL-6/sIL-6R eller IL-17/sIL-6R ble så overført til brønner som inneholder HUVEC som ble inkubert i 24 timer ved 37 °C i en fuktgjort 5% CO_2-atmosfære. Etter inkuberings-perioden ble cellefri supernatant samlet og humane MCP-1-nivåer bestemt ved sandwich-ELISA (protokoll gitt nedenfor). Inhiberingen av IL-6/sIL-6R- eller IL-17/sIL-6R -indusert MCP-1-produksjon med 240.g1 ble uttrykt som en prosentandel inhibering av brønner som var behandlet med IL-6/sIL-6R eller IL-17/sIL-6R minus kontrollbrønner som inneholdt celler, men ingen stimuli. I tillegg ble kontroller tilsatt for å indikere responsen av celler til tilsettingen av humant IL-6 i fravær av sIL-6R.

MCP-1-ELISA

Nunc maxisorp-plater ble dekket med anti-MCP-1-innfangningsantistoff ved en konsentrasjon på 2 μg/ml. Plater ble inkubert ved +4 °C over natt, deretter vasket to ganger i PBS pluss 0,1 % tween20 (vaskebuffer). Plater ble blokkert i 1 time i PBS pluss 5 % bovint serumalbumin. Platene ble så vasket fire ganger med vaskebuffer, og standarder og prøver ble tilsatt. Plater ble inkubert i to timer ved romtemperatur. Plater ble så vasket, og biotinylert anti-MCP-1-antistoff ble tilsatt ved en konsentrasjon på 1 mg/ml. Plater ble inkubert i ytterligere 2 timer, så vasket fire ganger. En 1:5000 fortynning av streptavidin-HRP ble så tilsatt, og plater ble inkubert i 30 minutter. Plater ble til slutt vasket fire ganger, og TMB-substrat ble tilsatt. Fargeavlesninger ble tatt ved 630 nm og bakgrunns-avlesinger ved 492 nm. MCP-1-konsentrasjoner ble avledet fra en standardkurve ved anvendelse av en fire-parameters, logistisk kurvetilpasning på Genesis II programvare.

Aktivitet av 240.g1 mot humant rekombinant IL-6- og sIL-6R-indusert *trans*-signalering i HUVEC, kan ses i figur 3b. 240.g1 inhiberte kraftig, humant rekombinant IL-6- og sIL-6R-indusert MCP-1-produksjon med HUVEC. ND50 var 64 ± 62 ng/ml (422 ± 409 pM).

Aktiviteten av 240.g1 mot IL-17-indusert endogent IL-6- og sIL-6R-indusert *trans*-signalering i HUVEC kan ses i figur 3c. 240.g1 inhiberte kraftig IL-17-indusert endogent IL-6- og sIL-6R-indusert MCP-1-produksjon av HUVEC. ND50 var 93 ± 70 ng/ml (614 ± 462 pM).

Konklusjon

240.g1 er i stand til å nøytralisere bioaktiviteten til humant rekombinant-, humant pattedyravledet-, Rhesus- og synomolgus-, men ikke muse-IL-6 i en IL-6 *cis*-signaliserende analyse. I tillegg kan 240.g1 nøytralisere IL-6 *trans*-signalering som er indusert både med rekombinant og endogent IL-6.

Eksempel 6: *In vivo*-aktivitet

IL-6 er kjent for å indusere akutte-fase proteiner. I mus er det mest fremtredende akuttfase-proteinet serumamyloid A (SAA). Humant IL-6 er i stand til å virke på

musereseptoren, slik at det er mulig å injisere humant IL-6 i mus og måle SAA-produksjon i serumet.

Balb/c-mus ble injisert s.c. med sete-3-spesifikt anti-hIL-6-antistoff, CA030_240.g1 helt IgG4. 24 timer senere ble mus injisert i.p. med hIL-6 ved 30 μg/kg (Peprotech katalog nr. 200-06, lot nr. 0203B16). Etter 20 timer ble blodet tatt ved hjertepunktering, og serum ble samlet for evaluering av serum amyloid A (SAA) ved ELISA (Tridelta lot nr. 22KT022). Som notert i figur 4, ble SAA-induksjon med hIL-6 inhibert med CA030_240.g1 med statistisk signifikant reduksjon i SAA som ble notert ved doser på 0,3, 0,1 og 0,03 mg/kg.

n=7-8/gruppe, unntatt PBS n=6. Statistisk analyse ved ANOVA med Bonferroni post-test, ** P<0,01 sammenlignet med IL-6 alene.

2 ytterligere eksperimenter bekreftet signifikant inhibering av IL-6 (30 μg/kg)-indusert SAA med CA030_240.g1 ved doser på 0,3 og 0,1 mg/kg.

Eksempel 7: Epitop-kartlegging av CA030_00240.g1

Epitopen på humant IL-6 som CA030_00240.g1 gjenkjenner, ble kartlagt ved anvendelse av NMR-teknologi ved anvendelse av 240.g1 som et Fab'-fragment. Dette krevde at humant IL-6 ble uttrykt i *E. coli* og jevnt merket med $^{15}N/^{13}C/^{2}H$ stabile isotoper. Komplette, sekvensspesifikke ryggrads-resonans-oppgaver ble tilveiebrakt fra fritt IL-6, og forandringer i posisjonen av disse signalene som ble indusert ved bindingen av Fab'-fragmentet av CA030_00240.g1, ble detektert ved anvendelse av et 3D TROSY- HNCO-spektrum.

Ekspresjon og rensing av rekombinant humant IL-6:

Humant IL-6 ble fremstilt fra en *E. coli* ekspresjonsvektor (pET3d) som inneholdt den kodende sekvensen til den modne formen av proteinet. Proteinet ble uttrykt i Tuner (DE3) pLysS-celler som resulterte i høye utbytter av et uløselig produkt. ^{15}N-, $^{15}N/^{13}C$- og $^{15}N/^{13}C/^{2}H$-merkede prøver av IL-6 ble fremstilt fra celler som ble dyrket i hensiktsmessig merket rike media (Celtone).

IL-6 ble renset fra transformerte *E. coli* -celler ved anvendelse av veletablerte prosedyrer. Initielt ble celler som ble høstet fra 1 l dyrkningsmedia resuspendert i 40 ml buffer A [100 mM KCl, 2 mM DTT, 10 mM Tris-HCl pH 8,5, 25 % (vekt/volum) sukrose, løst protease-inhibitor tablett (Boehringer)]. 10 ml av buffer B [300 mM Tris-HCl pH 8,5, 100 mM EDTA, 4 mg/ml lysozym] ble tilsatt og suspensjonen ble inkubert på is i 10-30 minutter med risting av og til. 50 ml av buffer C [1 M LiCl, 20 mM EDTA, 0,5 % (volum/volum) NP-40] ble deretter tilsatt og suspensjonen ført gjennom den franske pressen to ganger ved 20 000 psi. Homogenatet ble så sentrifugert ved 16 000 g rpm i 15 minutter ved 4 °C, og pelleten ble beholdt. Pelleten ble resuspendert i 40 ml buffer D [10 mM Tris-HCl pH 8,5, 0,1 mM EDTA, 0,5 M LiCl, 0,5 % (volum/volum) NP-40, 1 mM DTT, løst protease tablett] og ført gjennom French Press og sentrifugert som tidligere. Dette trinnet repeteres. Pelleten

resuspenderes så i 40 ml buffer E [10 mM Tris-HCl pH 8,5, 0,1 mM EDTA, 0,5 % (volum/volum) NP-40, 1 mM DTT, løst protease tablett] og føres gjennom French Press og sentrifugeres som tidligere. Dette trinnet ble gjentatt. Den endelige pelleten løses i 6 ml 6 M GuHCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0 og klares ved sentrifugering ved 48 000 g i 30 minutter ved 4 °C. Supernatanten beholdes, og det løste IL-6 kvantiteres spektrofotometrisk.

Det løste IL-6 ble fortynnet til 2,5 mg/ml i 5 M GuHCl, 50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 2 mM GSH, 0,2 mM GSSG, 1 mM EDTA, pH 8,0 og inkubert ved 25 °C i 1 time. Prøvene ble så ytterligere dråpevis fortynnet til 250 μg/ml i 50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 2 mM GSH, 0,2 mM, GSSG, 1 mM EDTA, pH 8,0 og inkubert ved 25 °C i 3 timer. Alt presipitat dannet ved dette trinn, fjernes ved sentrifugering ved 30 000 g i 30 minutter ved 4 °C. Det klarede materialet dialyseres mot 50 mM Tris-HCl, 10 % (volum/volum) glyserol, pH 9,0 i minst 16 timer ved 4 °C med to bufferskift. Etter dialyse klares løsningen ved sentrifugering ved 30 000 g i 30 minutter ved 4 °C. Supernatanten beholdes og settes på en 8-ml monoQ (Amersham Biosciences) ionebytterkolonne og elueres med en lineær gradient av natriumklorid (0-1,0 M). Fraksjoner som inneholdt det refoldede IL-6, ble identifisert ved SDS-PAGE og så samlet og dialysert i 25 mM natriumfosfat, 100 nM natriumklorid, 0,01 % (vekt/volum) NaN_3, pH 6,5.

Fab'-fragmentet av CA030_00240.g1 ble generert, renset og formulert i 25 mM natriumfosfat, 100 mM NaCl, 0,01 % (vekt/volum) NaN_3, pH 6,5. 1:1-kompleksene mellom IL-6 og Fab'-fragmentet til CA030_00240.g1 ble fremstilt for NMR-analyse ved å blande ekvimolare mengder av proteinene ved en konsentrasjon på omtrent 0,2-0,6 mM.

NMR-spektroskopi:

NMR-eksperimentene ble utført på 0,35 ml prøver av proteinene, og kompleksene i 25 mM natriumfosfat, 100 mM natriumklorid og 0,01 % (vekt/volum) natriumazidbuffer ved pH 6,5 (95 % H_2O og 5 % D_2O). 1:1-komplekset mellom $^{15}N/^{13}C/^{2}H$-merket IL-6, og det umerkede Fab'-fragmentet av CA030_00240.g1 ble opparbeidet for NMR analyse ved å blande ekvimolare mengder av proteinene for å oppnå en sluttkonsentrasjon på 0,1 mM. NMR-dataene ble samlet ved 25 °C for fritt IL-6 og for IL-6:Fab'-fragmentet av CA030_00240.g1-kompleks på en 800 mHz Bruker Avance-spektrometer utstyrt med en trippelresonans ($^{15}N/^{13}C/^{1}H$)-kryoprobe. Standard HNCACB, CBCA(CO)NH- og HNCO-spektre (Wittekind, M. og Mueller, L. (1993) J Magn Reson, Series B 101(2), 201, Grzesiek, S., og Bax, A. (1993) J Biomol NMR 3(2), 185-204, Muhandiram, D.R., og Kay, L.E. (1994) J Magn Reson, Series B 103(3), 203, Grzesiek, S., og Bax, A. (1992) J Magn Reson 96(2), 432) ble anvendt for å lage komplett sekvensspesifikke ryggradsresonanstildelinger (^{15}N, ^{13}C og ^{1}H) for fritt IL-6 ved anvendelse av en 0,9 mM uniformt $^{15}N/^{13}C$- merket prøve.

Forandringer i posisjonene til IL-6-ryggradsignalene som ble indusert ved binding av Fab'-fragment av CA030_00240.g1 ble detektert ved anvendelse av et 3D TROSY-HNCO-

spekter (Salzmann, M. et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(23), 13585-13590). Typisk tilegnede parametere for alle 3D NMR-eksperimentene er tilveiebrakt i tabell 1.

Alle spektrene ble prosessert ved anvendelse av NMRPipe (Delaglio, F. et al. (1995) J Biomol NMR 6(3), 277-293) med lineær prediksjon anvendt for å forlengde den effektive tilegningstiden i ^{15}N-dimensjonen av 3D-dataene til omtrent 30 ms. Mild oppløsnings-forhøyelse ble anvendt i alle dimensjonene ved anvendelse av en forskjøvet sinus-kvadratfunksjon. Analyse av spektrene ble utført ved anvendelse av Sparky (Goddard, T. D. og Kneller, D. G. SPARKY 3. In., University of California, San Francisco).

Analyse av Fab-bindingsdata:

Den minimale skifttilnærmingen (Farmer, B. T. et al. (1996) Nat Struct Mol Biol 3(12), 995, Muskett, F. W. et al. (1998) J. Biol. Chem. 273(34), 21743) ble anvendt for å bestemme forandringene i posisjonene til IL-6 NMR-signalene som resulterte fra Fab'-fragment ved CA030_00240.g1-binding. Initielt ble alle toppene i 3D HNCO-spektret av fritt IL-6 og 3D TROSY-HNCO-spektret til IL-6 som var bundet til g132E09 Fab funnet i deres sentre. De kjemiske ^{15}N og ^{1}H skiftverdiene til ryggradsresonansene ble korrigert for differensen i temperatur mellom spektre av komplekset og fritt protein (-0,8 ppm for ^{15}N og -0,05 ppm for ^{1}H) (Baxter, N. J. og Williamson, M.P. (1997) J Biomol NMR9(4), 359-369). Den minste forandring i posisjon for topper mellom fritt og Fab-bundet IL-6 ble tilveiebrakt ved å anvende Microsoft Excel for å beregne den kombinerte, kjemiske skift-differanse i ^{15}N, ^{13}C og ^{1}H for hver tildelte topp i HNCO-spektret av det frie protein, sammenlignet med alle observerte topper i TROSY-HNCO-spektret av Fab-komplekset. De kombinerte, kjemiske skift-differensene ($\Delta\delta$) for amidproton, nitrogen og karbon ble definert ifølge den følgende ligningen (ligning 1), hvor $\Delta\delta_{HN}$, $\Delta\delta_N$ og $\Delta\delta_C$ korresponderer til differensene i ^{1}H, ^{15}N og ^{13}C skift mellom par av sammenlignede HNCO-topper og α_N og α_C er skaleringsfaktorer på 0,2 og 0,33 som er krevd for å ta hensyn til differenser i området for kjemiske skift til amidprotonet, amidnitrogenet og karbonet. For hver individuelle HNCO-topp ble det minimale skift som var indusert ved Fab-binding tatt som den lavest mulige, kombinerte skiftverdien ($\Delta\delta$).

$$\Delta\delta = \sqrt{(\Delta\delta_{HN})^2 + (\Delta\delta_N \cdot \alpha_N)^2 + (\Delta\delta_C \cdot \alpha_C)^2} \qquad \text{(ligning 1)}$$

For å identifisere Fab-bindingssetene (epitoper) på IL-6, ble et histogram med kombinerte, minimale skift versus proteinsekvens anvendt for å avsløre regioner av IL-6 som inneholder signifikant forstyrrede signaler. Dersom størrelsen av den kombinerte, kjemiske skiftforandringen for individuelle aminosyrer overskred en grenseverdi for middelverdien til den kombinerte, kjemiske skiftforandringen for alle aminosyrene pluss ett standardavvik fra middelverdien, ble disse restene valgt for ytterligere evaluering som mulige kontakt-rester i Fab-bindingssetet. Lokaliseringen av kandidat-bindingssete-rester

ble til slutt undersøkt på høyoppløsningsstrukturen av IL-6 (Xu, G. Y. et al., (1997) J. Mol. Biol. 268(2), 468-481), og bare rester som var posisjonert på proteinoverflaten ble ansett å være tilgjengelig for Fab-binding.

To forskjellige grenseverdier ble anvendt for å identifisere rester som var bundet av Fab, det gjennomsnittlige, minimale skiftet + 1SD (0,143) og det gjennomsnittlige, minimale skiftet +2SD (0,213). Bindingssetet til antistoffet ble funnet å omfatte det kritiske setet 3 signatur-resten av Trp157 (Boulanger et al. 2003, Science, 300, 2101-2104). Ved anvendelse av aminosyre-nummereringen som anvendes i Boulanger et al. ovenfor, ble antistoffet 240.g1 funnet å binde minst de følgende restene (gjennomsnitt +2D (0,213)) S47, C50, E93, R104, F105, E106, T149, K150, A153, Q156, Q159 og S169. Antistoffet kan binde alle de følgende restene (gjennomsnitt + 1SD (0,143)) C44, S47, C50, S53, A58, E93, V96, R104, F105, E106, T149, K150, Q152, A153, Q154, N155, Q156, W157, Q159, T163, L165, S169 og E172.

Det vil være anerkjent at de samme restene også kan nummereres basert på aminosyre-nummereringen til den ikke-prosesserte forløperen til IL-6 (Swiss Prot aksesjonsnummer P05231). Ved anvendelse av denne nummereringen binder antistoffet 240.g1 til minst de følgende restene S75, C78, E121, R132, F133, E134, T177, K178, A181, Q182, Q187 og S197. Antistoffet kan binde alle de følgende restene C72, S75, C78, S81, A86, E121, V124, R132, F133, E134, T177, K178, Q180, A181, Q182, N183, Q184, W185, Q187, T191, L193, S197 og E200.

Tabell 1: Basiske parametere til NMR-eksperimenter

Eksperiment	Indirekte dimensjon	Sveipevidde [ppm]	Bærerforskyvning [ppm]	Oppsamlingstid [ms]
HNCACB og CBCA(CO)NH	^{15}N (*F2*)	35	117,5	23,4
	^{13}C (*F1*)	70	44,7	9,6 (6,6)
HNCO	^{15}N (*F2*)	35	117,5	23
	^{13}C (*F1*)	12	177,5	17,7
TROSY-HNCO	^{15}N (*F2*)	35	117,5	17,6
	^{13}C (*F1*)	14	177,5	17,6

Den direkte ^{1}H-dimensjonen (*F3* eller *F2*) ble oppnadd med en sveipevidde på 14 ppm og oppsamlingstid på 85 ms.

P a t e n t k r a v

1. Nøytraliserende antistoff som har spesifisitet for humant IL-6, k a r a k t e r i s e r t v e d at det har en tung kjede som omfatter sekvensen gH13 som er gitt i SEKV. ID. NR.: 11 og en lett kjede som omfatter sekvensen gL10 som er gitt i SEKV. ID. NR.: 13.

2. Nøytraliserende antistoff som har spesifisitet for humant IL-6 i henhold til krav 1, som har en tung kjede som omfatter sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 16 og en lett kjede som omfatter sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 18.

3. Isolert DNA-sekvens, k a r a k t e r i s e r t v e d at den koder for de(n) tunge og lette kjeden(e) til et antistoff I henhold til krav 1 eller 2.

4. Isolert DNA-sekvens i henhold til krav 3, hvor DNA-sekvensen som koder for den tunge kjeden omfatter sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 12 eller SEKV. ID. NR.: 15 eller nukleotidene 58-2008 ifølge SEKV. ID. NR.: 15.

5. Isolert DNA-sekvens i henhold til krav 4, hvor DNA-sekvensen som koder for den lette kjeden omfatter sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 14 eller SEKV. ID. NR.: 17 eller nukleotidene 61-705 ifølge SEKV. ID. NR.: 17.

6. Klonings- eller ekspresjonsvektor, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter én eller flere DNA-sekvenser ifølge et hvilket som helst av kravene 3-5.

7. Vektor i henhold til krav 6, hvor vektoren omfatter sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 15 og sekvensen som er gitt i SEKV. ID. NR.: 17.

8. Vertscelle for ekspresjon av et antistoff i henhold til krav 1 eller krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter:

i) en DNA-sekvens som koder for den tunge kjeden til nevnte antistoff, og

ii) en DNA-sekvens som koder for den lette kjeden til nevnte antistoff

hvor DNA-sekvensene er tilveiebrakt i en eller flere klonings- eller ekspresjonsvektorer.

9. Vertscelle i henhold til krav 8, som omfatter en eller flere klonings- eller ekspresjonsvektorer i henhold til krav 6 eller krav 7.

10. Vertscelle i henhold til krav 8, hvor DNA-sekvensen som koder for den tunge kjeden, omfatter sekvensen som er gitt i SEKV ID Nr.: 12 eller SEKV ID Nr.: 15 eller nukleotidene 58-2008 i SEKV ID Nr.: 15.

11. Vertscelle i henhold til krav 10, hvor DNA-sekvensen som koder for den lette kjeden, omfatter sekvensen som er gitt i SEKV ID Nr.: 14 eller SEKV ID Nr.: 17 eller nukleotidene 61-705 i SEKV ID Nr.: 17.

12. Fremgangsmåte for fremstilling av et antistoff, som har bindingsspesifisitet for humant IL-6, som omfatter å dyrke vertscellen ifølge krav 8 til 11 og å isolere antistoffet.

13. Farmasøytisk sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et antistoff i henhold til krav 1 eller krav 2 i kombinasjon med én eller flere av et farmasøytisk akseptabelt hjelpestoff, fortynningsmiddel eller bærer.

14. Farmasøytisk sammensetning i henhold til krav 13, hvor det i tillegg omfatter andre aktive ingredienser.

15. Antistoffet ifølge krav 1 eller krav 2 eller den farmasøytiske sammensetningen ifølge krav 13 eller krav 14 for bruk i terapi.

16. Antistoff i henhold til krav 1 eller krav 2 eller en farmasøytisk sammensetning i henhold til krav 13 eller 14, for anvendelse i behandling eller profylakse av en patologisk lidelse valgt fra gruppen bestående av infeksjoner (virus, bakterier, sopp og parasitt), endotoksisk sjokk assosiert med infeksjon, artritt, reumatoid artritt, psoriatisk artritt, systemisk barnereumatisme, (JIA), systemisk lupus erytemotosus (SLE), astma, bekkenbetennelsessykdom, Alzheimers sykdom, Crohns sykdom, ulcerøs kolitt, irritabelt tarmsyndrom, Castlemans sykdom, ankyloserende spondylitt, dermatomyositt, uveitt, Peyronis sykdom, søliaki, galleblæresykdom, Pilonidal sykdom, peritonitt, psoriasis, vaskulitt, kirurgiske vedheft, slag, diabetes type I, Lyme artritt, meningoencefalitt, immunmedierte betennelsesforstyrrelser i det sentrale og perifere nervesystemet, slik som multippel sklerose og Guillain-Barr-syndrom, andre autoimmune forstyrrelser, pankreatitt, traumer (kirurgi), transplantat-mot-vertsreaksjon, transplantatavstøtning, kreft (både faste tumorer, slik som melanom, hepatoblastom, sarkom, plateepitel-karsinom, overgangs-cellekreft, ovariekreft og hematologiske maligniteter og spesielt akutt myelogen leukemi, kronisk myelogen leukemi, magekreft og kolonkreft), hjertesykdom, inkludert iskemiske sykdommer, slik som myokardisk infarkt, så vel som aterosklerose, intravaskulær

koagulering, benresorpsjon, brannskade pasienter, osteoporose, periodontitt og hypoklorhydia.

17. Antistoffet eller den farmasøytisk sammensetning i henhold til krav 16 for nevnte anvendelse, hvor den patologiske lidelsen er valgt fra gruppen bestående av artritt, revmatoid artritt, psoriasisartritt, systemisk barnereumatisme, (JIA), systemisk lupus erytemotosus (SLE), astma, Crohns sykdom, ulcerøs kolitt, Castlemans sykdom, ankyloserende spondylitt og kreft.

18. Antistoffet eller den farmasøytisk sammensetningen i henhold til krav 16, hvor den patologiske forstyrrelsen er revmatoid artritt.

Sekvensliste

<110> UCB S.A.
gelinas, richard
popplewell, andrew
adams, ralph
singhal, mitra
zhang, yi

<120> Antibody molecules having specificity for human IL-6

<130> A0018

<160> 22

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 357
<212> DNA
<313> Rattus rattus

<400> 1
gaggtgcaaa ttttggagac tggaggaggc ttggtgaagc ccggtggttc cctgagactg 60

tcttgtgcaa cgtctggatt caacttcaat gattatttca tgaactgggt ccgtcaggct 120

ccagggaagg gactagagtg gcttgctcaa atgagaaaca aaaattatca atatggcaca 180

tattatgcgg agtctttgga aggcagagtc acagtctcac gagacgatgc caaaaacagt 240

gtctacctgc aagtgagcag tttaagagct gaggacacgg ccatttatta ctgtacaaga 300

gagtcatact acggctttac ctcctactgg ggccaaggag tcatggtcac agtctcg 357

<210> 2
<211> 120
<212> PRT
<213> Rattus rattus

<400> 2

Glu Val Gln Ile Leu Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Gln Met Arg Asn Lys Asn Tyr Gln Tyr Gly Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Leu Glu Gly Arg Val Thr Val Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Val Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Glu Ser Tyr Tyr Gly Phe Thr Ser Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
<211> 321
<212> DNA
<213> Rattus rattus

<400> 3
gacatccaga tgacacagtc tcctgcctcc ctgtctgcat ctctggaaga aattgtcacc 60

atcacatgcc aggcaagcca ggacattggt atttctttat catggtatca gcagaaacca 120

gggaggactc ctcagctcct gatccaaaat gcaaacaact tggcagatgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gccgtagatt tggcacacag ttttctctta cgatcagtac accacaggtt 240

gaagatactg gagtctatta ctgtctccag cataatagtg ctccgtacac gtttggaact 300

gggacccagc tggaaatcaa a 321

<210> 4
<211> 108
<212> PRT
<213> Rattus rattus

<400> 4

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

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

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

Gln Asn Ala Asn Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Arg Arg Phe Gly Thr Gln Phe Ser Leu Thr Ile Ser Thr Pro Gln Val
65 70 75 80

Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Ala Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Thr Gly Thr Gln Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Rattus rattus

<400> 5

Gly Phe Asn Phe Asn Asp Tyr Phe Met Asn
1 5 10

<210> 6
<211> 19
<212> PRT
<213> Rattus rattus

<400> 6

Gln Met Arg Asn Lys Asn Tyr Gln Tyr Gly Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Leu Glu Gly

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Rattus rattus

<400> 7

Glu Ser Tyr Tyr Gly Phe Thr Ser Tyr
1 5

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> Rattus rattus

<400> 8

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ile Ser Leu Ser
1 5 10

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Rattus rattus

<400> 9

Asn Ala Asn Asn Leu Ala Asp
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Rattus rattus

<400> 10

Leu Gln His Asn Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

<210> 11
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> gH13

<400> 11

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

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

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

Ala Gln Met Arg Asn Lys Asn Tyr Gln Tyr Gly Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Tyr Tyr Gly Phe Thr Ser Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12
<211> 360
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> gH13

<400> 12
gaagtccagc tcgttgagag tggcggtggc ctggtccagc ccggtggatc actccgactg 60

tcctgcgctg caagcgggtt taattttaat gattacttca tgaactgggt tcggcaggca 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtggctcag atgaggaaca agaattatca gtacgggaca 180

tactatgccg agagtctgga gggaaggttc accatctcca gggacgattc taagaacagc 240

ctctaccttc agatgaactc tttgaaaacc gaggacacag ccgtgtacta ttgtgctaga 300

gaaagttatt acgggttcac atcttattgg ggacagggaa ccctggtgac tgtctcgagc 360

<210> 13
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> gL10

<400> 13

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

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

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

Tyr Asn Ala Asn Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Ala Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 14
<211> 324
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> gL10

<400> 14
gatatccaga tgactcaatc acccagttcc ctgagcgcct ctgtcggcga cagggtgacc 60

atcacatgcc aggcctctca agacattggc atcagcctgt cctggtacca gcaaaaaccc 120

ggcaaggccc ctaagctcct gatctacaat gctaacaacc tggccgatgg cgtgcctagt 180

aggtttagcg ggtctggttc cggaacagat ttcacactca ccatcagctc actgcagccc 240

gaggacttcg ccacttacta ttgcctgcag cacaacagcg ccccctacac cttcggacaa 300

ggcactaaac tggagatcaa gcgt 324

<210> 15
<211> 2008
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> 240g1 heavy chain

<400> 15
atggagtgga gctgggtgtt tttgttcttc ctgtccgtga ccacaggcgt gcactctgaa 60

gtccagctcg ttgagagtgg cggtggcctg gtccagcccg gtggatcact ccgactgtcc 120

tgcgctgcaa gcgggtttaa ttttaatgat tacttcatga actgggttcg gcaggcacct 180

ggcaaaggcc tggaatgggt ggctcagatg aggaacaaga attatcagta cgggacatac 240

tatgccgaga gtctggaggg aaggttcacc atctccaggg acgattctaa gaacagcctc 300

taccttcaga tgaactcttt gaaaaccgag gacacagccg tgtactattg tgctagagaa 360

agttattacg ggttcacatc ttattgggga cagggaaccc tggtgactgt ctcgagcgct 420

tctacaaagg gcccatccgt cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 480

acagccgccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540

aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 600

ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac gaagacctac 660

acctgcaacg tagatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagagagt tggtgagagg 720

ccagcacagg gagggagggt gtctgctgga agccaggctc agcgctcctg cctggacgca 780

ccccggctgt gcagccccag cccagggcag caaggcatgc cccatctgtc tcctcacccg 840

gaggcctctg accacccccac tcatgcccag ggagagggtc ttctggattt ttccaccagg 900

ctccgggcag ccacaggctg gatgccccta ccccaggccc tgcgcataca ggggcaggtg 960

ctgcgctcag acctgccaag agccatatcc gggaggaccc tgccccctgac ctaagcccac 1020

cccaaaggcc aaactctcca ctccctcagc tcagacacct tctctcctcc cagatctgag 1080

taactcccaa tcttctctct gcagagtcca aatatggtcc cccatgccca ccatgcccag 1140

gtaagccaac ccaggcctcg ccctccagct caaggcgggа caggtgccct agagtagcct 1200

gcatccaggg acaggccccа gccgggtgct gacgcatcca cctccatctc ttcctcagca 1260

cctgagttcc tgggggggacc atcagtcttc ctgttccccc caaaacccaa ggacactctc 1320

atgatctccc ggacccctga ggtcacgtgc gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc 1380

gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 1440

cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 1500

gactggctga acggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc 1560

atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggt gggacccacg gggtgcgagg gccacatgga 1620

cagaggtcag ctcggcccac cctctgccct gggagtgacc gctgtgccaa cctctgtccc 1680

tacagggcag ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc ccatcccagg aggagatgac 1740

caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccccagcg acatcgccgt 1800

ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga 1860

ctccgacggc tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga 1920

ggggaatgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa 1980

gagcctctcc ctgtctctgg gtaaatga 2008

<210> 16
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 240g1 heavy chain

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

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

Ala Gln Met Arg Asn Lys Asn Tyr Gln Tyr Gly Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Tyr Tyr Gly Phe Thr Ser Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 17
<211> 705
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> 240g1 light chain

<400> 17
atgagcgtgc ctacccaggt cctcggcctg ttgctgctct ggctgaccga tgcccgctgc 60

gatatccaga tgactcaatc acccagttcc ctgagcgcct ctgtcggcga cagggtgacc 120

atcacatgcc aggcctctca agacattggc atcagcctgt cctggtacca gcaaaaaccc 180

ggcaaggccc ctaagctcct gatctacaat gctaacaacc tggccgatgg cgtgcctagt 240

aggtttagcg ggtctggttc cggaacagat ttcacactca ccatcagctc actgcagccc 300

gaggactttg ccacttacta ttgcctgcag cacaacagcg ccccctacac cttcggacaa 360

ggcactaaac tggagatcaa gcgtacggta gcggccccat ctgtcttcat cttcccgcca 420

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480

cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 705

<210> 18
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 240g1 light chain

<400> 18

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

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

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

Tyr Asn Ala Asn Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Ala Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 19
<211> 100
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp His
20 25 30

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

Gly Arg Thr Arg Asn Lys Ala Asn Ser Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
50 55 60

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg
100

<210> 20
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

<210> 21
<211> 88
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
85

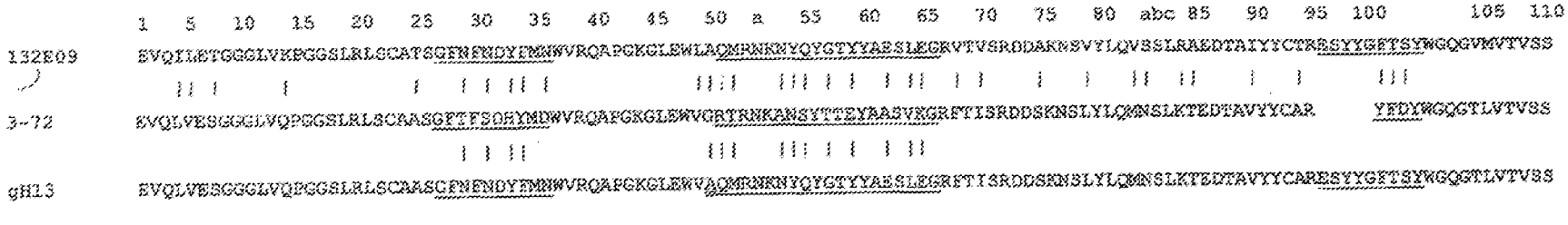
<210> 22
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

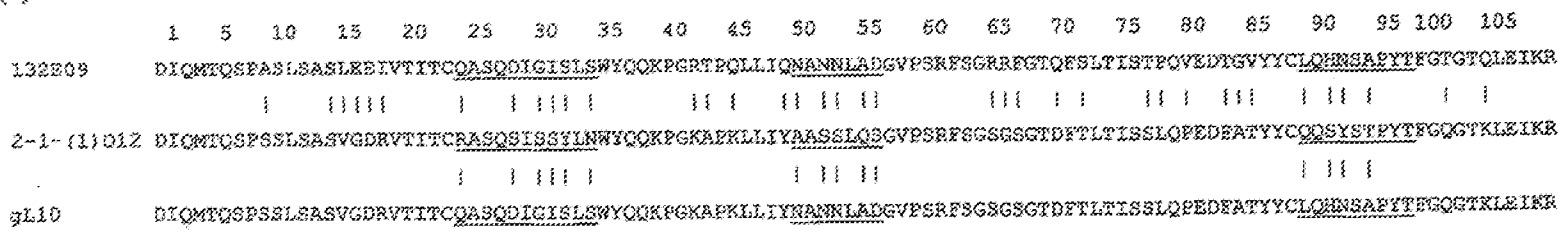
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

Figur 1

(a)


1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 a 55 60 65 70 75 80 abc 85 90 95 100 105 110
132E09 EVQLLETGGGLVKPGGSLRLSCATSGFNFNDYIMNWVRQAPGKGLEWLAQMRNKNYQYGTYYAESLEGKVTVSRDDAKNSVYLQVSSLRAEDTAIYYCTRRSYYGFTSYWGQGVMVTVSS
3-72 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMDWVRQAPGKGLEWVGRTRNKANSYTTEYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR YFDYWGQGTLVTVSS
gH13 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFNDYIMNWVRQAPGKGLEWVAQMRNKNYQYGTYYAESLEGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARESYYGFTSYWGQGTLVTVSS

(b)


1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105
132E09 DIQMTQSPASLSASLEEIVTITCQASQDIGISLSWYQQKPGRTPQLLIQNANNLADGVPSRFSGRRFGTQFSLTISTFQVEDIGVYYCLQHMSAPYTFGTGTQLEIKR
2-1-(1)D1Z DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKLEIKR
gL10 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIGISLSWYQQKPGKAPKLLIYNANNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSAPYTFGQGTKLEIKR

Figur 2

(a) Translatert sekvens 240.g1-tungkjede som viser intron/ekson-grenser

```
          10          20          30          40          50
ATG GAG TGG AGC TGG GTG TTT TTG TTC TTC CTG TCC GTG ACC ACA GGC GTG CAC TCT
TAC CTC ACC TCG ACC CAC AAA AAC AAG AAG GAC AGG CAC TGG TGT CCG CAC GTG AGA
 M   E   W   S   W   V   F   L   F   F   L   S   V   T   T   G   V   H   S>

 60          70          80          90          100         110
GAA GTC CAG CTC GTT GAG AGT GGC GGT GGC CTG GTC CAG CCC GGT GGA TCA CTC CGA
CTT CAG GTC GAG CAA CTC TCA CCG CCA CCG GAC CAG GTC GGG CCA CCT AGT GAG GCT
 E   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   L   V   Q   P   G   G   S   L   R>

    120         130         140         150         160         170
CTG TCC TGC GCT GCA AGC GGG TTT AAT TTT AAT GAT TAC TTC ATG AAC TGG GTT CGG
GAC AGG ACG CGA CGT TCG CCC AAA TTA AAA TTA CTA ATG AAG TAC TTG ACC CAA GCC
 L   S   C   A   A   S   G   F   N   F   N   D   Y   F   M   N   W   V   R>

        180         190         200         210         220
CAG GCA CCT GGC AAA GGC CTG GAA TGG GTG GCT CAG ATG AGG AAC AAG AAT TAT CAG
GTC CGT GGA CCG TTT CCG GAC CTT ACC CAC CGA GTC TAC TCC TTG TTC TTA ATA GTC
 Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   Q   M   R   N   K   N   Y   Q>

230         240         250         260         270         280
TAC GGG ACA TAC TAT GCC GAG AGT CTG GAG GGA AGG TTC ACC ATC TCC AGG GAC GAT
ATG CCC TGT ATG ATA CGG CTC TCA GAC CTC CCT TCC AAG TGG TAG AGG TCC CTG CTA
 Y   G   T   Y   Y   A   E   S   L   E   G   R   F   T   I   S   R   D   D>

   290         300         310         320         330         340
TCT AAG AAC AGC CTC TAC CTT CAG ATG AAC TCT TTG AAA ACC GAG GAC ACA GCC GTG
AGA TTC TTG TCG GAG ATG GAA GTC TAC TTG AGA AAC TTT TGG CTC CTG TGT CGG CAC
 S   K   N   S   L   Y   L   Q   M   N   S   L   K   T   E   D   T   A   V>

        350         360         370         380         390
TAC TAT TGT GCT AGA GAA AGT TAT TAC GGG TTC ACA TCT TAT TGG GGA CAG GGA ACC
ATG ATA ACA CGA TCT CTT TCA ATA ATG CCC AAG TGT AGA ATA ACC CCT GTC CCT TGG
 Y   Y   C   A   R   E   S   Y   Y   G   F   T   S   Y   W   G   Q   G   T>

400         410         420         430         440         450
CTG GTG ACT GTC TCG AGC GCT TCT ACA AAG GGC CCA TCC GTC TTC CCC CTG GCG CCC
GAC CAC TGA CAG AGC TCG CGA AGA TGT TTC CCG GGT AGG CAG AAG GGG GAC CGC GGG
 L   V   T   V   S   S   A   S   T   K   G   P   S   V   F   P   L   A   P>

   460         470         480         490         500         510
TGC TCC AGG AGC ACC TCC GAG AGC ACA GCC GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC
ACG AGG TCC TCG TGG AGG CTC TCG TGT CGG CGG GAC CCG ACG GAC CAG TTC CTG ATG
 C   S   R   S   T   S   E   S   T   A   A   L   G   C   L   V   K   D   Y>

        520         530         540         550         560         570
```

```
TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC
AAG GGG CTT GGC CAC TGC CAC AGC ACC TTG AGT CCG CGG GAC TGG TCG CCG CAC GTG
 F   P   E   P   V   T   V   S   W   N   S   G   A   L   T   S   G   V   H>

          580         590         600         610         620
ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC
TGG AAG GGC CGA CAG GAT GTC AGG AGT CCT GAG ATG AGG GAG TCG TCG CAC CAC TGG
 T   F   P   A   V   L   Q   S   S   G   L   Y   S   L   S   S   V   V   T>

630         640         650         660         670         680
GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACG AAG ACC TAC ACC TGC AAC GTA GAT CAC AAG CCC
CAC GGG AGG TCG TCG AAC CCG TGC TTC TGG ATG TGG ACG TTG CAT CTA GTG TTC GGG
 V   P   S   S   S   L   G   T   K   T   Y   T   C   N   V   D   H   K   P>

    690         700         710         720         730         740         750
AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AGA GTT G GTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGGA
TCG TTG TGG TTC CAC CTG TTC TCT CAA C CACTCTCCCGGTCGTGTCCCTCCCTCCCACAGACGACCT
 S   N   T   K   V   D   K   R   V>

       760         770         780         790         800         810         820
AGCCAGGCTCAGCCCTCCTGCCTGGACGCACCCCGGCTGTGCAGCCCCAGCCCAGGGCAGCAAGGCATGCCCCAT
TCGGTCCGAGTCGGGAGGACGGACCTGCGTGGGGCCGACACGTCGGGGTCGGGTCCCGTCGTTCCGTACGGGGTA

  830         840         850         860         870         880         890         900
CTGTCTCCTCACCCGGAGGCCTCTGACCACCCCACTCATGCCCAGGGAGAGGGTCTTCTGGATTTTTCCACCAGG
GACAGAGGAGTGGGCCTCCGGAGACTGGTGGGGTGAGTACGGGTCCCTCTCCCCAGAAGACCTAAAAAGGTGGTCC

       910         920         930         940         950         960         970
CTCCGGGCAGCCACAGGCTGGATGCCCCTACCCCAGGCCCTGCGCATACAGGGGCAGGTGCTGCGCTCAGACCTG
GAGGCCCGTCGGTGTCCGACCTACGGGGATGGGGTCCGGGACGCGTATGTCCCCGTCCACGACGCGAGTCTGGAC

  980         990        1000        1010        1020        1030        1040        1050
CCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCCTGCCCCTGACCTAAGCCCACCCCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGC
GGTTCTCGGTATAGGCCCTCCTGGGACGGGGACTGGATTCGGGTGGGGTTTCCGGTTTGAGAGGTGAGGGAGTCG

      1060        1070        1080        1090        1100        1110
TCAGACACCTTCTCTCCTCCCAGATCTGAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAG AG TCC AAA TAT GGT
AGTCTGTGGAAGAGAGGAGGGTCTAGACTCATTGAGGGTTAGAAGAGAGACGTC TC AGG TTT ATA CCA
                                                      R   S   K   Y   G>

1120        1130        1140
  CCC CCA TGC CCA CCA TGC CCA G
  GGG GGT ACG GGT GGT ACG GGT C
   P   P   C   P   P   C   P>

      1150        1160        1170        1180        1190        1200
  GTAAGCCAACCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCT
  CATTCGGTTGGGTCCGGAGCGGGAGGTCGAGTTCCGCCCTGTCCACGGGATCTCATCGGA

      1210        1220        1230        1240        1250
  GCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACGCATCCACCTCCATCTCTTCCTCAG CA CCT GAG TTC
```

```
CGTAGGTCCCTGTCCGGGGTCGGCCCACGACTGCGTAGGTGGAGGTAGAGAAGGAGTC GT GGA CTC AAG
                                                          A  P  S  F>

1270         1280         1290         1300         1310         1320
CTG GGG GGA CCA TCA GTC TTC CTG TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACT CTC ATG ATC
GAC CCC CCT GGT AGT CAG AAG GAC AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGA GAG TAC TAG
 L  G  G  P  S  V  F  L  F  P  P  K  P  K  D  T  L  M  I>

 1330         1340         1350         1360         1370         1380
TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACG TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAG GAA GAC CCC GAG
AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGC ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTC CTT CTG GGG CTC
 S  R  T  P  E  V  T  C  V  V  V  D  V  S  Q  E  D  P  E>

     1390         1400         1410         1420         1430         1440
GTC CAG TTC AAC TGG TAC GTG GAT GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG
CAG GTC AAG TTG ACC ATG CAC CTA CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT TTC GGC
 V  Q  F  N  W  Y  V  D  G  V  E  V  H  N  A  K  T  K  P>

         1450         1460         1470         1480         1490
CGG GAG GAG CAG TTC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC
GCC CTC CTC GTC AAG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG
 R  E  E  Q  F  N  S  T  Y  R  V  V  S  V  L  T  V  L  H>

1500         1510         1520         1530         1540         1550
CAG GAC TGG CTG AAC GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCG
GTC CTG ACC GAC TTG CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CCG GAG GGC
 Q  D  W  L  N  G  K  E  Y  K  C  K  V  S  N  K  G  L  P>

   1560         1570         1580                    ↓
TCC TCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA G
AGG AGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT C
 S  S  I  E  K  T  I  S  K  A  K>

1590      1600      1610      1620      1630      1640      1650
GTGGGACCCACGGGGTGCGAGGGCCACATGGACAGAGGTCAGCTCGGCCCACCCTCTGCCCT
CACCCTGGGTGCCCCACGCTCCCGGTGTACCTGTCTCCAGTCGAGCCGGGTGGGAGACGGGA

      1660      1670      1680      ↓ 1690         1700         1710
GGGAGTGACCGCTGTGCCAACCTCTGTCCCTACAG GG CAG CCC CGA GAG CCA CAG GTG TAC ACC
CCCTCACTGGCGACACGGTTGGAGACAGGGATGTC CC GTC GGG GCT CTC GGT GTC CAC ATG TGG
                                   G  Q  P  R  E  P  Q  V  Y  T>

   1720         1730         1740         1750         1760         1770
CTG CCC CCA TCC CAG GAG GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC
GAC GGG GGT AGG GTC CTC CTC TAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG
 L  P  P  S  Q  E  E  M  T  K  N  Q  V  S  L  T  C  L  V>

       1780         1790         1800         1810         1820
AAA GGC TTC TAC CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG
TTT CCG AAG ATG GGG TCG CTG TAG CGG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC
 K  G  F  Y  P  S  D  I  A  V  E  W  E  S  N  G  Q  P  E>
```

```
1830          1840          1850          1860          1870          1880
 AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC
 TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG
  N   N   Y   K   T   T   P   P   V   L   D   S   D   G   S   F   F   L   Y>

  1890          1900          1910          1920          1930          1940
 AGC AGG CTA ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG GAG GGG AAT GTC TTC TCA TGC TCC
 TCG TCC GAT TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC CTC CCC TTA CAG AAG AGT ACG AGG
  S   R   L   T   V   D   K   S   R   W   Q   E   G   N   V   F   S   C   S>

       1950          1960          1970          1980          1990
 GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACA CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CTG
 CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGT GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GAC
  V   M   H   E   A   L   H   N   H   Y   T   Q   K   S   L   S   L   S   L>

2000
 GGT AAA TGA
 CCA TTT ACT
  G   K   *>
```

(b) Lettkjede

```
              10            20            30            40            50            60
 ATG AGC GTG CCT ACC CAG GTC CTC GGC CTG TTG CTG CTC TGG CTG ACC GAT GCC CGC TGC GAT
 TAC TCG CAC GGA TGG GTC CAG GAG CCG GAC AAC GAC GAG ACC GAC TGG CTA CGG GCG ACG CTA
  M   S   V   P   T   Q   V   L   G   L   L   L   L   W   L   T   D   A   R   C   D>

        70            80            90           100           110           120
 ATC CAG ATG ACT CAA TCA CCC AGT TCC CTG AGC GCC TCT GTC GGC GAC AGG GTG ACC ATC ACA
 TAG GTC TAC TGA GTT AGT GGG TCA AGG GAC TCG CGG AGA CAG CCG CTG TCC CAC TGG TAG TGT
  I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R   V   T   I   T>

   130           140           150           160           170           180
 TGC CAG GCC TCT CAA GAC ATT GGC ATC AGC CTG TCC TGG TAC CAG CAA AAA CCC GGC AAG GCC
 ACG GTC CGG AGA GTT CTG TAA CCG TAG TCG GAC AGG ACC ATG GTC GTT TTT GGG CCG TTC CGG
  C   Q   A   S   Q   D   I   G   I   S   L   S   W   Y   Q   Q   K   P   G   K   A>

190           200           210           220           230           240           250
 CCT AAG CTC CTG ATC TAC AAT GCT AAC AAC CTG GCC GAT GGC GTG CCT AGT AGG TTT AGC GGG
 GGA TTC GAG GAC TAG ATG TTA CGA TTG TTG GAC CGG CTA CCG CAC GGA TCA TCC AAA TCG CCC
  P   K   L   L   I   Y   N   A   N   N   L   A   D   G   V   P   S   R   F   S   G>

        260           270           280           290           300           310
 TCT GGT TCC GGA ACA GAT TTC ACA CTC ACC ATC AGC TCA CTG CAG CCC GAG GAC TTC GCC ACT
 AGA CCA AGG CCT TGT CTA AAG TGT GAG TGG TAG TCG AGT GAC GTC GGG CTC CTG AAG CGG TGA
  S   G   S   G   T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T>

    320           330           340           350           360           370
 TAC TAT TGC CTG CAG CAC AAC AGC GCC CCC TAC ACC TTC GGA CAA GGC ACT AAA CTG GAG ATC
 ATG ATA ACG GAC GTC GTG TTG TCG CGG GGG ATG TGG AAG CCT GTT CCG TGA TTT GAC CTC TAG
```

```
  Y   Y   C   L   Q   H   N   S   A   P   Y   T   F   G   Q   G   T   K   L   E   I>


380         390         400         410         420         430         440
AAG CGT ACG GTA GCG GCC CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT
TTC GCA TGC CAT CGC CGG GGT AGA CAG AAG TAG AAG GGC GGT AGA CTA CTC GTC AAC TTT AGA
 K   R   T   V   A   A   P   S   V   F   I   F   P   P   S   D   E   Q   L   K   S>

        450         460         470         480         490         500
GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG
CCT TGA CGG AGA CAA CAC ACG GAC GAC TTA TTG AAG ATA GGG TCT CTC CGG TTT CAT GTC ACC
 G   T   A   S   V   V   C   L   L   N   N   F   Y   P   R   E   A   K   V   Q   W>

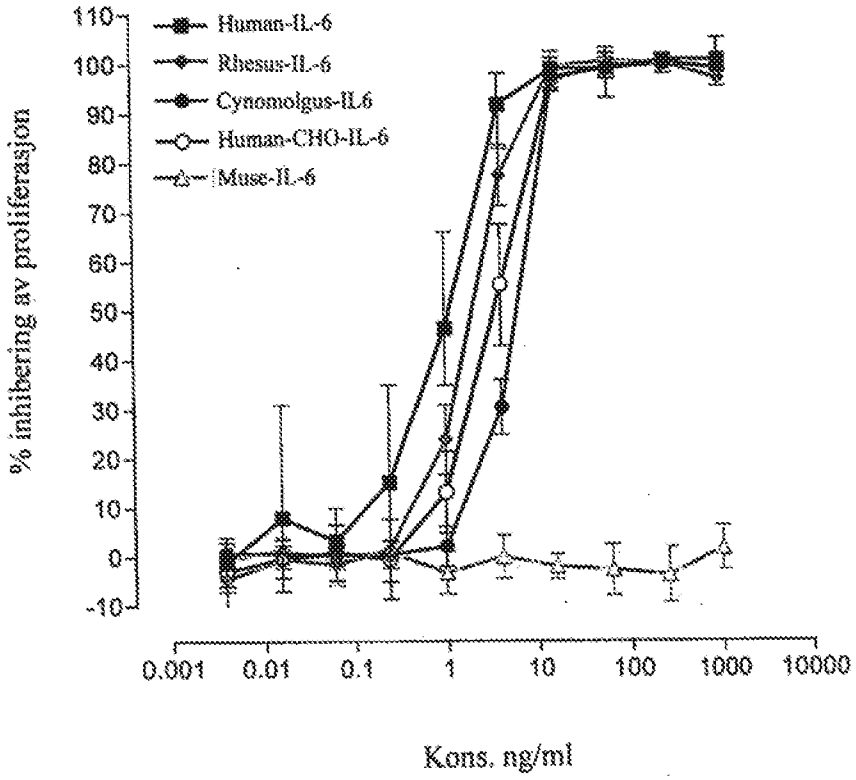
    510         520         530         540         550         560
AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG
TTC CAC CTA TTG CGG GAG GTT AGC CCA TTG AGG GTC CTC TCA CAG TGT CTC GTC CTG TCG TTC
 K   V   D   N   A   L   Q   S   G   N   S   Q   E   S   V   T   E   Q   D   S   K>

570         580         590         600         610         620         630
GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA
CTG TCG TGG ATG TCG GAG TCG TCG TGG GAC TGC GAC TCG TTT CGT CTG ATG CTC TTT GTG TTT
 D   S   T   Y   S   L   S   S   T   L   T   L   S   K   A   D   Y   E   K   H   K>

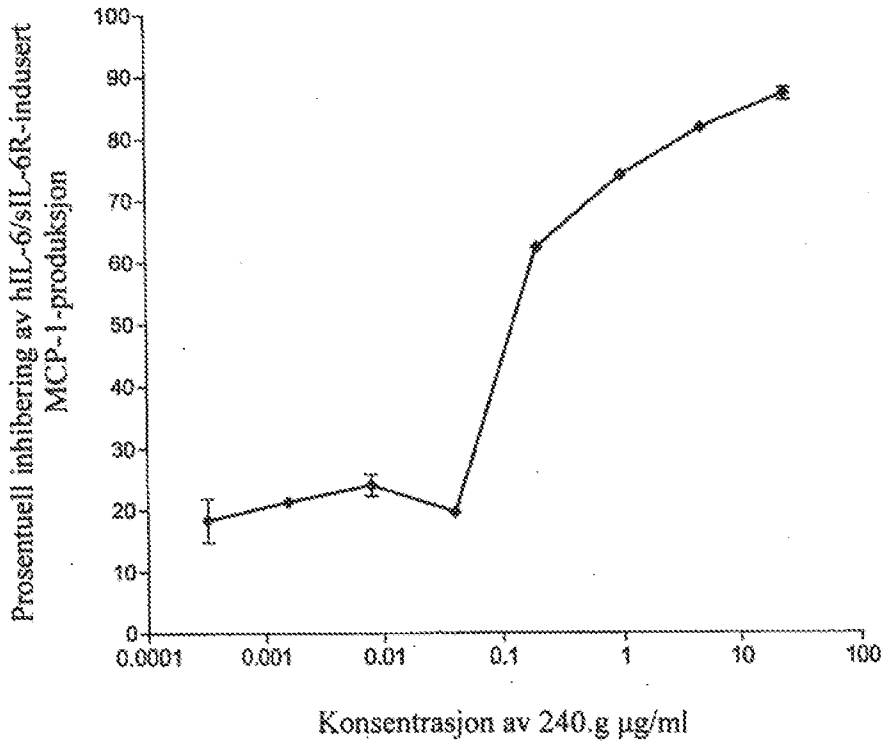
        640         650         660         670         680         690
GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG
CAG ATG CGG ACG CTT CAG TGG GTA GTC CCG GAC TCG AGC GGG CAG TGT TTC TCG AAG TTG TCC
 V   Y   A   C   E   V   T   H   Q   G   L   S   S   P   V   T   K   S   F   N   R>

    700
GGA GAG TGT TAG
CCT CTC ACA ATC
 G   E   C   *>
```

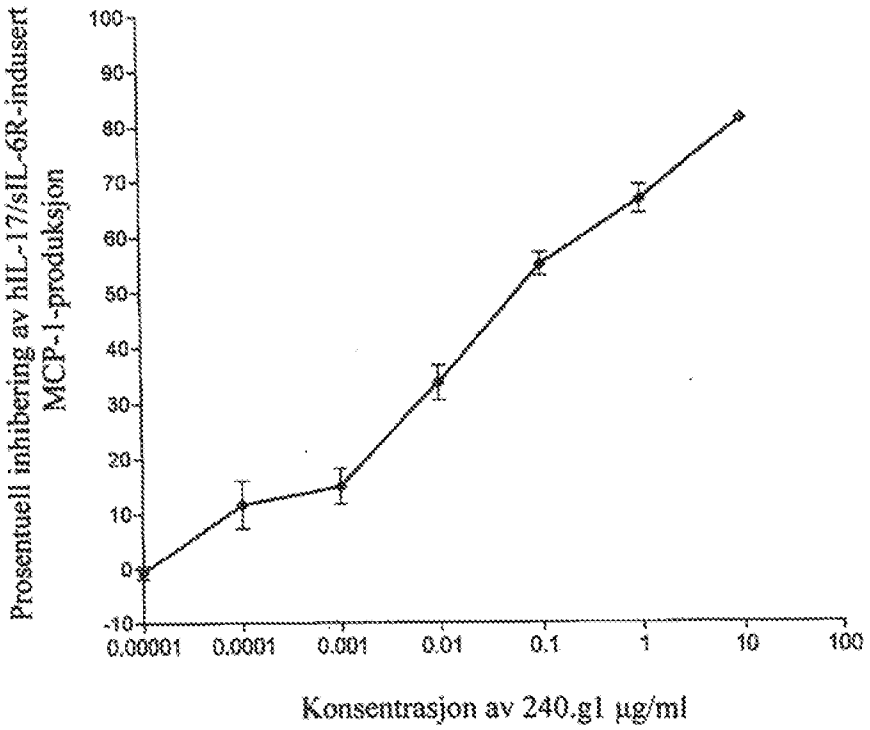
Figur 3a


Human-IL-6
Rhesus-IL-6
Cynomolgus-IL6
Human-CHO-IL-6
Muse-IL-6
% inhibering av proliferasjon
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
Kons. ng/ml

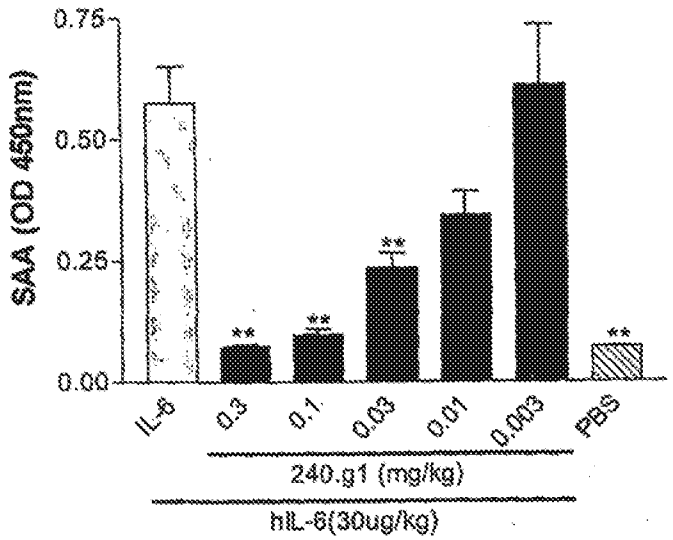
Figur 3b


Prosentuell inhibering av hIL-6/sIL-6R-indusert MCP-1-produksjon
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Konsentrasjon av 240.g µg/ml

Figur 3c


Prosentuell inhibering av hIL-17/sIL-6R-indusert MCP-1-produksjon
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Konsentrasjon av 240.g1 µg/ml

Figur 4


SAA (OD 450nm)
0.75
0.50
0.25
0.00
**
**
**
**
IL-6
0.3
0.1
0.03
0.01
0.003
PBS
240.g1 (mg/kg)
hIL-6(30ug/kg)