

beregnes ut fra absorbansen ved 280 nm ved anvendelse av den beregnede ekstinksjonskoeffisient, basert på aminosyresekvensen.

Proteinene gjenfoldes ved langsom fortynning av prøven med nylagd gjenfoldingsbuffer bestående av 20 mM Tris, pH 8,6, 0,3 M NaCl, 2,5 M urea, 5 mM cystein, 20 mM glycine og 1 mM EDTA. Gjenfoldingsvolumene velges slik at den endelige protein-konsentrasjon er mellom 50 og 100 mikrogram/ml. Gjenfoldingsløsningen omrøres forsiktig ved 4 °C i 12-36 t. Gjenfoldingsreaksjonen stanses ved tilsetning av TFA til en slutt-konsentrasjon på 0,4 % (pH omtrent 3). Før videre rensing av proteinet filtreres løsningen gjennom et 0,22 mikrom filter, og acetonitril tilsettes til en slutt-konsentrasjon på 2-10 %.

Det gjenfoldede protein kromatograferes på en Poros RH/1 revers fase-kolonne ved anvendelse av en mobil buffer med 0,1 % TFA og eluering med en gradient av acetonitril fra 10-80 %. Uttak av fraksjoner som absorberer ved 280 nm analyseres ved SDS-polyakrylamidgelelektroforese, og fraksjoner som inneholder homogent, gjenfoldet protein slås sammen. Generelt elueres korrekt foldet utgave av de fleste proteiner ved den laveste acetonitrilkonsentrasjonen, siden disse molekylene er mest kompakte, med sitt hydrofobe indre beskyttet mot interaksjoner med revers fase-resinet. Aggregererte molekyler elueres vanligvis ved høyere acetonitrilkonsentrasjoner. I tillegg til å fjerne feilfoldede former av proteiner fra den ønskede form vil revers fase-trinnet også fjernet endotoksin fra prøvene.

Fraksjoner som inneholder det foldede ønskede protein eller antistoff slås sammen, og acetonitril fjernes ved anvendelse av en svak nitrogenstrøm rettet mot løsningen. Proteinene formuleres i 20 mM Hepes, pH 6,8 med 0,14 M natriumklorid og 4 % mannitol ved dialyse eller gelfiltrering ved anvendelse av G25 Superfine (Pharmacia) resin ekvilibrert i formuleringsbuffer og sterilt filtrert.

Eksempel 10

Ekspresjon av protein eller antistoff i pattedyrceller

Dette eksempel illustrerer fremstilling av mulig glykosilerte former av det ønskede protein eller antistoff ved rekombinant ekspresjon i pattedyrceller.

Vektoren pRK5 (se EP 307.247, publisert 15. mars 1989) benyttes som ekspresjonsvektor. Om ønskelig liggeres DNA som koder for det ønskede protein eller antistoff inn i pRK5 med utvalgte restriksjonsenzymer som tillater innsetting av slik DNA, ved anvendelse av ligeringsfremgangsmåter som dem beskrevet i Sambrook *et al.*, *supra*.

I én utførelse kan de utvalgte vertscellene være 293-celler. Humane 293-celler (ATCC CCL 1573) dyrkes til konfluens i vevskulturplater i medium, f.eks. DMEM tilsatt føtalt kalveserum og om ønskelig andre næringsstoffer og/eller antibiotika. Omtrent 10 µg DNA som koder for det ønskede protein eller antistoff ligert inn i pRK5 blandes med omtrent 1 µg DNA som koder for VA RNA-genet [Thimmappaya *et al.*, *Cell*, 31:543 (1982)], og løses i 500 µl 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 0,227 M CaCl₂. Denne blandingen tilsettes dråpevis 500 µl

50 mM Hepes (pH 7,35), 280 mM NaCl, 1,5 mM NaPO₄ og en utfelling får dannes over et tidsrom på 10 min. ved 25 °C. Utfelt materiale suspenderes og tilsettes til 293-cellene, og får sette seg i omtrent 4 t ved 37°. Dyrkningsmediet avsuges, og 2 ml 20 % glyserol i PBS tilsettes i 30 sek. 293-cellene vaskes så med serumfritt medium, friskt medium tilsettes, og cellene inkuberes i omtrent 5 dager.

Omtrent 24 t etter transfeksjonene fjernes dyrkningsmediet og erstattes med dyrkningsmedium (alene) eller dyrkningsmedium tilsatt 200 µCi/ml ³⁵S-cystein og 200 µCi/ml ³⁵S-metionin. Etter inkubering i 12 t oppsamles det kondisjonerte medium, konsentreres med et sentrifugeringsfilter og settes på en 15 % SDS-gel. Den prosesserte gelen kan tørkes og eksponeres overfor film for et utvalgt tidsrom for å vise nærvær av det ønskede protein eller antistoff. Kulturene som inneholder transfekterte celler kan også gjennomgå ytterligere inkubering (i serumfritt medium), og mediet analyseres i utvalgte bioanalyser.

I en alternativ teknikk kan det ønskede protein eller antistoff innføres forbigående i 293-celler ved anvendelse av dekstransulfatfremgangsmåten beskrevet av Sumparyrac *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 12:7575 (1981). 293-celler dyrkes til maksimal tetthet i en spinnerflaske, og 700 µg DNA som koder for det ønskede protein eller antistoff ligert inn i pRK5, tilsettes. Cellene konsentreres først fra spinnerflasken ved sentrifugering og vaskes med PBS. DNA-dekstranutfellingen inkuberes på de nedsentrifugerte cellene i 4 t. Cellene behandles med 20 % glyserol i 90 sek., vaskes med vevsdyrkningsmedium og føres tilbake til spinnerflasken tilsatt vevsdyrkningsmedium, 5 µg/ml insulin fra storfe og 0,1 µg/ml transferin fra storfe. Etter omtrent 4 dager sentrifugeres det kondisjonerte medium og filtreres for fjerning av celler og celleresten. Prøven som inneholder det uttrykte ønskede protein eller antistoff kan så oppkonsentreres og renses ved hvilken som helst utvalgt fremgangsmåte, f.eks. dialyse og/eller kolonnekromatografi.

I en annen utførelsesform kan det ønskede protein eller antistoff uttrykkes i CHO-celler. DNA som koder for det ønskede protein eller antistoff ligert inn i pRK5 kan transfekteres inn i CHO-celler ved anvendelse av kjente reagenser, f.eks. CaPO₄ eller DEAE-dekstran. Som beskrevet ovenfor kan cellekulturene inkuberes og mediet erstattes med dyrkningsmedium (alene) eller medium tilsatt en radioaktivt merket forbindelse, f.eks. ³⁵S-metionin. Etter bestemmelse av nærvær av det ønskede protein eller antistoff kan dyrkningsmedium erstattes med serumfritt medium. Kulturene inkuberes fortrinnsvis i omtrent 6 dager, hvor det kondisjonerte medium høstes. Medium som inneholder det uttrykte ønskede protein eller antistoff kan så oppkonsentreres og renses ved hvilken som helst utvalgt fremgangsmåte.

Epitopmerkede varianter av det ønskede protein eller antistoff kan også uttrykkes i CHO-vertsceller. DNA som koder for det ønskede protein eller antistoff som liggeres inn i pRK5 kan subklones ut av pRK5-vektoren. Innskuddet i subklonen kan behandles ved PCR for fusjon med opprettholdt leseramme til en utvalgt epitopmerkelapp, f.eks. en poly-His-

merkelapp, inn i en Baculovirus-ekspresjonsvektor. Det poly-His-merkede DNA som inneholder det ønskede protein- eller antistoffinnskudd kan så subklones i en SV40-drevet vektor som inneholder en seleksjonsmarkør, f.eks. DHFR, for seleksjon av stabile kloner. Endelig kan CHOcellene transfekteres (som beskrevet ovenfor) med den SV40-drevende vektor. Merking kan utføres som beskrevet ovenfor for å bekrefte ekspresjon. Dyrkningsmediet som inneholder det uttrykte, poly-His-merkede ønskede protein eller antistoff kan så oppkonsentreres og renses ved hvilken som helst utvalgt fremgangsmåte, f.eks. ved Ni^{2+} -chelataffinitetskromatografi.

Det ønskede protein eller antistoff kan også uttrykkes i CHO- og/eller COS-celler ved en forbigående ekspresjonsfremgangsmåte eller i CHO-celler ved en annen fremgangsmåte for stabil ekspresjon.

Stabil ekspresjon i CHO-celler oppnås ved anvendelse av følgende fremgangsmåte. Proteinene uttrykkes som en IgG-konstruksjon (immunadhesin) hvor de kodende sekvensene for de løselige formene (f.eks. de ekstracellulære domener) fra de angjeldende proteiner er fusjonert til en IgG1 konstant områdesekvens inneholdende hengseldomenet, CH2-domenet og CH3-domenet, og/eller i en poly-His-merket form.

Etter PCR-amplifisering subklones de angjeldende DNA i en CHO-ekspresjonsvektor ved anvendelse av standardteknikker som er beskrevet i Ausubel *et al.*, *Current Protocols of Molecular Biology*, enhet 3.16, John Wiley and Sons (1997). CHO-ekspresjonsvektorene er konstruert slik at de har kompatible restriksjons seter 5' og 3' for DNA av interesse, noe som tillater enkel utbytting av cDNA'er. Vektoren anvendes for ekspresjon i CHO-celler som beskrevet i Lucas *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* 24:9 (1774-1779) (1996) og benytter den tidlige promotor/enhancer fra SV40 for å styre ekspresjonen av cDNA av interesse og dihydrofolatreduktase (DHFR). DHFR-ekspresjon tillater seleksjon for stabil opprettholdelse av plasmidet etter transfeksjonen.

Tolv μg av det ønskede plasmid DNA innføres i omtrent 10 millioner CHO-celler ved anvendelse av de kommersielt tilgjengelige transfeksjonsreagensene «Superfect®» (Qiagen), «Dosper®» eller «Fugene®» (Boehringer Mannheim). Cellene dyrkes som beskrevet i Lucas *et al.*, *supra*. Omtrent 3×10^7 -celler nedfrysnes i en ampulle for videre dyrking og produksjon som beskrevet nedenfor.

Ampullene som inneholder plasmid-DNA tines ved å plasseres i et vannbad og sammenblandes ved vortex-behandling. Innholdet pipetteres over i et sentrifugerør inneholdende 10 ml medium og sentrifugeres ved 1000 rpm i 5 min. Supernatanten avsuges og cellene resuspenders i 10 ml seleksjonsmedium ($0,2 \mu\text{m}$ filtrert PS20 med 5 % $0,2 \mu\text{m}$ -diafiltrert føtalt bovint serum. Cellene fordeles så over i en 100 ml spinnerflaske tilsatt 90 ml seleksjonsmedium. Etter 1-2 dager overføres cellene til en 250 ml spinnerflaske fylt med 150 ml seleksjonsmedium og inkuberes ved 37°C . Etter ytterligere 2-3 dager inokuleres 250 ml, 500 ml og 2000 ml spinnerflasker med 3×10^5 -celler/ml. Cellemediet byttes med friskt medium ved sentrifugering og resuspending i produksjonsmedium. Selv om ethvert egnet

CHO-medium kan benyttes, kan et produksjonsmedium som er beskrevet i U.S. patentskrift nr. 5 122 469, tildelt 16. juni 1992, anvendes. En 3L produksjonsspinnerflaske inokuleres med $1,2 \times 10^6$ -celler/ml. På dag 0 bestemmes celletallet og pH. På dag 1 analyseres spinnerkulturen, og gjennomblåsing med filtrert luft begynner. På dag 2 analyseres spinnerkulturen, temperaturen endres til 33 °C og 30 ml 500 g/l glukose og 0,6 ml 10 % antiskummiddel (f.eks. 35% polydimetylsiloksanemulsjon, Dow Corning 365 emulsjon av medisinsk renhet) tilsettes. Gjennom hele produksjonen justeres pH etter behov for å holdes rundt 7,2. Etter 10 dager eller etter at cellenes levedyktighet er redusert til under 70 %, høstes cellekulturen ved sentrifugering og filtrering gjennom et 0,22 µm filter. Filtratet lagres enten ved 4 °C eller settes umiddelbart på kolonner for rensing.

For de poly-His-merkede konstruksjonene renses proteinene ved anvendelse av en Ni-NTA-kolonne (Qiagen). Før rensingen tilsettes imidazol til det kondisjonerte medium til en konsentrasjon på 5 mM. Det kondisjonerte medium pumpes på en 6 ml Ni-NTA-kolonne ekvilibrert ved 4 °C i 20 mM Hepes, pH 7,4 tilsatt 0,3 M NaCl og 5 mM imidazol med en gjennomstrømningshastighet på 4-5 ml/min. Etter påsettingen vaskes kolonnen med ytterligere ekvilibreringsbuffer og proteinet elueres med ekvilibreringsbuffer tilsatt 0,25 M imidazol. Det svært rensede protein avsaltes så over i en lagringsbuffer inneholdende 10 mM Hepes, 0,14 M NaCl og 4 % mannitol pH 6,8 ved hjelp av en 25 ml G25 Superfine (Pharmacia)-kolonne og lagres ved -80 °C.

Immunadhesin (Fc-holdige)-konstrukter renses fra kondisjonert medium som følger. Det kondisjonerte medium pumpes på en 5 ml Protein A-kolonne (Pharmacia), ekvilibrert med 20 mM Na-fosfatbuffer pH 6,8. Etter påsettingen vaskes kolonnen grundig med ekvilibreringsbuffer før eluering med 100 mM sitronsyre pH 3,5. Det eluerte protein nøytraliseres umiddelbart ved oppsamling av 1 ml fraksjoner i rør tilsatt 275 µl 1 M Tris-buffer pH 9. Det svært rensede protein avsaltes så over i lagringsbuffer som beskrevet ovenfor for de poly-His-merkede proteinene. Homogeniteten bekreftes ved SDS-polyakrylamidgelelektroforese og ved N-terminal aminosyresekvensering ved Edman-degradering.

Eksempel 11

Ekspresjon av protein eller antistoff i gjær

Den påfølgende fremgangsmåten beskriver rekombinant ekspresjon av det ønskede protein eller antistoff i gjær.

Først konstrueres gjærekspresjonsvektorer for intracellulær produksjon eller sekresjon av det ønskede protein eller antistoff fra ADH2/GAPDH-promoterene. DNA som koder for det ønskede protein eller antistoff og promoteren settes inn i egnede restriksjonsenzymseter i det valgte plasmid for styring av intracellulær ekspresjon. For sekresjon kan DNA som koder for det ønskede protein eller antistoff kloneres inn i det utvalgte

plasmid sammen med DNA som koder for ADH2/GAPDH-promoteren, et nativt signalpeptid eller et annet signalpeptid fra et pattedyr, eller f.eks. en sekretorisk signalsekvens/-ledersekvens fra alfa-faktor eller invertase fra gjær, og linkersekvenser (om nødvendig) for ekspresjon av det ønskede protein eller antistoff.

5 Gjæceller, f.eks. gjærstammen AB110, kan så transformeres med ekspresjonsplasmidene som er beskrevet ovenfor og dyrkes i et utvalgt fermenteringsmedium. Supernatanter fra de transformerte gjærcellene kan analyseres ved utfelling med 10 % trikloreddisyre og separasjon ved SDS-PAGE, fulgt av farging av gelene med Coomassie Blue.

10 Det rekombinante protein eller antistoff kan så isoleres og renses ved å fjerne gjærcellene fra fermenteringsmediet ved sentrifugering, og så oppkonsentrere mediet ved anvendelse av utvalgte patronfiltere. Konsentratet som inneholder det rekombinante protein eller antistoff kan renses videre ved anvendelse av utvalgte kolonnekromatografiresiner.

15 **Eksempel 12**

Ekspresjon av proteinet eller antistoffet i Baculovirusinfiserte insektceller

Den påfølgende fremgangsmåten beskriver rekombinant ekspresjon av det ønskede protein eller antistoff i Baculovirusinfiserte insektceller.

20 Sekvensen som koder for det ønskede protein eller antistoff fusjoneres oppstrøms for en epitopmerkelapp som foreligger i en Baculovirusekspresjonsvektor. Slike epitopmerkelapper omfatter poly-his-merkelapper og immunglobulinmerkelapper (f.eks. Fc-områder fra IgG). En rekke plasmider kan benyttes, inkludert plasmider avledet fra kommersielt tilgjengelige plasmider som pVL193 (Novagen). Kort beskrevet amplifiseres
25 sekvensen som koder for den ønskede delen av proteinet eller antistoffet, f.eks. sekvensen som koder for det ekstracellulære domenet i et transmembranprotein eller sekvensen som koder for det modne protein dersom proteinet er ekstracellulært, ved PCR med primere som er komplementære til det 5' og det 3'-merkede området. 5'-primeren kan inneholde flankerende (utvalgte) restriksjonsenzymseter. Produktet kuttes så med de valgte
30 restriksjonsenzymene og subklones i ekspresjonsvektoren.

Rekombinant baculovirus dannes ved å kotransfekte plasmidet ovenfor og «BaculoGold»™-virus DNA (PharMingen) i *Spodoptera frugiperda* («Sf9»)-celler (ATCC CRL 1711) ved anvendelse av lipofektin (kommersielt tilgjengelig fra GIBCO-BRL). Etter 4-5 dagers inkubering ved 28 °C høstes frigjort virus og anvendes for ytterligere amplifiseringer.
35 Virusinfeksjon og proteinekspresjon utføres som beskrevet av O'Reilly *et al.*, *Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual*, Oxford University Press (1994).

Uttrykt poly-his-merket protein eller antistoff kan så renses, f.eks. ved Ni²⁺-chelataffinitetskromatografi som følger. Ekstrakter fremstilles fra Sf9-celler infisert med rekombinant virus som beskrevet av Rupert *et al.*, *Nature*, **362**:175-179 (1993). Kort

beskrevet vaskes Sf9-cellene, resuspenderes i ultralydbehandlingsbuffer (25 ml Hepes, pH 7,9, 12,5 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 10 % glyserol, 0,1 % NP-40, 0,4 M KCl) og ultralyd-
 behandles 2 ganger i 20 sek. på is. De ultralydbehandlede prøvene klarnes ved
 sentrifugering, og supernatanten fortynnes 50 ganger med påsettingsbuffer (50 mM fosfat,
 5 300 mM NaCl, 10 % glycerol, pH 7,8) og filtreres gjennom et 0,45 µm filter. En Ni²⁺-NTA-
 agarosekolonne (kommersielt tilgjengelig fra Qiagen) med et kolonnevolum på 5 ml
 fremstilles, vaskes med 25 ml vann og ekvibreres med 25 ml påsettingsbuffer. Det filtrerte
 celleekstrakt settes på kolonnen med 0,5 ml pr. min. Kolonnen vaskes til A₂₈₀ når
 basalnivået med påsettingsbuffer, hvorefter oppsamling av fraksjoner begynner. Kolonnen
 10 vaskes så med sekundær vaskebuffer (50 mM fosfat, 300 mM NaCl, 10 % glyserol pH 6,0),
 som eluerer uspesifikt bundet protein. Etter at A₂₈₀ igjen når basalnivået fremkalles kolonnen
 med en 0-500 mM imidazolgradient i sekundær vaskebuffer. Fraksjoner på 1 ml oppsamles
 og analyseres ved SDS-PAGE og sølvfarging eller Western-blotting med Ni²⁺-NTA konjugert
 til alkalisk fosfatase (Qiagen). Fraksjoner som inneholder det eluerte His₁₀-merkede protein
 15 eller antistoff slås sammen og dialyseres mot påsettingsbuffer.

Alternativt kan rensing av IgG-merket (eller Fc-merket) protein eller antistoff
 utføres ved anvendelse av kjente kromatografiteknikker, inkludert f.eks. protein A- eller
 protein G-kolonnekromatografi.

20 **Eksempel 13**

Fremstilling av antistoffer

Dette eksempel illustrerer fremstilling av monoklonale antistoffer som spesifikt kan
 bindes til proteinet av interesse eller det ønskede antigen.

25 Teknikker for fremstilling av monoklonale antistoffer er kjente innen faget og er
 beskrevet f.eks. i Goding, *supra*. Immunogener som kan benyttes omfatter rensset ønsket
 protein eller målantistoff, fusjonsproteiner som inneholder det ønskede protein eller
 målantigen og celler som uttrykker slikt rekombinant protein eller antigen på celleoverflaten.
 Velgelsen av immunogenet kan gjøres av en erfaren fagperson uten omfattende
 30 eksperimentering.

Mus, f.eks. Balb/c-mus, immuniseres med det ønskede protein eller målantigen-
 immunogen emulgert i komplett Freund's adjuvans og injisert subkutant eller
 intraperitonealt i en mengde på 1-100 mikrogram. Alternativt emulgeres immunogenet i
 MPL-TDM-adjuvans (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) og injiseres i fotputene
 35 på bakbeina. De immuniserte musene gis så en forsterkerinjeksjon 10-12 dager senere med
 ytterligere immunogen emulgert i den valgte adjuvans. Deretter kan dyrene i flere uker gis
 ytterligere immuniseringsinjeksjoner. Serumprøver kan regelmessig fremskaffes fra musene
 ved retro-orbital tapping for analyse i ELISA-analyser for påvisning av antistoffer rettet mot
 det ønskede protein eller antigen.

Etter påvisning av et egnet antistofftiter kan dyr som er «positive» for antistoff injiseres med en endelig, intravenøs injeksjon av det ønskede protein eller målantigen. 3-4 dager senere avlives musene, og miltcellene høstes. Miltcellene fusjoneres så (ved anvendelse av 35 % polyetylenglykol) til en utvalgt musemyelomcellelinje, f.eks.

- 5 P3X63AgU.1, tilgjengelig fra ATCC under betegnelsen CRL 1597. Fusjonene gir hybridomceller, som så kan utsås i 96-brønners vevsdyrkningsplater inneholdende HAT (hypoxantin, aminopterin og thymidin) medium for å inhibere proliferasjon av ikke-fusjonerte celler, myelomhybrider og miltcellehybrider.

- 10 Hybridomcellene vil så analyseres i en ELISA for reaktivitet mot det ønskede protein eller målantigen. Bestemmelse av «positive» hybridomceller som utskiller slike monoklonale antistoffer ligger innenfor teknikkens stand.

- De positive hybridomcellene kan injiseres intraperitonealt i syngeneiske Balb/c-mus for fremstilling av acites som inneholder slike monoklonale antistoffer. Alternativt kan hybridomcellene dyrkes i vevsdyrkningsflasker eller rulleflasker. Rensing av
15 de monoklonale antistoffene som dannes i ascites kan oppnås ved anvendelse av ammoniumsulfatutfelling, fulgt av geleksklusjonskromatografi. Alternativt kan affinitetskromatografi basert på binding av antistoff til protein A eller protein G benyttes.

Eksempel 14

20

Rensing av det ønskede protein ved anvendelse av spesifikke antistoffer

- Det ønskede protein, i entenativ eller rekombinant form, kan renses ved en rekke standardteknikker innen proteinrensningsfaget. F.eks. kan pro-polypeptidformer, modne polypeptidformer eller pre-polypeptidformer av det ønskede protein renses ved
25 immunaffinitetskromatografi og anvendelse av antistoffer som er spesifikke for det ønskede protein. Generelt fremstilles en immunaffinitetskolonne ved å binde antistoffet som spesifikt binder det ønskede protein kovalent til et aktivt kromatografiresin.

- Polyklonale immunglobuliner fremstilles fra immunserum, enten ved utfelling med ammoniumsulfat eller ved rensing på immobilisert protein A (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Likeså fremstilles monoklonale antistoffer fra museascitesvæske ved
30 ammoniumsulfatutfelling eller kromatografi på immobilisert protein A. Delvis rensed immunglobulin bindes kovalent til et kromatografiresin, f.eks. CnBr-aktivert «SEPHAROSE»™ (Pharmacia LKB Biotechnology). Antistoffet kobles til resinet, resinet blokkeres og det derivatiserte resin vaskes ifølge produsentens instruksjoner.

- 35 En slik immunaffinitetskolonne benyttes for rensing av det ønskede protein ved å fremstille en fraksjon fra celler som utdyrker proteinet i løselig form. Denne sammen-setningen oppnås ved å solubilisere hele cellen eller en subcellulær fraksjon fremskaffet ved differensiell sentrifugering ved tilsetning av detergent eller ved andre fremgangsmåter som

er kjente innen faget. Alternativt kan løselig protein som inneholder en signalsekvens utskilles i anvendbare mengder til mediet som cellene dyrkes i.

- Det solubiliserte sammensetning som inneholder det ønskede protein får passere over immunaffinitetskolonnen, og kolonnen vaskes under betingelser som tillater
- 5 preferensiell absorpsjon av det ønskede protein (f.eks. buffere med høy ionestyrke i nærvær av detergent). Så elueres kolonnen under betingelser som bryter bindinger mellom antistoff og protein (f. eks. en buffer med lav pH, f.eks. omtrent pH 2-3, eller høy konsentrasjon av et chaotropt middel f.eks. urea eller tiocyanation), og det ønskede protein oppsamles så.

P a t e n t k r a v

- 5 1. Stabil, flytende formulering med lav turbiditet som omfatter (a) et anti-IgE-antistoff eller et antigen-bindende fragment derav i en mengde av 150 mg/ml, (b) arginin-HCl i en mengde av 200 mM, (c) histidin i en mengde av 20 mM, (d) polysorbat i en mengde av 0,01 til 0,1 %, hvor formuleringen videre har en pH på 6,0;
k a r a k t e r i s e r t v e d at anti-IgE-antistoffet fremstilles ved en fremgangsmåte som
- 10 omfatter (1) dyrkning av celler transformert eller transfektert med en vektor som inneholder nukleinsyre som koder for et antistoff som omfatter en lettkjede som omfatter en aminosyresekvens identifisert som E25 i figur 10A og en tungkjede som omfatter en aminosyresekvens identifisert som E25 i figur 10B, og (2) rensing av anti-IgE-antistoffet produsert av cellene.
- 15 2. Formulering ifølge krav 1, hvor cellene er:
(i) eukaryote celler eller prokaryote celler;
(ii) eukaryote celler som er pattedyrceller eller gjærceller; eller
(iii) eukaryotiske celler som er kinesiske hamsterovery (CHO) celler.
- 20 3. Formulering ifølge krav 1 eller 3, hvor polysorbatet er i en mengde av 0,02 %.
4. Formulering ifølge et hvilket som helst av kravene 1-3, hvor antistoffet er et humanisert antistoff.
- 25 5. Formulering ifølge et hvilket som helst av kravene 1-4, hvor det antigenbindende fragmentet er valgt fra gruppen bestående av Fab, Fab', F(ab')₂, og Fv.
6. Fremstilt gjenstand,
30 k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en beholder som inneholder formuleringen ifølge et hvilket som helst av de tidligere kravene.
7. Fremstilt gjenstand ifølge krav 6, hvor beholderen er en sprøyte.
- 35 8. Fremstilt gjenstand ifølge krav 7, hvor sprøyten videre inngår i en injeksjons-innretning.
9. Fremstilt gjenstand ifølge krav 8, hvor injeksjonsinnretningen er en autoinjektor.

10. Anvendelse av en formulering ifølge et hvilket som helst av kravene 1-5 ved fremstilling av et medikament for behandling av en IgE-mediert forstyrrelse.

11. En formulering ifølge et hvilket som helst av kravene 1-5 for anvendelse ved
5 behandling av en IgE-mediert forstyrrelse.

12. Anvendelse ifølge krav 10, eller en formulering for anvendelse ifølge krav 11 hvor den IgE-medierte forstyrrelsen er valgt fra gruppen som består av allergisk rhinitt, astma, allergisk astma, ikke-allergisk astma, atopisk dermatitt og gastroenteropati.

10

13. Anvendelse ifølge krav 10, eller en formulering for anvendelse ifølge krav 11 hvor den IgE-medierte forstyrrelsen er allergisk rhinitt, allergisk astma, eller atopisk dermatitt.

15

14. Anvendelse ifølge krav 10, eller formuleringen for anvendelse ifølge krav 11, hvor den IgE-medierte forstyrrelsen er valgt fra gruppen som består av hypersensitivitet, allergisk bronkopulmonar aspergillose, parasittsykdommer, interstitiell cystitt, hyper-IgE-syndrom, ataksia-telangiectasia, Wiskott-Aldrich-syndrom, thymisk alymfoplasi, IgE-myelom og transplantat-mot-vert-reaksjon.

20

15. Anvendelse ifølge krav 10, eller formuleringen for anvendelse ifølge krav 11, hvor den IgE-medierte forstyrrelsen er hypersensitivitet.

16. Anvendelse av formuleringen for anvendelse ifølge krav 16, hvor hypersensitivitetsforstyrrelsen er valgt fra gruppen som består av anafylaksi, urtikaria og matallergi.

25

17. Anvendelse ifølge krav 10, eller formuleringen for anvendelse ifølge krav 11, hvor hypersensitivitetsforstyrrelsen er matallergi.

30

18. Anvendelse av formuleringen for anvendelse ifølge krav 17, hvor matallergien er en følge av eksponering overfor en belgfrukt.

19. Anvendelse av formuleringen for anvendelse ifølge krav 18, hvor belgfrukten er en peanutt.

35

20. Anvendelse ifølge krav 10, eller formuleringen for anvendelse ifølge krav 11, hvor formuerlingen er i kombinasjon med et antihistamin, en bronkodilator, et glukokortikoid, eller en NSAID.

21. Anvendelse ifølge krav 10, eller formuleringen for anvendelse ifølge krav 11, hvor medikamentet eller formuleringen er for administrering i kombinasjon med administrering av et antihistamin, en bronkodilator, et glukokortikoid, eller en NSAID.
- 5 22. Anvendelse ifølge krav 10, eller formuleringen for anvendelse ifølge krav 11, hvor medikamentet eller formuleringen er for administrering i kombinasjon med administrering av allergen desensitivering.

Sequence Listing

<110> Genentech, Inc.

<120> High Concentration Antibody and Protein Formulations

<130> P2026R1-PCT

<140> PCT/US2004/009613

<141> 2004-03-29

<150> US 60/460,659

<151> 2003-04-04

<160> 6

<210> 1

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> E25, light chain

<400> 1

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

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

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
140 145 150

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
155 160 165

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
170 175 180

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
185 190 195

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
200 205 210

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 2

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> E26, light chain

<400> 2

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

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

Gly	Glu	Gly	Asp	Ser	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly
				35					40					45

Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Tyr	Leu	Glu	Ser
				50					55					60

Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
				65					70					75

Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr
				80					85					90

Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly
				95					100					105

Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe
				110					115					120

Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

125	130	135
Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val		
140	145	150
Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu		
155	160	165
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
170	175	180
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val		
185	190	195
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr		
200	205	210
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
215		

<210> 3

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Hu-901, light chain

<400> 3

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

Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly
				20					25					30

Thr	Asn	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg
				35					40					45

Leu	Leu	Ile	Lys	Tyr	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser
				50					55					60

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

Ser	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				80					85					90

Ser	Asp	Ser	Trp	Pro	Thr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
				95					100					105

Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro
				110					115					120

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 125 130 135

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 140 145 150

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 155 160 165

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 170 175 180

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 185 190 195

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 200 205 210

Arg Gly Glu Cys

<210> 4

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> E25, heavy chain

<400> 4

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

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

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

Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Ser	Ile	Thr	Tyr	Asp	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr
				50						55				60

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

Lys	Asn	Thr	Phe	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80							85			90

Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Ser	His	Tyr	Phe	Gly	His
				95						100				105

Trp His Phe Ala Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 110 115 120

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 125 130 135

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 140 145 150

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 155 160 165

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 170 175 180

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 185 190 195

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 200 205 210

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 215 220 225

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
320 325 330

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
335 340 345

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
350 355 360

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

365	370	375
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
380	385	390
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
395	400	405
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
410	415	420
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
425	430	435
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
440	445	450

Lys

<210> 5

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> E26, heavy chain

<400> 5

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

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

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

Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Ser	Ile	Thr	Tyr	Asp	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr
				50					55					60

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

Lys	Asn	Thr	Phe	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80					85					90

Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Ser	His	Tyr	Phe	Gly	His
				95					100					105

Trp	His	Phe	Ala	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
				110					115					120

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 125 130 135

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 140 145 150

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 155 160 165

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 170 175 180

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 185 190 195

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 200 205 210

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 215 220 225

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

245	250	255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
260	265	270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
275	280	285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr		
290	295	300
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
305	310	315
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys		
320	325	330
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
335	340	345
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu		
350	355	360
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly		
365	370	375

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
380 385 390

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
395 400 405

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
410 415 420

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
425 430 435

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440 445 450

Lys

<210> 6

<211> 453

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Hu-901, heavy chain

<400> 6

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

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

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

Glu	Trp	Val	Gly	Glu	Ile	Ser	Pro	Gly	Thr	Phe	Thr	Thr	Asn	Tyr
				50					55					60

Asn	Glu	Lys	Phe	Lys	Ala	Arg	Ala	Thr	Phe	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser
				65					70					75

Thr	Asn	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp
				80					85					90

Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Phe	Ser	His	Phe	Ser	Gly	Ser
				95					100					105

Asn	Tyr	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
				110					115					120

Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	125		130		135
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys					
	140		145		150
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn					
	155		160		165
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu					
	170		175		180
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro					
	185		190		195
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His					
	200		205		210
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser					
	215		220		225
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu					
	230		235		240
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp					
	245		250		255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 290 295 300

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 305 310 315

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 320 325 330

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 335 340 345

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 350 355 360

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 365 370 375

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 380 385 390

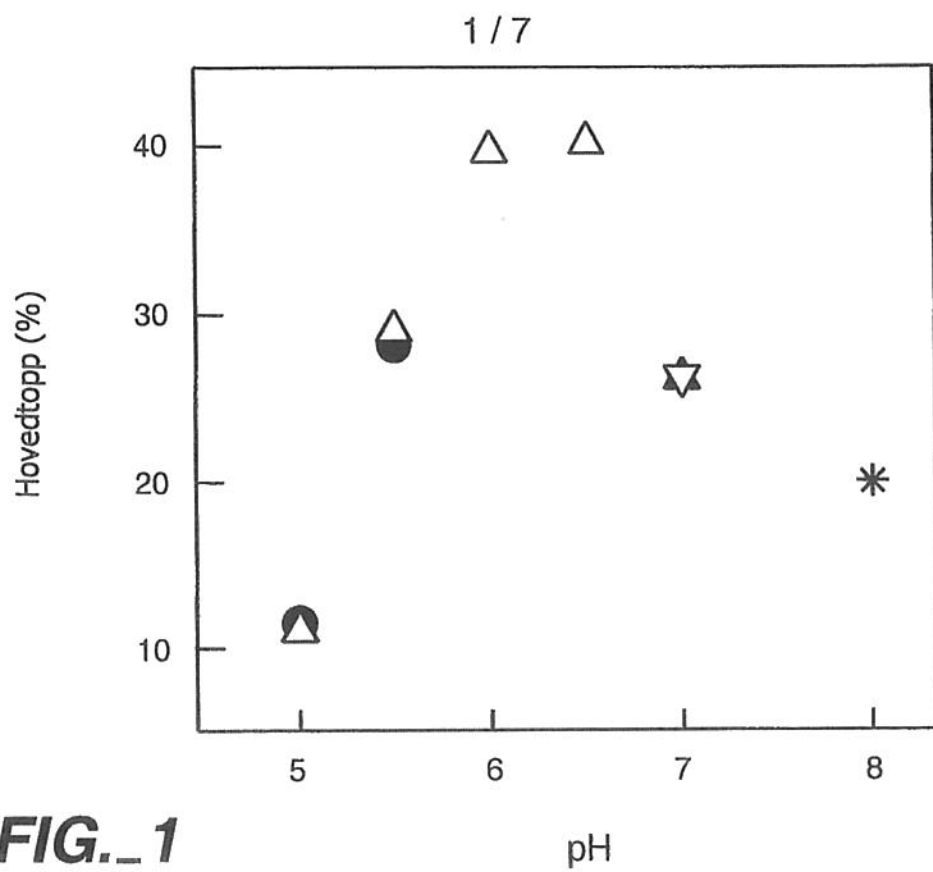
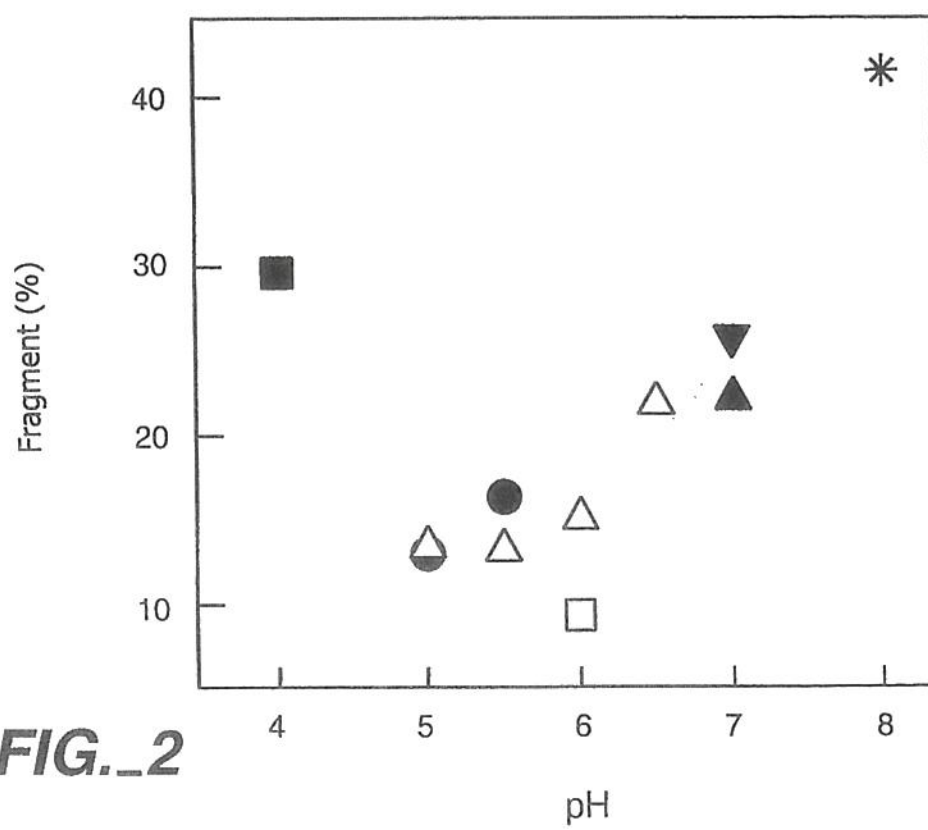
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
395 400 405

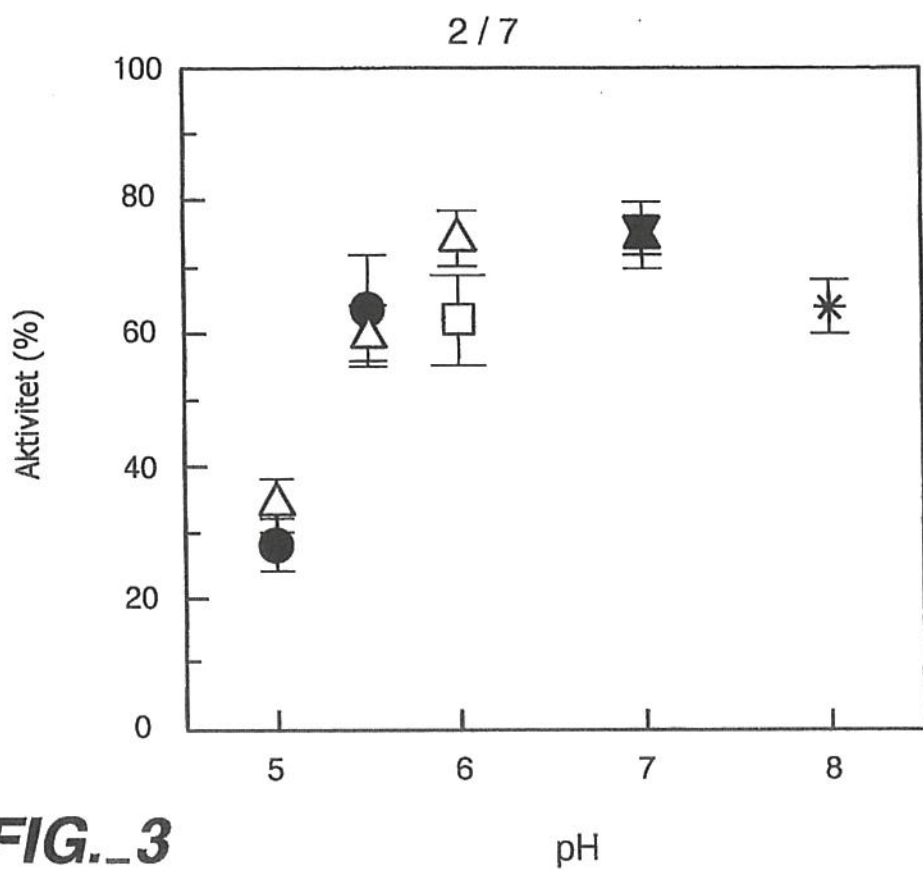
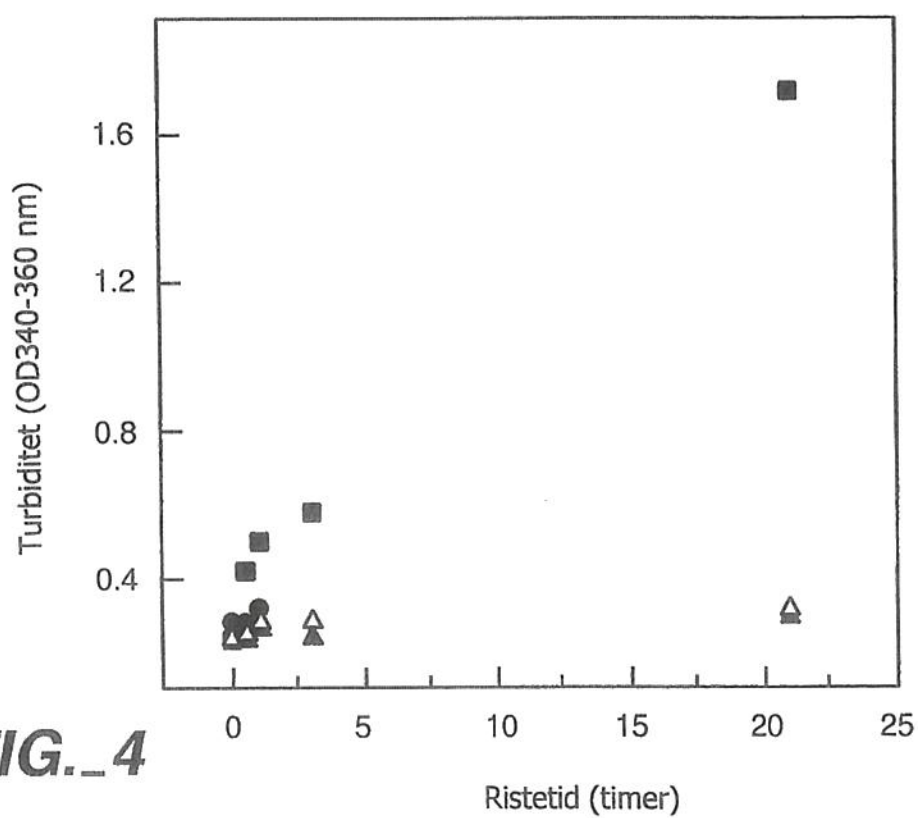
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
410 415 420

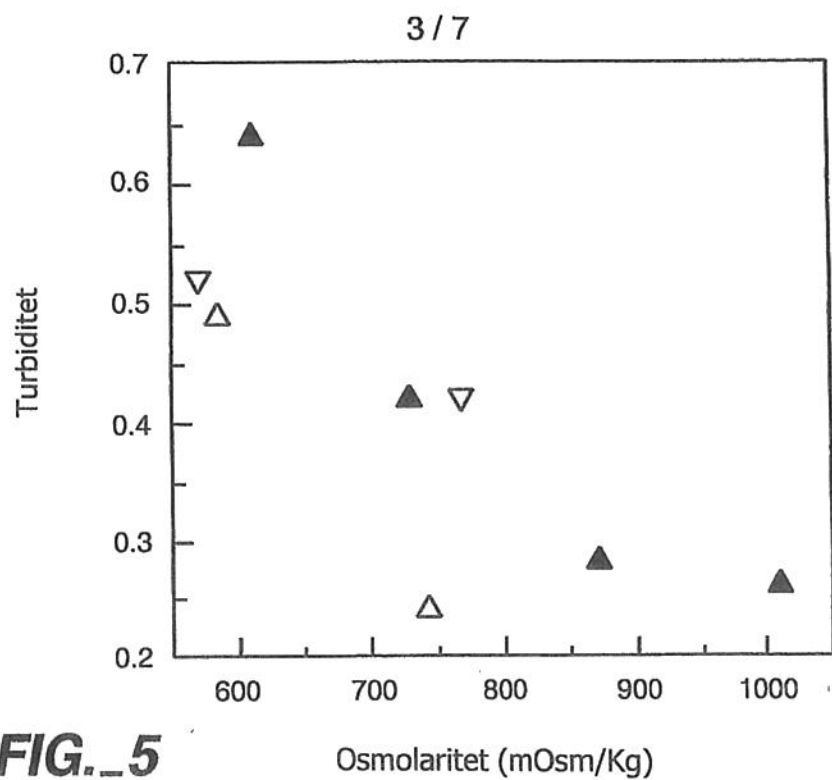
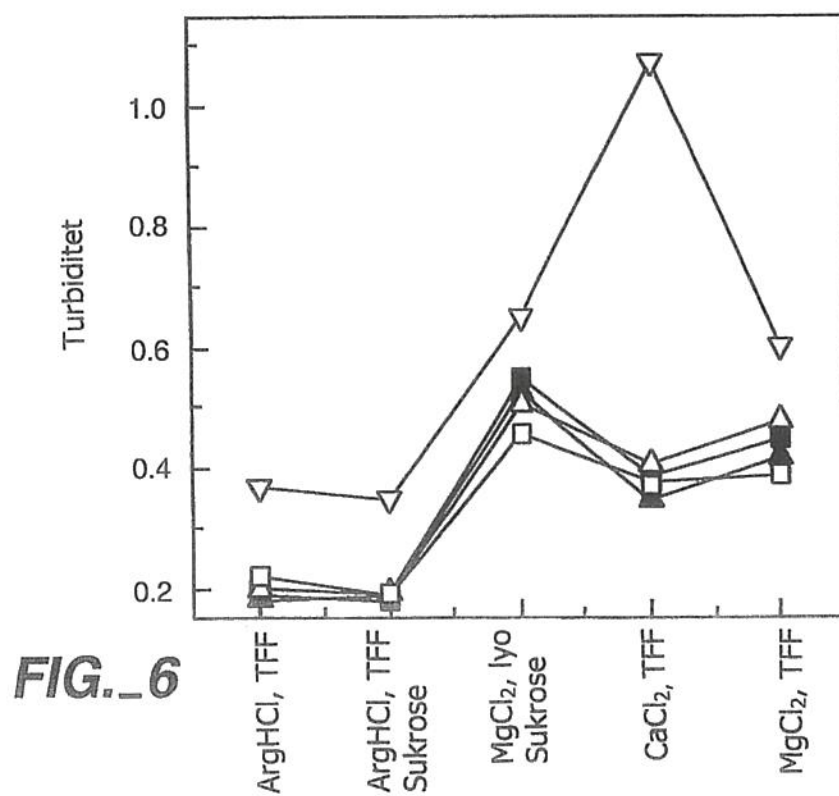
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
425 430 435

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
440 445 450

Pro Gly Lys

**FIG._1****FIG._2**

**FIG._3****FIG._4**

**FIG._5****FIG._6**

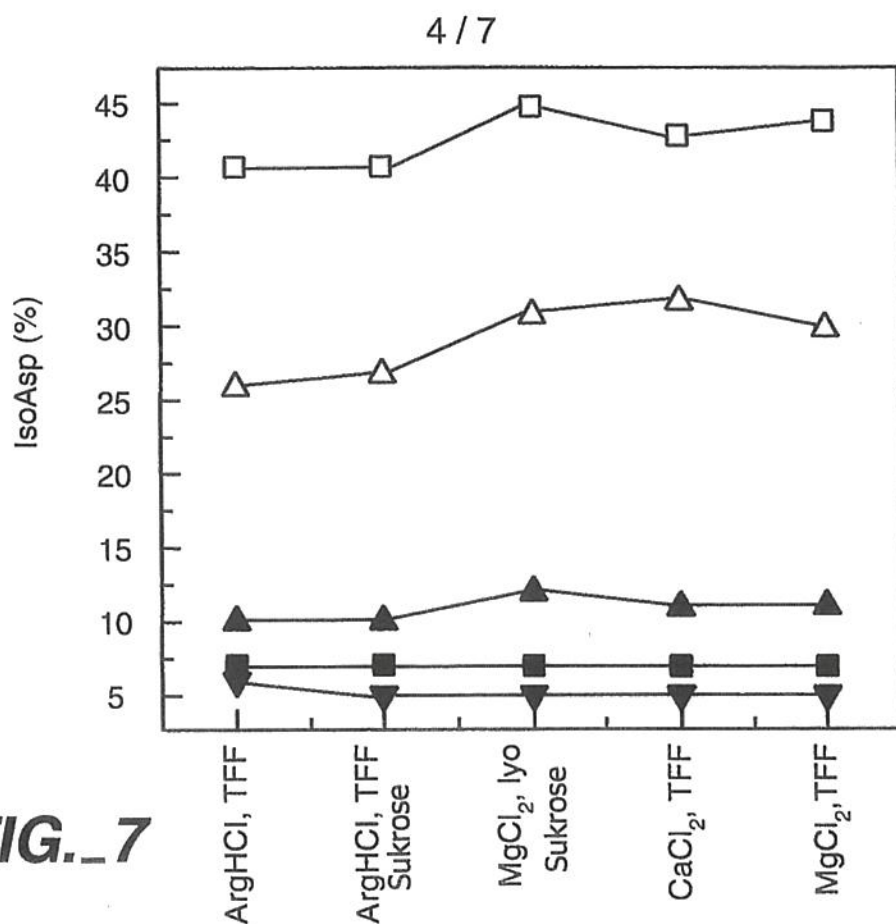


FIG._7

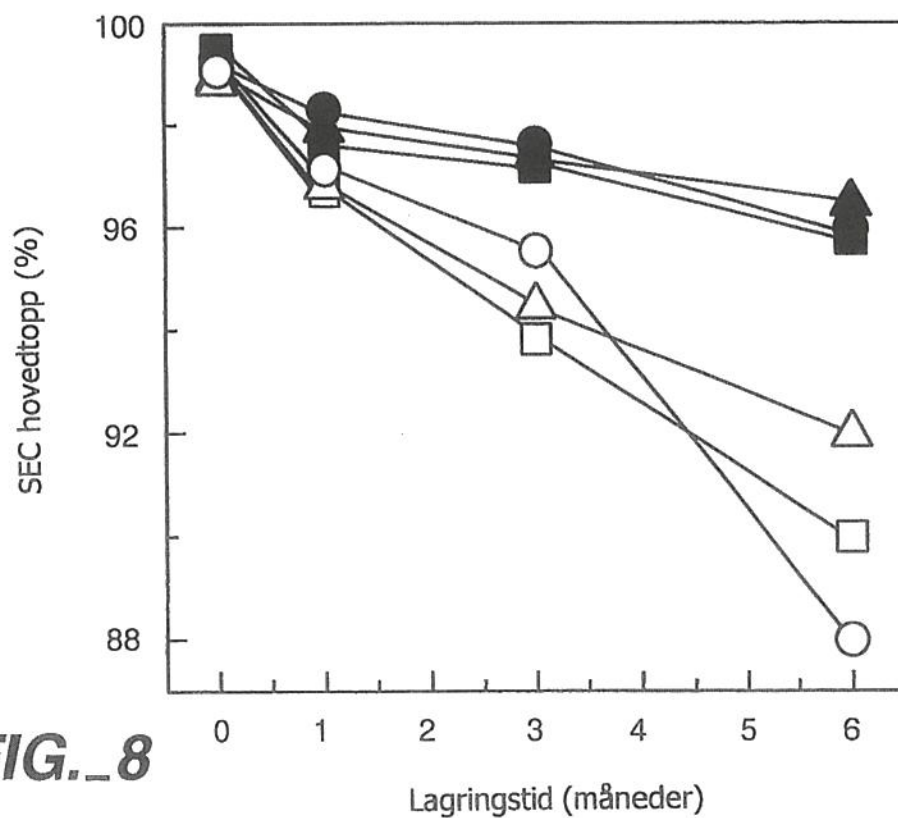
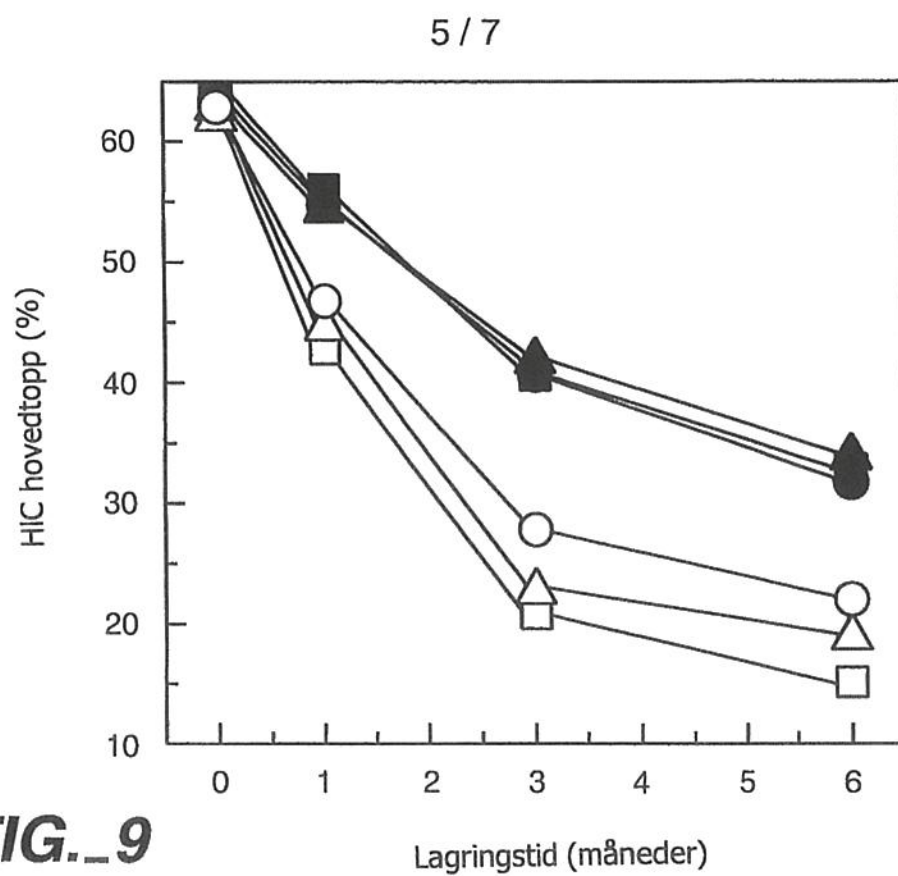


FIG._8

**FIG._9**

Anti-IgE antistoffer: Lett kjede (V_L og C_L domener)

	10	20	30	40	50	60	70	80
E25	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITC[RASQSYD	YDGDSYMN]WY	QOKPGKAPKL	LIY[AASYLES]	GVPSRFSGSG	SGTDFTLTIS
E26	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITC[RASKFYD	YDGDSYMN]WY	QOKPGKAPKL	LIY[AASYLES]	GVPSRFSGSG	SGTDFTLTIS
Hu-901	DIQLTQSPGT	LSASVGDRAT	LSC RASQSIG	TNIH----	WY QOKPGKAPKL	LIY[AASESIS]	GVPSRFSGSG	SGTDFTLTIS
	90	100	110	C _L starts				
E25	SLOPEDFATY	YC[QOSHEDPY	T]FGQGTKVEI	KRT VAAPSVFIFPPSPDEQLKSGTASVVCLLNNFY	PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD			
E26	SLOPEDFATY	YC[QOSHEDPY	T]FGQGTKVEI	KRT VAAPSVFIFPPSPDEQLKSGTASVVCLLNNFY	PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD			
Hu-901	RLEPEDFAMY	YC QQSDSWFT	T FGQGTKVEI	KRT VAAPSVFIFPPSPDEQLKSGTASVVCLLNNFY	PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD			
E25	SKDSTYSLSTLTLSKADYEKKHKVYACEVTHQGLSSPVT	KSFNRGEC						
E26	SKDSTYSLSTLTLSKADYEKKHKVYACEVTHQGLSSPVT	KSFNRGEC						
Hu-901	SKDSTYSLSTLTLSKADYEKKHKVYACEVTHQGLSSPVT	KSFNRGEC						

FIG. 10A

