



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **330903**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 16/24 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20030614	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2001.08.07 PCT/US2001/24720
(22)	Inng.dag	2003.02.07	(85)	Videreføringsdag	2003.02.07
(24)	Løpedag	2001.08.07	(30)	Prioritet	2000.08.07, US, 223358 2000.09.29, US, 236827 2001.08.01, US, 920262
(41)	Alm.tilgj	2003.04.02			
(45)	Meddelt	2011.08.15			
(73)	Innehaver	Centocor Inc, 200 Great Valley Parkway, Ra-1-5, US-PA19355 MALVERN, USA			
(72)	Oppfinner	Jill Giles-Komar, 31 Blakely Road, US-PA19335 DOWNINGTOWN, USA David M Knight, 2430 Whitehorse Road, US-PA19312 BERWYN, USA David Peritt, 407 Conshohocken State Road, US-PA19004 BALA CYNWYD, USA Bernard Scallon, 139 Hemlock Drive, Collegeville, PA 19426, US-, USA David Shealy, 1351 Pennsridge Place, US-PA19335 DOWNINGTOWN, USA			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Nukleinsyrer, anti-IL-12-antistoff, sammensetning inneholdende denne samt vertscelle.			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 0056772 A, WO 9937682 A, WO 9633735 A, WO 9715327 A, YAWALKAR N. ET. AL., Expression of interleukin-12 is increased in psoriatic skin, Jour. of Inves. Dermatology., Dec. 1998, Vol. 111(6), s. 1053-57.			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse gjelder minst ett anti-IL-12-antistoff, og omfatter isolerte nukleinsyrer som koder for minst ett anti-IL-12-antistoff, IL-12, vektorer, vertsceller, transgene dyr eller planter og fremgangsmåter for fremstilling og anvendelse derav, innbefattet terapeutiske sammensetninger, fremgangsmåter og innretninger.

OPPFINNELSENS OMRÅDE

Foreliggende patentsøknad er delvis basert på og krever prioritet fra U.S. foreløpig patentsøknad 60/223 358, innlevert 7. august 2000, og 60/236 827, innlevert 29. september 2000. Foreliggende oppfinnelse gjelder antistoffer, spesifikke for minst ett

5 Interleukin-12 (IL-12)-protein eller et fragment derav, så vel som nukleinsyrer som koder for slike anti-IL-12-antistoffer, komplementære nukleinsyrer og vertsceller.

TEKNIKKENS STAND

Interleukin-12 (IL-12) er et heterodimert cytokin som består av glykocylerte

10 polypeptidkjeder på 35 og 40 kD som er sammenbundet med disulfidbroer. Cytokinet syntetiseres og utskilles av antigenpresenterende celler, innbefattet dendrittceller, monocytt, makrofager, B-celler, Langerhansceller og keratinocytter, så vel som naturlige dreperceller (NK-celler). IL-12 formidler en rekke biologiske prosesser og har blitt betegnet NK-cellestimulerende faktor (NKSF), T-cellestimulerende faktor,

15 cytotoksisk T-lymfocytmodningsfaktor og EBV-transformert B-cellelinjefaktor (Curfs, J. H. A. J., et al., Clinical Microbiology Reviews, 10:742-780 (1997)).

Interleukin-12 kan bindes til IL-12-reseptoren, som uttrykkes på plasmamembranen til celler, for eksempel T-celler, NK-celler) og endrer (for eksempel initierer, forhindrer)

20 biologiske prosesser. For eksempel kan binding av IL-12 til IL-12-reseptoren stimulere proliferasjon av preaktiverte T-celler og NK-celler, fremme den cytolytiske aktivitet av cytotoksiske T-celler (CTL), NK-celler og LAK-celler (lymfokinaktiverte dreperceller), indusere dannelsen av gamma-interferon (IFN GAMMA) ved T-celler og NK-celler og indusere differensiering av naive Th0-celler til Th1-celler som danner IFN GAMMA og

25 IL-2 (Trinchieri, G., Annual Review of Immunology, 13:251-276 (1995)). Spesielt er IL-12 avgjørende for dannelsen av cytolytiske celler (for eksempel NK, CTL) og for å utløse en cellulær immunrespons (for eksempel en Th1-celleformidlet immunrespons). IL-12 spiller således en avgjørende rolle for dannelsen og regulering av både beskyttende immunitet (for eksempel utryddelse av infeksjoner) og patologiske immunrespons (for

30 eksempel autoimmunitet) (Hendrzak, J. A. og Brunda, M. J., Laboratory Investigation, 72:619-637 (1995)). Følgelig kan en immunrespons (for eksempel beskyttende eller patogen) forsterkes, undertrykkes eller forhindres ved å manipulere den biologiske aktivitet av IL-12 *in vivo*, for eksempel ved hjelp av et antistoff.

35 I WO 9937682 A beskrives fremstilling av muse anti-human IL-12 antistoff som nøytraliserer IL-12 aktiviteten, se eksemplene 4, 12 og 14. Her foreslås bruk av humaniserte antistoffer for å oppnå redusert immunogenitet hos menneske.

Antistoffer fra ikkehumane pattedyr, kimære antistoffer, polyklonale antistoffer (for eksempel antisera) og/eller monoklonale antistoffer (Mab) og fragmenter av disse (for eksempel proteolytiske spaltingsprodukter eller fusjonsproteinprodukter) av disse er mulige terapeutiske midler som i noen tilfeller undersøkes i forsøk på å behandle visse sykdommer. Slike antistoffer eller fragmenter kan imidlertid utløse en immunrespons ved tilførsel til mennesker. En slik immunrespons kan føre til en immunkompleksformidlet fjerning av antistoffene eller fragmentene fra sirkulasjonen og gjøre gjentatt tilførsel uegnet for behandling, hvorved den terapeutiske nytten for pasienten reduseres og gjentatt tilførsel av antistoffet eller fragmentet begrenses. For eksempel kan gjentatt tilførsel av antistoffer eller fragmenter som omfatter ikkehumane deler, føre til serumsyke og/eller anafylaksi. For å unngå disse og andre problemer har en rekke tilnærminger blitt benyttet for å redusere immunogenisiteten av slike antistoffer og deler av disse, innbefattet kimerisering og humanisering, som velkjent innen faget. Disse og andre tilnærminger kan imidlertid fortsatt føre til antistoffer eller fragmenter med en viss immunogenisitet, lav affinitet, lav aviditet eller med problemer i cellekultur, oppskalering, fremstilling og/eller lave utbytter. Slike antistoffer eller fragmenter kan således være mindre enn ideelt egnet for fremstilling eller anvendelse som terapeutiske proteiner.

20

Det foreligger således et behov for tilveiebringelse av anti-IL-12-antistoffer eller fragmenter som overvinner ett eller flere av disse problemene, så vel som forbedringer relativt til kjente antistoffer eller fragmenter derav.

25

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer nukleinsyre som koder for minst ett mammalsk anti-IL-12 antistoff med et tungkjede-variabelt område som omfatter SEQ ID NO:7 og ett lettkjede-variabelt område som omfatter SEQ ID NO:8.

30

Foreliggende oppfinnelse omfatter også prokaryotisk eller eukaryotisk vertscelle, omfattende nukleinsyren ifølge krav 1.

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse mammalsk anti-IL-12 antistoff, omfattende et tungkjede-variabelt område som omfatter SEQ ID NO:7 og et lettkjede-variabelt område som omfatter SEQ ID NO:8.

35

Omfattet av foreliggende oppfinnelse er også sammensetning, omfattende (a) et antistoff ifølge ett av kravene 3-5 og (b) en farmasøytisk akseptabel bærer eller et fortynningsmiddel.

- 5 Nevnte antistoff eller sammensetning anvendes i følge oppfinnelsen ved diagnose eller behandling . Nevnte behandling omfatter psoriasis, psoriatisk artritt, sarkidose eller morbus Crohn patologi.

- Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer minst ett isolert anti-IL-12-antistoff som
 10 beskrevet heri. Antistoffet kan omfatte ethvert protein- eller peptidholdig molekyl som omfatter i det minste en del av et immunglobulinmolekyl, for eksempel, minst ett komplementaritetsbestemmende område (CDR) fra en tungkjede eller lettkjede eller en ligandbindende del derav, et variabelt område fra en tungkjede eller lettkjede, et konstant område fra en tungkjede eller en lettkjede, et rammeverksområde eller enhver
 15 del derav, som kan innføres i et antistoff. Et antistoff ifølge oppfinnelsen kan omfatte eller være avledet fra ethvert pattedyr, for eksempel, men ikke begrenset til, et menneske, en mus, en kanin, en rotte, en gnager eller en primat. Kombinasjoner derav og liknende er også mulig.

20 **Side 3 i originalen mangler her**

- Isolerte nukleinsyremolekyler som omfatter, kan være komplementære til eller hybridiserer til, et polynukleotid som koder for minst ett IL-12-antiidiotype antistoff, og som omfatter minst én spesifisert sekvens, ett doméne, en del eller en variant derav.
 25 Rekombinante vektorer som omfatter disse IL-12-antiidiotype antistoffkodende nukleinsyremolekylene, vertsceller som inneholder slike nukleinsyrer og/eller rekombinante vektorer, så vel som fremgangsmåter for fremstilling og/eller anvendelse av slike antiidiotype antistoffnukleinsyrer, vektorer og/eller vertsceller er også mulig og fremstille.

- 30 Foreliggende oppfinnelse omfatter ekspresjon av minst ett anti-IL-12-antistoff i en vertscelle, som omfatter dyrking av en vertscelle som beskrevet heri under betingelser hvor minst ett anti-IL-12-antistoff uttrykkes i påvisbare og/eller gjenvinnbare mengder.

- 35 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også minst én sammensetning som omfatter (a) en isolert anti-IL-12-antistoffkodende nukleinsyre og/eller et antistoff som beskrevet heri, og (b) et egnet bærestoff eller fortynningsmiddel. Bærestoffet eller

fortynningsmiddelet kan om ønskelig være farmasøytisk aksepterbart, ut fra kjente bærestoffer eller fortynningsmidler. Sammensetningen kan om ønskelig videre omfatte en annen forbindelse, et protein eller en sammensetning.

- 5 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre minst én anti-IL-12-sammensetning for tilførsel av en terapeutisk mengde for modulering eller behandling av minst én IL-12-forbundet tilstand i en celle, et vev, et organ, et dyr eller en pasient, og/eller før, etter eller under en beslektet tilstand, som beskrevet heri.
- 10 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også en sammensetning, for tilførsel av en terapeutisk eller profylaktisk, effektiv mengde av minst ett anti-IL-12-antistoff, ifølge foreliggende oppfinnelse.

15 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre en anti-IL-12- antistoffsammensetning for diagnose av minst én IL-12-forbundet tilstand i en celle, et vev, et organ, et dyr eller en pasient og/eller før, etter eller under en IL-12-forbundet tilstand som beskrevet heri.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også en sammensetning for diagnostisk tilførsel av minst ett anti-IL-12-antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse.

20

BESKRIVELSE AV FIGURENE

Figurene 1A og 1B er kurver som viser konsentrasjonsavhengig binding av humane anti-IL-12-mAb til immobilisert humant IL-12. Anti-IL-12-antistoffer ble seriefortynnet i 1% BSA/PBS og inkubert på rhIL-12-belagte plater i en time ved 37 °C. Platene ble vasket to ganger med 0,02% Tween 20 (polyoksyetylen(20)-sorbitanmonolaurat), 0,15 M NaCl og så analysert med pepperrotperoksydase (HRP)-merket anti-human-IgG kappa-spesifikt antistoff fra geit i en time ved romtemperatur. Platene ble vasket igjen og fremkalt med o-fenylendiamin (OPD)-substrat, og den optiske tetthet (OD) i hver brønn ble målt ved 490 nm.

25

30

Figur 2: Sporene fra venstre til høyre i figurene A og B inneholder humant IL-12, humant IL-12 p40, IL-12 fra mus og forfargete molekulvektsmarkører. Figur 2A viser bånd farget fra totalprotein. Primærbåndene i hvert spor er humant IL-12 (75 kd), p40 humant IL-12 (40 kd) og IL-12 fra mus (75 kd). Figur 2B viser et western blot fremstilt fra en gel som var identisk med den vist i figur 2A. Blottet fikk reagere med C340, fulgt av HRP-merket anti-humant IgG fra geit, og påviste spesifikt kun humant IL-12

35

(monomer og multimerer) og humant IL-12 p40. Et kontrollblot (ikke vist) behandlet med HRP-merket anti-humant IgG fra geit viste ingen bånd.

Figur 3: Revers transkripsjon-PCR-analyse av IFN- γ -genekspresjonen i humane PBL behandlet med IL-2, IL-12, IL-2+IL-12 med og uten anti-IL-12-antistoff C340, 8.6.2, isotypekontrollantistoff. Total-RNA ble reverstranskribert og amplifisert ved PCR ved anvendelse av genspesifikke primere. Nivået av β -aktin-mRNA i hver prøve ble også bestemt, og dette fungerte som kontroll av mRNA-integritet og -innhold.

Figur 4 er et histogram som viser at humant anti-IL-12-mAb (C340) inhiberer dannelse av interferon- γ (IFN γ) ved monocyttrfrie mononukleære CD3⁺-celler fra perifert blod (PBMC), stimulert med IL-2 pluss IL-12. PBMC ble dyrket i 5 timer i kontrollmedium (uten tilsatte cytokiner), medium tilsatt IL-12 (0,1 ng/ml) pluss IL-2 (50 IU/ml) (IL-12/IL-2), kontrollmedium tilsatt mAb C340 (10 μ g/ml) og IL-12/IL-2- medium tilsatt mAb C340 (10 μ g/ml). Intracellulært IFN γ ble målt ved tofargers immunfarging med CD3-PE og IFN γ -FITC. Resultater er vist for en donor.

Figur 5 er en kurve som viser doseavhengig inhibering av IFN γ -utskilling fra lymfocytter fra perifert blod, stimulert med IL-2 pluss IL-12 med to forskjellige fremstillinger av et humant anti-IL-12-mAb (C340). Humane PBL (8×10^6 /ml) ble dyrket i 24 timer med 10 U/ml IL-2, IL-2 pluss 400 pg/ml IL-12 eller IL-2 pluss IL-12 og mAb C340 som angitt. Dyrkingssupernatantene ble fjernet og analysert for IFN γ ved EIA.

Figur 6 er et histogram som viser doseavhengig inhibering av IL-12 pluss IL-2-indusert LAK-cellecytotoksitet ved humant anti-IL-12-mAb (C340). LAK-effektorceller (humane PBL, 8×10^6 /ml) ble dyrket i 24 timer med IL-12 (400 pg/ml) pluss IL-2 (10 U/ml) og mAb C340 (5000 ng/ml eller 50 ng/ml som angitt). LAK-effektorcellene ble vasket og dyrket med ⁵¹Cr-merkete Raji-målceller i 4 timer ved et forhold mellom effektor og mål (E:T) på 80:1, og mengden ⁵¹Cr frigitt til mediet etter lysering av Raji-cellene ble målt. Resultatene er angitt som middelerdien fra tre normale donorer og standardfeil. IL-12 positiv kontroll (IL-12) er effektorceller inkubert med IL-12 og uten antistoff. Bakgrunn (BKGD) er effektorceller inkubert uten IL-12 eller antistoff.

Figurene 7A og 7B er histogrammer som viser at IL-12 pluss IL-2-indusert ekspresjon av CD95 på mononukleære CD3⁺-celler fra perifert blod inhiberes av humant anti-IL-12-mAb (C340). PBMC ble dyrket i 72 timer i medium tilsatt 0,1 ng/ml IL-12 og en

suboptimal dose av IL-2 (50 IU/ml) i nærvær eller fravær av mAb C340 (10 µg/ml). CD95-ekspresjonen ble målt ved flowcytometri av celler farget med anti-CD95-FITC. Sorteringen ble utført ved anvendelse av tofargersanalyse (CD3 eller CD56-PE og CD95-FITC) og fremre sammenliknet med ortogonal lysspredning.

5

Figur 8 er en kurve som viser at rekombinante, humane anti-humant IL-12-antistoffer (rC340) bindes til immobilisert IL-12 på en måte som ikke kan skilles fra bindingen av rensset mAb C340. Konsentrasjonen av rC340 i supernatanten fra tre rC340-produserende rekombinante cellelinjer ble bestemt, og supernatantene ble analysert for IL-12-binding i en ELISA. Plater ble belagt med 2 µg/ml humant IL-12 og inkubert med rensset mAb C340 fra den opprinnelige hybridom (standard) eller supernatant fra de rekombinante cellelinjene. IL-12-bundet antistoff ble påvist ved anvendelse av anti-humant IgG (tungkjede pluss lettkjede) fra geit konjugert til alkalisk fosfatase.

10

Figurene 9A-9C er kurver som viser vekstkinetikk og mengden utskilt antistoff for tre uavhengig utledete rC340-produserende rekombinante cellesubkloner (figur 9A: subklon C379B, figur 9B: subklon C381A, figur 9C: subklon C389A). Rekombinante celler ble utsådd i T75-flasker ved en utgangstetthet på 2×10^5 celler/ml i standard medium. På forskjellige tidspunkter ble cellene resuspendert, og antall levende celler og mengden (µg/ml) av rC340 i mediet ble bestemt.

20

BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer isolerte, rekombinante anti-IL-12-antistoffer fra menneske, primater, gnagere og pattedyr, kimære, humaniserte antistoffer så vel som sammensetninger og kodende nukleinsyremolekyler som omfatter minst ett polynukleotid som koder for minst ett anti-IL-12-antistoff. Foreliggende oppfinnelse omfatter videre, anvendelse av slike nukleinsyrer og antistoffer, innbefattet diagnostiske og terapeutiske sammensetninger.

30

Som anvendt heri omfatter et "anti-Interleukin-12-antistoff", "anti-IL-12-antistoff", "anti-IL-12-antistoffdel" eller "anti-IL-12-antistofffragment" og/eller "anti-IL-12-antistoffvariant og liknende ethvert protein- eller peptidholdig molekyl som omfatter minst en del av et immunglobulinmolekyl, for eksempel, men ikke begrenset til, minst ett komplementaritetsbestemmende område (CDR) fra en tungkjede eller lettkjede eller en ligandbindende del derav, et variabelt område fra en tungkjede eller lettkjede, et konstant område fra en tungkjede eller lettkjede, et rammeverksområde eller enhver del

35

derav, eller minst én del av en IL-12-reseptor eller et IL-12-bindende protein, som kan innføres i et antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse. Et slikt antistoff påvirker om ønskelig videre en spesifikk ligand, for eksempel, hvor et slikt antistoff modulerer, reduserer, forhøyer, antagoniserer, agoniserer, formidler, letter, blokkerer, inhiberer, fjerner og/eller interfererer med minst én IL-12-aktivitet eller -binding, eller med IL-12-reseptoraktivitet eller -binding *in vitro*, *in situ* og/eller *in vivo*. Som et ikke-begrensende eksempel kan et egnet anti-IL-12-antistoff, en spesifisert del eller en variant derav, binde minst ett IL-12 eller spesifiserte deler, varianter eller doméner derav. Et egnet anti-IL-12-antistoff, en spesifisert del eller en variant derav, kan også om ønskelig påvirke minst én IL-12-aktivitet eller -funksjon, for eksempel, RNA-, DNA- eller proteinsyntese, IL-12-frigivning, IL-12-reseptorsignalisering, spalting av IL-12 i membranen, IL-12-aktivitet, IL-12-dannelse og/eller syntese. Begrepet "antistoff" er videre ment å omfatte antistoffer, spaltingsfragmenter, spesifiserte deler og varianter derav, innbefattet antistoffetterliknende molekyler eller omfattende deler av antistoffer som etterlikner struktur og/eller funksjon av et antistoff eller et spesifisert fragment eller en del derav, innbefattet enkeltkjedete antistoffer og fragmenter av disse. Funksjonelle fragmenter omfatter antigenbindende fragmenter som binder til IL-12 fra et pattedyr. For eksempel kan antistofffragmenter som kan bindes til IL-12 eller deler derav innbefattet Fab (for eksempel ved papainspalting), Fab' (for eksempel ved pepsinspalting og partiell reduksjon) og F(ab')₂ (for eksempel ved pepsinspalting), facb (for eksempel ved plasminspalting), pFc' (for eksempel ved pepsin- eller plasminspalting), Fd (for eksempel ved pepsinspalting, partiell reduksjon og reaggregering), Fv eller scFv (for eksempel ved molekylærbiologiske teknikker)-fragmenter av oppfinnelsen (se for eksempel Colligan, Immunology, supra).

Slike fragmenter kan fremstilles ved enzymatisk spalting, synteseteknikker eller rekombinante teknikker, som kjent innen faget og/eller som beskrevet heri. Antistoffer kan også fremstilles i en rekke avkortete former ved anvendelse av antistoffgener i hvilke ett eller flere stoppkodoner har blitt innført oppstrøms for det naturlige stoppsetet. Det kan for eksempel utformes et kombinasjonsgen som koder for en F(ab')₂-tungkjededel slik at det omfatter DNA-sekvenser som koder for CH₁-doménet og/eller hengselområdet i tungkjeden. De forskjellige deler av antistoffer kan sammenkobles kjemisk ved konvensjonelle teknikker eller fremstilles som et kontinuerlig protein ved anvendelse av genetiske modifiseringsteknikker.

Som anvendt heri viser begrepet "humant antistoff" til et antistoff hvor i det vesentlige hver del av proteinet (for eksempel CDR, rammeverk, C_L, C_H-doméner (for eksempel

C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}), hengsel (V_L, V_H)) er i det vesentlige ikke-immunogent i mennesker, med kun mindre sekvensendringer eller variasjoner. På tilsvarende måte betegner antistoffer fra primater (ape, bavian, sjimpanse og så videre), gnager (mus, rotte, kanin, marsvin, hamster og liknende) og andre pattedyr antistoffer som er spesifikke for slike arter, underslekter, slekter, underfamilier eller familier. Videre omfatter kimære antistoffer enhver kombinasjon av de ovenfor angitte. Slike endringer eller variasjoner vil om ønskelig eller fortrinnsvis bibeholde eller redusere immunogenisiteten i mennesker eller andre arter relativt til ikke-modifiserte antistoffer. Således er et humant antistoff forskjellig fra et kimært eller humanisert antistoff. Det bør påpekes at et humant antistoff som dannes av et ikke-menneskelig dyr eller en prokaryot eller eukaryot celle som kan uttrykke funksjonelt rearrangerte, humane immunglobulingener (for eksempel tungkjedegener og/eller lettkjedegener). Dersom et humant antistoff er et enkeltkjedet antistoff, kan det videre omfatte et linkerpeptid som ikke forefinnes i native, humane antistoffer. For eksempel kan et Fv omfatte et linkerpeptid, for eksempel mellom to og tilnærmet åtte glysinrester eller andre aminosyrerester, som sammenbinder tungkjedens og lettkjedens variable område. Slike linkerpeptider ansees å være av humant opphav.

Bispesifikke, heterospesifikke, heterokonjugerte eller tilsvarende antistoffer, kan også anvendes, dvs. monoklonale, fortrinnsvis humane eller humaniserte, antistoffer som har bindingsspesifisitet overfor minst to forskjellige antigener. I det foreliggende tilfellet er en av bindingsspesifisitetene for minst ett IL-12-protein, mens den andre er for ethvert annet antigen. Fremgangsmåter for fremstilling av bispesifikke antistoffer er kjente innen faget. Tradisjonelt bygger rekombinant fremstilling av bispesifikke antistoffer på samtidig ekspresjon av to immunglobulintungkjede-lettkjedepar, hvor de to tungkjedene har ulik spesifisitet (Milstein og Cuello, Nature 305:537 (1983)). Grunnet den tilfeldige fordeling av immunglobulintungkjeder og -lettkjeder danner disse hybridomene (kvadromene) en mulig blanding av 10 forskjellige antistoffmolekyler, av hvilke kun ett har den korrekte, bispesifikke struktur. Rensing av det korrekte molekyl, noe som vanligvis utføres ved affinitetskromatografitrinn, er temmelig komplisert, og produktutbyttet er lavt. Tilsvarende fremgangsmåter beskrives for eksempel i WO 93/08829, U.S. patentskrifter numrene 6 210 668, 6 193 967, 6 132 992, 6 106 833, 6 060 285, 6 037 453, 6 010 902 5 989 530, 5 959 084, 5 959 083, 5 932 448, 5 833 985, 5 821 333, 5 807 706, 5 643 759, 5 601 819, 5 582 996, 5 496 549, 4 676 980, WO 91/00360, WO 92/00373, EP 03089, Traunecker et al., EMBO J. 10:3655 (1991), og Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210 (1986). Anti-IL-12-antistoffer (også betegnet IL-12-antistoffer) som er anvendbare i fremgangsmåtene og

sammensetningene ifølge foreliggende oppfinnelse, kan om ønskelig særpreges ved høyaffinitetsbinding til IL-12 og, om ønskelig og fortrinnsvis, ved lav toksisitet. Nærmere bestemt er et antistoff, et spesifisert fragment eller en variant ifølge oppfinnelsen, hvori de enkelte bestanddeler, for eksempel det variable området, det konstante området og rammeverket, enkeltvis og/eller samlet om ønskelig og fortrinnsvis, besitter lav immunogenisitet anvendbart i foreliggende oppfinnelse. Antistoffene som kan anvendes i oppfinnelsen er om ønskelig karakterisert ved sin evne til å behandle pasienter over lengre tidsrom med målbar lindring av symptomer og lav og/eller akseptbar toksisitet. Lav eller akseptbar immunogenisitet og/eller høy affinitet, så vel som andre egnede egenskaper, kan bidra til de oppnådde terapeutiske resultater. "Lav immunogenisitet" defineres heri som utløsning av signifikante HAHA-, HACA- eller HAMA-responser hos mindre enn tilnærmet 75% eller fortrinnsvis mindre enn tilnærmet 50% av pasientene som behandles og/eller utløsning av lave titere i den behandlede pasient (mindre enn tilnærmet 300, fortrinnsvis mindre enn tilnærmet 100, målt med en dobbelt antigen-enzymimmunanalyse) (se for eksempel Elliott et al., *Lancet* 344:1125-1127 (1994)).

Anvendbarhet

De isolerte nukleinsyrene ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes for fremstilling av minste ett anti-IL-12-antistoff som kan anvendes for å måle eller oppnå i en celle, et vev, et organ eller et dyr (innbefattet pattedyr og mennesker), for å diagnostisere eller behandle, eller redusere symptomene på minst en IL-12-tilstand. Disse tilstandene kan være utvalgt fra minst en av en immunforstyrrelse eller -sykdom, en hjertekarforstyrrelse eller -sykdom, en infeksøs, ondartet og/eller nevrologisk forstyrrelse eller sykdom, eller en annen kjent eller spesifisert IL-12-forbundet tilstand.

En slik fremgangsmåte kan omfatte tilførsel av en effektiv mengde av en sammensetning eller et farmasøytisk preparat som omfatter minst ett anti-IL-12-antistoff til en celle, et vev, et organ, et dyr eller en pasient med behov for slik modulering, behandling, lindring, forebyggelse eller reduksjon av symptomer, virkninger eller mekanismer. Den effektive mengde kan omfatte en mengde på mellom tilnærmet 0,001 og 500 mg/kg pr. enkeltvis (for eksempel bolus) multiple eller kontinuerlige tilførsel, eller for oppnåelse av en serumkonsentrasjon på 0,01-5000 µg/ml pr. enkeltvis, multiple eller kontinuerlige tilførsel eller ethvert effektivt område eller verdi deri, utført og bestemt ved anvendelse av kjente fremgangsmåter, som beskrevet heri eller som kjent innen relevante fag.

Antistoffer ifølge foreliggende oppfinnelse

Minst ett anti-IL-12-antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse kan om ønskelig produseres av en cellelinje, en blandet cellelinje, en immortalisert celle eller en klonal populasjon av immortaliserte celler, som er velkjent innen faget. Se for eksempel

5 Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. utg., Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, *antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan et al., red., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., *Current Protocols in Protein*

10 *Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001). Humane antistoffer som er spesifikke for humane IL-12-proteiner eller fragmenter derav, kan frembringes mot et egnet immunogent antigen, for eksempel isolert og/eller IL-12-protein eller en del derav (innbefattet syntetiske molekyler, for eksempel syntetiske peptider). Andre spesifikke eller generelle pattedyrsantistoffer kan frembringes på tilsvarende måte. Fremstilling av

15 immunogene antigener og dannelsen av monoklonalt antistoff kan utføres ved anvendelse av enhver egnet teknikk.

I en tilnærming dannes en hybridom ved å fusjonere en egnet immortalisert cellelinje (for eksempel en myelomcellelinje som, men ikke begrenset til Sp2/0, Sp2/0-AG14,

20 NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, >243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIWA, NEURO 2A eller liknende, eller heteromyelomer, fusjonsprodukter derav eller enhver celle eller fusjonert celle avledet derfra, eller enhver annen egnet cellelinje som er kjent innen faget, se for

25 eksempel www.atcc.org, www.lifetech.com, og lignende, og antistoffproduserende celler, for eksempel, men ikke begrenset til, isolerte eller klonete miltceller, celler fra perifert blod, lymfeceller, tonsilceller eller andre immun- eller B-celleholdige celler, eller hvilke som helst andre celler som uttrykker konstante sekvenser, variable sekvenser, rammeverkssekvenser eller CDR-sekvenser fra tungkjede eller lett kjede,

30 enten som en endogen eller heterolog nukleinsyre, som rekombinant DNA eller endogent DNA, viralt DNA, bakterie-DNA, alge-DNA, prokaryot-DNA, amfibie-DNA, insekt-DNA, reptil-DNA, fiske-DNA, pattedyrs-DNA, gnager-DNA, heste-DNA, saue-DNA, geite-DNA, saue-DNA, primat-DNA, eukaryot-DNA, genomisk DNA, cDNA, rDNA, mitokondrielt DNA eller RNA, kloroplast-DNA eller -RNA, hnRNA, mRNA,

35 tRNA, enkelttrådet, dobbelttrådet eller trippeltrådet, hybridisert eller liknende eller enhver kombinasjon derav. Se for eksempel Ausubel, supra, og Colligan, *Immunology*, supra, kapittel 2.

Antistoffproduserende celler kan også erholdes fra perifert blod eller, fortrinnsvis, fra milt eller lymfeknuder hos mennesker eller andre egnede dyr som har blitt immunisert med antigenet av interesse. Enhver annen vertscelle kan også anvendes for ekspresjon av heterolog eller endogen nukleinsyre som koder for et antistoff eller et spesifisert fragment eller en variant derav ifølge foreliggende oppfinnelse. De fusjonerte cellene (hybridomene) eller de rekombinante cellene, kan isoleres ved anvendelse av selektive dyrkingsbetingelser eller andre egnede, kjente fremgangsmåter og klones ved grensefortynning, cellesortering eller enhver annen kjent fremgangsmåte. Celler som danner antistoffer med den ønskede spesifisitet kan utvelges ved en egnet analyse (for eksempel ELISA).

Andre egnete fremgangsmåter for fremstilling eller isolering av antistoffer med den påkrevde spesifisitet, kan anvendes, innbefattet, men ikke begrenset til fremgangsmåter som selekterer rekombinant antistoff fra et peptid- eller proteinbibliotek (for eksempel, men ikke begrenset til et bakteriofagfremvisningsbibliotek, et ribosomfremvisningsbibliotek, et oligonukleotidfremvisningsbibliotek, et RNA-fremvisningsbibliotek, et cDNA-fremvisningsbibliotek eller liknende, for eksempel som tilgjengelig fra Cambridge antibody Technologies, Cambridgeshire. UK; MorphoSys, Martinsreid/Planegg, DE; Biovation, Aberdeen, Skottland, UK; BioInvent, Lund, Sverige; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Xoma, Berkeley, CA; Ixsys. Se for eksempel EP368 684, PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; PCT/GB92/002240; PCT/GB92/00883; PCT/GB93/00605; US 08/350260(5/12/94); PCT/GB94/01422; PCT/GB94/02662; PCT/GB97/01835; (CAT/MRC); WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; PCT/US94/1234; WO92/18619; WO96/07754; (Scripps); EP614 989 (MorphoSys); WO95/16027 (BioInvent); WO88/06630; WO90/3809 (Dyax); US 4 704 692 (Enzon); PCT/US91/02989 (Affymax); WO89/06283; EP371 998; EP550 400; (Xoma);

EP229 046; PCT/US91/07149 (Ixsys); eller stokastisk fremstilte peptider eller proteiner - US patentskrift numrene 5 723 323, 5 763 192, 5 814 476, 5 817 483, 5 824 514, 5 976 862, WO 86/05803, EP590 689 (Ixsys, nå Applied Molecular Evolution (AME), eller som bygger på immunisering av transgene dyr (for eksempel SCID-mus, Nguyen et al., Microbiol. Immunol. 41:901-907 (1997); Sandhu et al., Crit. Rev. Biotechnol. 16:95-118 (1996); Eren et al., Immunol. 93:154-161 (1998), som kan frembringe et repertoar av humane antistoffer, som kjent innen faget og/eller som beskrevet heri. Slike teknikker omfatter, men er ikke begrenset til, ribosomfremvisning Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4937-4942 (mai 1997); Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci.

USA, 95:14130-14135 (nov. 1998)); teknikker for fremstilling av antistoff fra enkeltceller (for eksempel utvalgt lymfocytantistoff-fremgangsmåten ("SLAM") (U.S. pat. nr. 5 627 052, Wen et al., J. Immunol. 17:887-892 (1987); Babcook et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 93:7843-7848 (1996)); gel-mikrodråper og "flow"-cytometri (Powell et al., Biotechnol. 8:333-337 (1990); One Cell Systems, Cambridge, M. A.; Gray et al., J. Imm. Meth. 182:155-163 (1995); Kenny et al., Bio/Technol. 13:787-790 (1995)); B-celleseleksjon (Steenbakkers et al., Molec. Biol. Reports 19:125-134 (1994); Jonak et al., Progress Biotech, bind 5, In Vitro Immunization in Hybridoma Technology, Borrebaeck, red., Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, Nederland (1988)).

10

Fremgangsmåter for modifisering eller humanisering av ikke-humane eller humane antistoffer kan også anvendes og er velkjente innen faget. Generelt har et humanisert eller modifisert antistoff en eller flere aminosyrerester fra en kilde som ikke er et menneske, for eksempel, men ikke begrenset til mus, rotte, kanin, en ikke-human primat eller et annet pattedyr. Disse humane aminosyrerestene betegnes ofte "import"-rester som typisk tas fra et variabelt, konstant eller annet "import"-doméne fra en kjent human sekvens. Kjente, humane Ig-sekvenser beskrives for eksempel i

15

www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html;
www.sciquest.com/;

20

www.abcam.com/;
www.antibodyresource.com/onlinecomp.html;
www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html;
www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html;
www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm;

25

www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html;
www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/;
www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html;
www.antibodyresource.com/;

30

mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html. www.immunologylink.com/;
pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html;
www.biotech.ufl.edu/~hcl/;
www.pebio.com/pa/340913/340913.html;
www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/;
www.m.chime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html;

35

www.biodesign.com/table.asp;
www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html;
www.biotech.ufl.edu/~fccl/protocol.html;

- www.isac-net.org/sites_geo.html;
aximtl.imt.uni-marburg.de/~rek/AEPStart.html;
baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.html;
www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/;
5 www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html;
www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html;
imgt.cnusc.fr:8104/;
www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/;
abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html;
10 www.unizh.ch/~honegger/AHOseminar/Slide01.html;
www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/;
www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm;
www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html;
www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html;
15 www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html;
www.cryst.bioc.cam.ac.uk/~fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html;
www.jerini.de/fr_products.htm;
www.patents.ibm.com/ibm.html. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983). Slike importerte sekvenser kan anvendes for å
20 redusere immunogenisiteten eller redusere, forsterke eller modifisere binding, affinitet, på-hastighet, av-hastighet, aviditet, spesifisitet, halveringstid eller enhver annen egnet egenskap, som kjent innen faget. Generelt beholdes deler av eller alle de ikkehumane eller humane CDR-sekvensene, mens de ikkehumane sekvenser i de variable og konstante områder erstattes med humane sekvenser eller andre aminosyrer. Antistoffer
25 kan også om ønskelig humaniseres med opprettholdelse av høy affinitet for antigenet og andre fordelaktige biologiske egenskaper. For å oppnå dette kan humaniserte antistoffer om ønskelig fremstilles ved en prosess som omfatter analyse av utgangssekvensene og forskjellige mulige humaniserte produkter ved anvendelse av tredimensjonale modeller av utgangssekvensen og de humaniserte sekvensene. Tredimensjonale
30 immunglobulinmodeller er vanlig tilgjengelige og velkjente blant fagfolk. Dataprogrammer som illustrerer og fremviser mulige tredimensjonale konformasjonsstrukturer for utvalgte immunglobulinsekvenskandidater er tilgjengelige. En betraktning av de fremviste strukturer tillater analyse av de forskjellige aminosyreresters sannsynlige rolle i kandidatimmunglobulinsekvensens funksjon, dvs.
35 analyse av aminosyrerester som påvirker evnen til immunglobulinkandidaten til å binde sitt antigen. På denne måte kan FR-rester utvelges og kombineres fra konsensussekvens og importsekvens slik at den ønskete antistoffegenskap, for eksempel forhøyet affinitet

- ovenfor målantigenet eller -antigenene, oppnås. Generelt deltar CDR-aminosyrerestene direkte og i mest avgjørende grad når det gjelder påvirkning av antigenbinding. Humanisering eller modifisering av antistoffer ifølge foreliggende oppfinnelse kan utføres ved enhver kjent fremgangsmåte, for eksempel, men ikke begrenset til
- 5 fremgangsmåtene som beskrives i Winter (Jones et al., *Nature* 321:522 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323 (1988); Verhoeyen et al., *Science* 239:1534 (1988)), Sims et al., *J. Immunol.* 151: 2296 (1993); Chothia og Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987), Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993), U.S. patent nr.: 5 723 323, 5 976 862, 5 824 514,
- 10 5 817 483, 5 814 476, 5 763 192, 5 723 323, 5 766 886, 5 714 352, 6 204 023, 6 180 370, 5 693 762, 5 530 101, 5 585 089, 5 225 539, 4 816 567, PCT/: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP229246.
- 15 Anti-IL-12-antistoffet kan også om ønskelig frembringes ved immunisering av et transgent dyr (for eksempel en mus, rotte, hamster, ikke-human primat og liknende) som kan danne et repertoar av humane antistoffer, som beskrevet heri og/eller som kjent innen faget. Celler som danner et humant anti-IL-12-antistoff kan isoleres fra slike dyr og immortaliseres ved anvendelse av egnete fremgangsmåter, for eksempel
- 20 fremgangsmåtene som beskrives heri.
- Transgene mus som kan danne et repertoar av humane antistoffer som bindes til humane antigener, kan fremstilles ved kjente fremgangsmåter (for eksempel, men ikke begrenset til, U.S. patentskrifter numrene 5 770 428, 5 569 825, 5 545 806, 5 625 126,
- 25 5 625 825, 5 633 425, 5 661 016 og 5 789 650, tildelt til Lonberg et al.; Jakobovits et al., WO 98/50433, Jakobovits et al., WO 98/24893, Lonberg et al., WO 98/24884, Lonberg et al., WO 97/13852, Lonberg et al., WO 94/25585, Kucherlapate et al., WO 96/34096, Kucherlapate et al., EP 0463151 B1, Kucherlapate et al., EP 0710719 A1, Surani et al., U.S. pat. nr. 5 545 807, Bruggemann et al., WO 90/04036,
- 30 Bruggemann et al., EP 0438474 B1, Lonberg et al., EP 0814259 A1, Lonberg et al., GB 2272440 A, Lonberg et al., *Nature* 368:856-859 (1994), Taylor et al., *Int. Immunol.* 6(4):579-591 (1994), Green et al., *Nature Genetics* 7:13-21 (1994), Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Taylor et al., *Nucleic Acids Research* 20(23):6287-6295 (1992), Tuailon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 90(8):3720-3724 (1993),
- 35 Lonberg et al., *Int Rev Immunol* 13(1):65-93 (1995) og Fishwald et al., *Nat Biotechnol* 14(7):845-851 (1996)). Generelt inneholder disse musene minst ett transgen som omfatter DNA fra minst ett humant immunglobulin locus som er funksjonelt rearrangert

eller som kan gjennomgå funksjonell rearrangering. De endogene immunglobulin loci i slike mus kan være oppbrutt eller delert for å fjerne dyrets evne til å danne antistoffer som kodes av endogene gener.

- 5 Analyse av antistoffer for spesifikk binding til liknende proteiner eller fragmenter kan enkelt oppnås ved anvendelse av peptidfremvisningsbiblioteker. Denne fremgangsmåten omfatter gjennom søking av store peptidsamlinger for enkeltmedlemmer med den ønskete funksjon eller struktur. Gjennom søking av peptidfremvisningsbiblioteker ved hjelp av antistoff, er velkjent innen faget. De
- 10 fremstilte peptidsekvensene kan være fra 3 til 5000 eller flere aminosyrer lange, hyppig fra 5-100 aminosyrer lange, og ofte fra tilnærmet 8 til 25 aminosyrer lange. I tillegg til fremgangsmåter for direkte kjemisk syntese for frembringelse av peptidbiblioteker, har flere rekombinante DNA-fremgangsmåter blitt beskrevet. En type omfatter fremvisning av en peptidsekvens på overflaten av en bakteriofag eller celle. Hver bakteriofag eller
- 15 celle inneholder nukleotidsekvensen som koder for den fremviste peptidsekvens. Slike fremgangsmåter beskrives i PCT-patentskrifter numrene 91/17271, 91/18980, 91/19818 og 93/08278. Andre systemer for frembringelse av biblioteker over peptider har innslag av både *in vitro* kjemisk syntese og rekombinante fremgangsmåter. Se PCT-patentskrifter numrene 92/05258, 92/14843 og 96/19256. Se også U.S. patentskrifter
- 20 numrene 5 658 754 og 5 643 768. Peptidfremvisningsbiblioteker, vektorer og analysesett er kommersielt tilgjengelige fra leverandører som Invitrogen (Carlsbad, CA), og Cambridge Antibody Technologies (Cambridgeshire, UK). Se for eksempel U.S. patentskrifter numrene 4 704 692, 4 939 666, 4 946 778, 5 260 203, 5 455 030, 5 518 889, 5 534 621, 5 656 730, 5 763 733, 5 767 260, 5 856 456, tildelt Enzon;
- 25 5 223 409, 5 403 484, 5 571 698, 5 837 500, tildelt Dyax, 5 427 908, 5 580 717, tildelt Affymax; 5 885 793, tildelt Cambridge antibody Technologies; 5 750 373, tildelt Gentech, 5 618 920, 5 595 898, 5 576 195, 5 698 435, 5 693 493, 5 698 417, tildelt Xoma, Colligan, *supra*; Ausubel, *supra*; eller Sambrook, *supra*. Antistoffer ifølge foreliggende oppfinnelse kan også fremstilles ved anvendelse av minst én anti-IL-12-
- 30 antistoffkodende nukleinsyre for erholdelse av transgene dyr eller pattedyr, for eksempel geiter, kuer, hester, sauer og liknende, som danner slike antistoffer melken. Slike dyr kan erholdes ved anvendelse av kjente fremgangsmåter, se for eksempel, men ikke begrenset til, U.S. patentskrifter numrene 5 827 690; 5 849 992; 4 873 316; 5 849 992; 5 994 616; 5 565 362; 5 304 489. Antistoffer ifølge foreliggende oppfinnelse kan i
- 35 tillegg fremstilles ved anvendelse av minst én anti-IL-12-antistoffkodende nukleinsyre for tilveiebringelse av transgene planter og dyrkede planteceller (for eksempel, men ikke begrenset til, tobakk og mais) som danner slike antistoffer, spesifiserte deler eller

varianter derav i platedelene eller i de dyrkede plantecellene. Som et eksempel har transgene tobakkblader som uttrykker rekombinante proteiner med hell blitt anvendt for erholdelse av store mengder rekombinante proteiner, for eksempel ved anvendelse av en induserbar promoter. Se for eksempel Cramer et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 5 240:95-118 (1999) og referanser som siteres deri. Videre har transgen mais blitt anvendt for ekspresjon av pattedyrproteiner i et kommersielt produksjonsnivå, med biologisk aktivitet som tilsvarer aktiviteten av proteiner fremstilt i andre rekombinante systemer eller rensset fra naturlige kilder. Se for eksempel Hood et al., Adv. Exp. Med. Biol., 464:127-147 (1999) og referanser som siteres deri. Antistoffer har også blitt fremstilt i 10 store mengder fra transgene plantefrø, innbefattet antistoff-fragmenter som enkeltkjedete antistoffer (scFv), innbefattet tobakkfrø og potetknoller. Se for eksempel Conrad et al., Plant Mol. Biol., 38:101-109 (1998) og referanser som siteres deri. Antistoffer ifølge foreliggende oppfinnelse kan således også fremstilles ved anvendelse av transgene planter ifølge kjente fremgangsmåter. Se også for eksempel Fischer et al., 15 Biotechnol. Appl. Biochem. 30:99-108 (oktober 1999); Ma et al., Trends Biotechnol., 13:522-7 (1995); Ma et al., Plant Physiol., 109:341-6 (1995); Whitelam et al., Biochem. Soc. Trans., 22:940-944 (1994); og referanser som siteres deri. Se også generelt for ekspresjon i planter av antistoffer, men ikke begrenset til, hver av de ovenfor angitte referanser.

20 Antistoffene ifølge foreliggende oppfinnelse kan binde humant IL-12 med et bredt utvalg av affiniteter (K_D). Affiniteten eller aviditeten av et antistoff for et antigen kan bestemmes eksperimentelt ved anvendelse av enhver egnet fremgangsmåte. (Se for eksempel Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions, i *Fundamental* 25 *Immunology*, Paul, W. E., red., Raven Press: New York, NY (1984); Kubly, Janis *Immunology*, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992); og fremgangsmåter som beskrives heri). Den målte affinitet av en gitt antistoff-antigeninteraksjon kan variere ved måling under forskjellige betingelser (for eksempel saltkonsentrasjon, pH). Måling av affinitet og andre antigenbindingsparametere (for eksempel K_D , K_a , K_d) 30 utføres fortrinnsvis med standardiserte løsninger av antistoff og antigen og en standardisert buffer, for eksempel bufferen som beskrives heri.

Nukleinsyremolekyler

Ved anvendelse av informasjonen som tilveiebringes heri, for eksempel 35 nukleotidsekvensene som koder for minst 70-100% av de på hverandre følgende aminosyrene i minst én av SEKV. ID. NR. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 og 8, spesifiserte fragmenter, varianter og konsensussekvenser derav, eller en deponert vektor som

omfatter minst én av disse sekvensene, kan et nukleinsyremolekyl ifølge foreliggende oppfinnelse som koder for minst ett anti-IL-12-antistoff erholdes ved anvendelse av fremgangsmåter som beskrives heri eller som er kjente inne faget.

- 5 Nukleinsyremolekyler ifølge foreliggende oppfinnelse kan foreligge i form av RNA, for eksempel mRNA, hnRNA, tRNA eller enhver annen form, eller i form av DNA, innbefattet, men ikke begrenset til, cDNA og genomisk DNA erholdt ved kloning eller fremstilt syntetisk, eller enhver kombinasjon derav. DNA kan være trippeltrådet, dobbelttrådet eller enkelttrådet eller enhver kombinasjon derav. Enhver del av minst én
- 10 tråd i dette DNA eller RNA kan være den kodende tråd, også kjent som "sense"-tråden, eller den kan være den ikke-kodende tråd, også betegnet "anti-sense"-tråden.

- Isolerte nukleinsyremolekyler ifølge foreliggende oppfinnelse kan omfatte nukleinsyremolekyler som omfatter en åpen leseramme (ORF), om ønskelig med ett
- 15 eller flere introner, for eksempel, men ikke begrenset til, minst én spesifisert del av minst ett CDR, for eksempel CDR1, CDR2 og/eller CDR3, eller minst én tungkjede (for eksempel SEKV. ID. numrene 1-3) eller lett kjede (for eksempel SEKV. ID. numrene 4-6), nukleinsyremolekyler som omfatter den kodende sekvens for et anti-IL-12-antistoff eller et variabelt område (for eksempel SEKV. ID. numrene 7, 8), og
- 20 nukleinsyremolekyler som omfatter en nukleotidsekvens som er vesentlig forskjellig fra dem beskrevet ovenfor, men som grunnet degenereringen av den genetiske kode fortsatt koder for minst ett anti-IL-12-antistoff, som beskrevet heri og/eller som kjent innen faget. Den genetiske kode er naturligvis velkjent innen faget. Det vil således være rutinemessig for en fagperson å frembringe slike degenererte nukleinsyrevarianter som
- 25 koder for spesifikke anti-IL-12-antistoffer ifølge foreliggende oppfinnelse. Se for eksempel Ausubel et al., *supra* og slike nukleinsyrevarianter omfattes av foreliggende oppfinnelse. Ikke-begrensede eksempler på isolerte nukleinsyremolekyler ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter SEKV. ID. numrene 7 og 8.

- 30 Som angitt heri kan nukleinsyremolekyler ifølge foreliggende oppfinnelse som omfatter en nukleinsyre som koder for et anti-IL-12-antistoff omfatte, men ikke være begrenset til, nukleinsyremolekyler som koder for aminosyresekvensen til et antistofffragment i seg selv, den kodende sekvens for hele antistoffet, den kodende sekvens for et antistoff, et antistofffragment, tilleggssekvenser kan inngå, for eksempel den kodende sekvens for
- 35 minst ett signalpeptid eller fusjonspeptid, med eller uten de ovenfor nevnte kodende tilleggssekvenser, for eksempel minst ett intron, sammen med ytterligere ikke-kodende sekvenser, innbefattet, men ikke begrenset til, ikke-kodende 5'- og 3'-sekvenser, for

eksempel de transkriberte, ikke-translaterte sekvenser som spiller en rolle ved transkripsjon, mRNA-prosessering, innbefattet spleise- og polyadenyleringssignaler (for eksempel ribosombinding og mRNA-stabilitet), ytterligere en kodende sekvens som koder for ytterligere aminosyrer, for eksempel aminosyrer som gir tilleggfunksjoner.

5 Sekvensen som koder for et antistoff kan således være fusjonert til en markørsekvens, for eksempel en sekvens som koder for et peptid som forenkler rensing av fusjonsantistoffet som omfatter et antistofffragment eller en antistoffdel.

Polynukleotider som selektivt hybridiserer til et polynukleotid som beskrevet heri

10 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer isolerte nukleinsyrer som under selektive hybridiseringsbetingelser kan hybridisere til et polynukleotid som beskrevet heri. Polynukleotidene kan således anvendes for isolering, påvisning og/eller kvantifisering av nukleinsyrer som omfatter slike polynukleotider. For eksempel kan polynukleotider ifølge foreliggende oppfinnelse anvendes for påvisning, isolering eller amplifisering av

15 delkloner eller fullengdekloner i et deponert bibliotek. I noen utførelser er polynukleotidene genomiske sekvenser eller cDNA-sekvenser som er isolert fra eller komplementære til et cDNA fra et nukleinsyrebibliotek fra et menneske eller pattedyr.

cDNA-biblioteket omfatter fortrinnsvis minst 80% fullengde-sekvenser, fortrinnsvis

20 minst 85% eller 90% fullengde-sekvenser og mer foretrukket minst 95% fullengde-sekvenser. cDNA-bibliotekene kan være normaliserte for å øke representasjonen av sjeldne sekvenser. Hybridiseringsbetingelser med lav eller moderat stringens benyttes typisk, men ikke utelukkende, med sekvenser med redusert sekvensidentitet relativt til komplementære systemer. Betingelser med moderat og høy stringens kan om ønskelig

25 anvendes for sekvenser med større grad av identitet. Betingelser med lav stringens tillater selektiv hybridisering av sekvenser med tilnærmet 70% sekvensidentitet, og kan benyttes for påvisning av ortologe eller paraloge sekvenser.

Om ønskelig vil polynukleotider kunne kode for minst en del av et antistoff som kodes

30 av polynukleotidene som beskrives heri. Polynukleotidene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter nukleinsyresekvenser som kan anvendes for selektiv hybridisering til et polynukleotid som koder for et antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse. Se for eksempel Ausubel, *supra* og Colligan, *supra*.

Konstruksjon av nukleinsyrer

De isolerte nukleinsyrene ifølge foreliggende oppfinnelse kan fremstilles ved anvendelse av (a) rekombinante fremgangsmåter, (b) synteseteknikker, (c) renseteknikker, eller kombinasjoner av disse, som velkjent innen faget.

5

Nukleinsyrene kan med fordel omfatte sekvenser i tillegg til et polynukleotid ifølge foreliggende oppfinnelse. For eksempel kan et multikloningssete som omfatter ett eller flere restriksjonsendonukleaseseter innsettes i nukleinsyren for å lette isolering av polynukleotidet. Videre kan translaterbare sekvenser innsettes for å lette isolering av det translaterede polynukleotid ifølge foreliggende oppfinnelse. For eksempel gir en heksahistidinmarkør et egnet middel for rensing av proteinene ifølge foreliggende oppfinnelse. Nukleinsyren ifølge foreliggende oppfinnelse - ikke medregnet den kodende sekvens - er om ønskelig en vektor, adapter eller linker for kloning og/eller ekspresjon av et polynukleotid ifølge foreliggende oppfinnelse.

15

Ytterligere sekvenser kan adderes til slike klonings- og/eller ekspresjonssekvenser for å optimalisere deres funksjon under kloning og/eller ekspresjon, som hjelp til isolering av polynukleotidet eller for å forbedre innføringen av polynukleotidet i en celle. Anvendelse av kloningsvektorer, ekspresjonsvektorer, adaptere og linkere er velkjent innen faget. (se for eksempel Ausubel, *supra* eller Sambrook, *supra*).

20

Rekombinante fremgangsmåter for konstruksjon av nukleinsyrer

De isolerte nukleinsyresammensetninger ifølge foreliggende oppfinnelse, kan være for eksempel RNA, cDNA, genomisk DNA eller enhver kombinasjon derav og kan 25 erholdes fra biologiske kilder ved anvendelse av en rekke kloningsmetoder som er kjente blant fagfolk. Det kan anvendes oligonukleotidprober som selektivt hybridiserer under stringente betingelser til polynukleotidene ifølge foreliggende oppfinnelse for påvisning av den ønskete sekvens i et cDNA-bibliotek eller genomisk DNA-bibliotek. Isolering av RNA og konstruksjon av cDNA-biblioteker og genomiske biblioteker er 30 velkjent blant gjennomsnittsfagfolk. (se for eksempel Ausubel, *supra* og Sambrook, *supra*).

Fremgangsmåter for analyse og isolering av nukleinsyrer

Et cDNA-bibliotek eller et genomisk bibliotek kan gjennomføres ved anvendelse av en 35 probe som bygger på sekvensen til et polynukleotid ifølge foreliggende oppfinnelse, for eksempel probene som beskrives heri. Prober kan anvendes for hybridisering til genomiske DNA-sekvenser eller cDNA-sekvenser for isolering av homologe gener fra

samme eller en annen organisme. Fagfolk vil forstå at forskjellige grader av stringens under hybridiseringen kan anvendes i analysen, og enten hybridiseringsløsningen eller vaskeløsningen kan være stringent. Etter hvert som hybridiseringsbetingelsene blir mer stringente må det være større grad av komplementaritet mellom probe og mål for

5 dupleksdannelse. Stringensgraden kan kontrolleres ved å variere en eller flere av temperatur, ionestyrke, pH og nærvær av et delvis denaturerende løsemiddel, for eksempel formamid. Stringensen under hybridiseringen kan for eksempel enkelt varieres ved å endre løsningens polaritet, for eksempel ved å manipulere konsentrasjonen av formamid innen området fra 0% til 50%. Graden av

10 komplementaritet (sekvensidentitet) som er nødvendig for påvisbar binding, vil variere i samsvar med stringensen i hybridiseringsløsningen og/eller vaskeløsningen. Graden av komplementaritet vil optimalt være 100% eller 70-100%, eller ethvert område eller enhver verdi mellom disse. Det bør imidlertid forstås at små sekvensvariasjoner i prober og primere kan kompenseres for ved å redusere stringensen i hybridiseringsløsningen

15 og/eller vaskeløsningen.

Fremgangsmåter for amplifisering av RNA eller DNA er velkjente innen faget og kan anvendes ifølge foreliggende oppfinnelse uten omfattende eksperimentering, basert på den lære og de rettesnorer som gis heri.

20

Kjente fremgangsmåter for DNA- eller RNA-amplifisering omfatter, men er ikke begrenset til, polymerase-kjedereaksjonen (PCR) og beslektete amplifiseringsprosesser (se for eksempel U.S. patentskrifter numrene 4 683 195, 4 683 202, 4 800 159, 4 965 188 tildelt Mullis et al.; 4 795 699 og 4 921 794 tildelt

25 Tabor et al.; 5 142 033 tildelt Innis; 5 122 464 tildelt Wilson et al.; 5 091 310 tildelt Innis; 5 066 584 tildelt Gyllensten et al.; 4 889 818 tildelt Gelfand et al.; 4 994 370 tildelt Silver et al.; 4 766 067 tildelt Biswas; 4 656 134 tildelt Ringold) og RNA-formidlet amplifisering som anvender "anti-sense"-RNA til målsekvensen som templat som syntese av dobbelttrådet DNA (U.S. patentskrift nummer 5 130 238, tildelt Malek

30 et al., med varemerket "NASBA"). (Se for eksempel Ausubel, *supra* eller Sambrook, *supra*).

For eksempel kan polymerase-kjedereaksjon (PCR)-teknologi anvendes for amplifisering av sekvensene til polynukleotider ifølge foreliggende oppfinnelse og

35 beslektete gener direkte fra genomisk DNA eller cDNA-biblioteker. PCR og andre *in vitro*-amplifiseringsfremgangsmåter kan også for eksempel være nyttige for kloning av nukleinsyresekvenser som koder for proteiner som skal uttrykkes, for fremstilling av

nukleinsyrer for anvendelse som prober for å påvise nærvær av det ønskete mRNA i prøver, for nukleinsyresekvensering og for andre formål. Eksempler på teknikker som er tilstrekkelige til å styre fagpersoner gjennom fremgangsmåter for *in vitro*-amplifisering finnes i Berger, *supra*, Sambrook, *supra*, og Ausubel, *supra*, så vel som i Mullis et al.,
 5 U.S. patentskrift nr. 4 683 202 (1987); og Innis et al., PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, red., Academic Press Inc., San Diego, CA. (1990).
 Kommersielt tilgjengelige sett for genomisk PCR-amplifisering er kjente innen faget. Se for eksempel Advantage-GC Genomic PCR Kit (Clontech). I tillegg kan for eksempel
 10 gen 32-protein fra bakteriofag T4 (Boehringer Mannheim) anvendes for å forbedre utbyttet av lange PCR-produkter.

Syntesefremgangsmåter for konstruksjon av nukleinsyrer

De isolerte nukleinsyrene ifølge foreliggende oppfinnelse kan også fremstilles ved direkte kjemisk syntese ifølge kjente fremgangsmåter (se for eksempel Ausubel et al.,
 15 *supra*). Kjemisk syntese gir generelt et enkelttrådet oligonukleotid som kan omdannes til dobbelttrådet DNA ved hybridisering med en komplementær sekvens eller ved polymerisering ved en DNA-polymerase og anvendelse av enkelttråden som templat. En fagperson vil innse at mens kjemisk syntese av DNA kan være begrenset til sekvenser på tilnærmet 100 eller flere baser, kan lengre sekvenser erholdes ved ligering av kortere
 20 sekvenser.

Rekombinante ekspresjonskassetter

En nukleinsyresekvens ifølge foreliggende oppfinnelse, for eksempel en cDNA-sekvens eller en genomisk sekvens som koder for et antistoff ifølge foreliggende
 25 oppfinnelse, kan anvendes for konstruksjon av en rekombinant ekspresjonskasset som kan innføres i minst en ønsket vertscelle. En rekombinant ekspresjonskasset vil typisk kunne omfatte et polynukleotid ifølge foreliggende oppfinnelse, operativt koblet til sekvenser som regulerer transkripsjonsinitiering og som vil styre transkripsjonen av polynukleotidet i den påtenkte vertscelle. Både heterologe og ikke-heterologe (dvs.
 30 endogene) promotere kan anvendes for å styre ekspresjonen av nukleinsyrene. I noen utførelser kan isolerte nukleinsyrer som fungerer som promoter, enhancer eller andre elementer innføres i en egnet posisjon (oppstrøms, nedstrøms eller i et intron) i en ikke-heterolog form av et polynukleotid ifølge foreliggende oppfinnelse for opp- eller nedregulering av ekspresjonen av et polynukleotid. For eksempel kan endogene
 35 promotere endres *in vivo* eller *in vitro* ved mutasjon, delesjon og/eller substitusjon.

Vektorer og vertsceller

Vektorer som omfatter isolerte nukleinsyremolekyler ifølge foreliggende oppfinnelse kan benyttes, vertsceller som er genetisk modifisert med de rekombinante vektorer, og fremstilling av minst ett anti-IL-12-antistoff ved rekombinante teknikker, som velkjent
 5 innen faget. Se for eksempel Sambrook et al., *supra*, Ausubel et al., *supra*.
 Polynukleotidene kan om ønskelig være koblet til en vektor som inneholder en seleksjonsmarkør for oppformering i en vert. Generelt innføres en plasmidvektor i en utfelling, for eksempel en kalsiumfosfatutfelling, eller i et kompleks med et ladet lipid. Dersom vektoren er et virus, kan dette pakkes *in vitro* ved anvendelse av en egnet
 10 pakkecellelinje og så transduseres inn i vertsceller.

DNA-innskuddet bør være operativt koblet til en egnet promoter.
 Ekspresjonskonstruksjonene vil videre inneholde seter for transkripsjonsinitiering, transkripsjonsterminering og, i det transkriberte område, et ribosombindingssete for
 15 translasjon. Den kodende del av de modne transkripter som uttrykkes fra konstruksjonene vil fortrinnsvis omfatte et translasjonsinitieringskodon i begynnelsen og et termineringskodon (for eksempel UAA, UGA eller UAG) plassert på egnet vis mot enden av det mRNA som skal translateres, hvor UAA og UAG foretrekkes for ekspresjon i pattedyrsceller eller eukaryote celler.

20 Ekspresjonsvektorer vil fortrinnsvis, men ikke nødvendigvis, omfatte minst en seleksjonsmarkør. Slike seleksjonsmarkører omfatter, men er ikke begrenset til, methotrexat (MTX)-resistens, dihydrofolat reduktase (DHFR, U.S. patentskrifter numrene 4 399 216; 4 634 665; 4 656 134; 4 956 288; 5 149 636; 5 179 017),
 25 ampicillin, neomycin (G418), mycofenolsyreresistens eller glutaminsyntetase (GS, U.S. patentskrifter numrene 5 122 464; 5 770 359; 5 827 739) for dyrking i eukaryote celler, og tetrasyklin- eller ampicillinresistensgener for dyrking i *E. coli* og andre bakterier eller prokaryoter. Egnede dyrkingsmedier og betingelser for de ovenfor beskrevne vertsceller er kjente innen faget. Egnete vektorer vil være åpenbare for den erfarne
 30 fagperson. Innføring av en vektorkonstruksjon i en vertscelle kan oppnås ved kalsiumfosfattransfeksjon, DEAE-dekstranformidlet transfeksjon, kationisk lipidformidlet transfeksjon, elektroporering, transduksjon, infeksjon eller andre kjente fremgangsmåter. Slike fremgangsmåter er beskrevet innen teknikkens stand, for eksempel Sambrook, *supra*, kapitlene 1-4 og 16-18, og Ausubel, *supra*, kapitlene 1, 9,
 35 13, 15 og 16.

Minst ett antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse kan uttrykkes i modifisert form, for eksempel som et fusjonsprotein, og kan omfatte ikke bare sekresjonssignaler, men også

- ytterligere heterologe, funksjonelle områder. For eksempel kan et område med tilleggssaminyrer, fortrinnsvis ladete aminosyrer, adderes til et antistoffs N-ende for å forbedre stabiliteten og levetiden i vertscellen, under rensing eller under påfølgende håndtering og lagring. Videre kan peptidgrupper adderes til et antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse for å lette rensing. Slike områder kan fjernes før den endelige fremstilling av et antistoff eller minst ett fragment derav. Slike fremgangsmåter er beskrevet i mange standard laboratoriehåndbøker, for eksempel Sambrook, *supra*, kapittel 17.29-17.42 og 18.1-18.74, og Ausubel, *supra*, kapittel 16, 17 og 18.
- Alternativt kan nukleinsyrer ifølge foreliggende oppfinnelse uttrykkes i en vertscelle ved å skru på genet (ved manipulering) i en vertscelle som inneholder endogent DNA som koder for et antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse. Slike fremgangsmåter er velkjente innen faget, for eksempel som beskrevet i U.S. patentskrifter numrene 5 580 734, 5 641 670, 5 733 746 og 5 733 761. Illustrerende for cellekulturer som er anvendbare for fremstilling av antistoffene, spesifiserte deler eller varianter av disse er pattedyrsceller. Pattedyrscellesystemer vil ofte foreligge i form av encellelag, selv om pattedyrscellesuspensjoner eller bioreaktorer også kan anvendes. En rekke egnete vertscellelinjer som kan uttrykke intakte, glykocylerte proteiner har blitt utviklet innen faget og omfatter cellelinjene COS-1 (for eksempel ATCC CRL 1650), COS-7 (for eksempel ATCC CRL-1651), HEK293, BHK21 (for eksempel ATCC CRL-10), CHO (for eksempel ATCC CRL 1610) og BSC-1 (for eksempel ATCC CRL-26) cellelinjer COS-7-celler, CHO-celler, hep G2-celler, P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, 293-celler, HeLa-celler og liknende, som er lett tilgjengelige, for eksempel fra American Type Culture Collection, Manassas, Va (www.atcc.org). Foretrukne vertsceller omfatter celler av lymfoid opphav, for eksempel myelomceller og lymfomceller. Spesielt foretrukne vertsceller er P3X63Ag8.653-celler (ATCC aksesjonsbetegnelse CRL-1580) og SP2/0-Ag14-celler (ATCC aksesjonsbetegnelse CRL-1851). I en spesielt foretrukket utførelse er den rekombinante celle en P3X63Ab8.653-celle eller en SP2/0-Ag14-celle.
- Ekspresjonsvektorer for disse cellene kan omfatte en eller flere av følgende ekspresjonskontrollsekvenser, for eksempel, men ikke begrenset til, et replikasjonsorigo, en promoter (for eksempel sene eller tidlige SV40-promotere, CMV-promotoren (U.S. patentskrifter numrene 5 168 062; 5 385 839), en HSV tk-promoter, en pgk (fosfoglycerat kinase)-promoter, en EF-1 alfa-promoter (U.S. patentskrift nummer 5 266 491), minst én human immunglobulinpromoter, en enhancer og/eller prosesseringsinformasjonsseter, for eksempel ribosombindingsseter, RNA-spleiseseter, polyadenyleringsseter (for eksempel et polyadenyleringssete fra store T-Ag fra SV40)

og transkripsjonstermineringssekvenser. Se for eksempel Ausubel et al., *supra*, og Sambrook et al., *supra*. Andre celler som er anvendbare for fremstilling av nukleinsyrer eller proteiner ifølge foreliggende oppfinnelse er kjente og/eller tilgjengelige, for eksempel fra American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas (www.atcc.org) eller andre kjente eller kommersielle kilder.

Dersom eukaryote vertsceller anvendes, innføres typisk polyadenyleringssekvenser og transkripsjonstermineringssekvenser i vektoren. Et eksempel på en termineringssekvens er polyadenyleringssekvensen fra veksthormongenet fra storfe. Sekvenser for nøyaktig spleising av transkriptet kan også inngå. Et eksempel på en spleisesekvens er VP1-intronet fra SV40 (Sprague et al., J. Virol. 45:773-781 (1983)). I tillegg kan gensekvenser som kontrollerer replikasjonen i vertscellen være innført i vektoren, som kjent innen faget.

15 **Rensing av et antistoff**

Et anti-IL-12-antistoff kan gjenvinnes og renses fra rekombinante cellekulturer ved velkjente fremgangsmåter som omfatter, men ikke begrenset til, protein A-rensing, ammoniumsulfat- eller etanolutfelling, syreekstraksjon, anion- eller kationbytterkromatografi, fosfocellulosekromatografi, hydrofob interaksjonskromatografi, affinitetskromatografi, hydroksylapatitkromatografi og lectinkromatografi. Høytytelsesvæskekromatografi ("HPLC") kan også benyttes for rensing. Se for eksempel Colligan, Current Protocols in Immunology, eller Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), for eksempel kapitlene 1, 4, 6, 8, 9 og 10.

Antistoffer ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter naturlige, rensede produkter, produkter fra kjemiske syntesefremgangsmåter og produkter fremstilt ved rekombinante teknikker av en eukaryot vert, innbefattet for eksempel gjær, høyere planter, insektceller og pattedyrceller. Avhengig av verten som benyttes i en rekombinant fremstillingsfremgangsmåte, kan antistoffet ifølge foreliggende oppfinnelse være glykocylert eller ikke-glykocylert, hvor glykocylering foretrekkes. Slike fremgangsmåter beskrives i mange standard laboratoriehåndbøker, for eksempel Sambrook, *supra*, seksjon 17.37-17.42; Ausubel, *supra*, kapitlene 10, 12, 13, 16, 18 og 20, Colligan, Protein Science, *supra*, kapittel 12-14.

35

Anti-IL-12-antistoffer

De isolerte antistoffene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter et antistoff som kodes

av ethvert av polynukleotidene ifølge foreliggende oppfinnelse, som diskutert mer grundig heri, eller ethvert isolert eller fremstilt antistoff. Det humane antistoff eller antigenbindende fragment binder fortrinnsvis IL-12 og nøytraliserer derved delvis eller i vesentlig grad, minst én biologisk aktivitet forbundet med proteinet. Et antistoff eller en spesifisert del eller variant derav, som delvis eller fortrinnsvis, i vesentlig grad nøytraliserer minst en biologisk aktivitet forbundet med minst ett IL-12-protein eller et fragment, kan binde proteinet eller fragmentet og derved inhibere aktiviteter som formidles ved binding av IL-12 til IL-12-reseptoren, eller via andre IL-12-avhengige eller -formidlede mekanismer. Som anvendt heri viser begrepet "nøytraliserende antistoff" til et antistoff som kan inhibere en IL-12-avhengig aktivitet med tilnærmet 20-120%, fortrinnsvis med minst tilnærmet 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% eller mer, avhengig av analysen. Et anti-IL-12-antistoffs evne til å inhibere en IL-12-avhengig aktivitet, anslås fortrinnsvis ved minst én egnet IL-12-protein- eller reseptoranalyse som beskrevet heri og/eller som kjent innen faget. Et humant antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse kan være av enhver klasse (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, osv.), eller isotype og kan omfatte en kappa- eller lambdalettkjede. Antistoffer av denne type kan fremstilles ved å benytte en transgen mus eller et annet transgent, ikke-menneskelig pattedyr som inneholder minst én human lettkjede, for eksempel IgG, IgA og IgM (for eksempel $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$)-transgen, som beskrevet heri og/eller som kjent innen faget. I en utførelse omfatter det humane, anti-humant IL-12-antistoff en IgG1-tungkjede og en IgG1-lettkjede.

Minst ett antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse bindes til minst en spesifisert epitop som er spesifikk for minst ett IL-12-protein, en subenhet, et fragment, en del eller enhver kombinasjon derav. Denne i det minste ene epitop kan omfatte minst ett antistoffbindende område som omfatter minst en del av proteinet, hvor epitopen fortrinnsvis består av minst en ekstracellulær, løselig, hydrofil, ekstern eller cytoplasmatisk del av proteinet. Denne i det minste ene spesifiserte epitop kan omfatte enhver kombinasjon av minst en aminosyresekvens, omfattende minst 1-3 aminosyrer opptil hele den spesifiserte del av de på hverandre følgende aminosyrer ifølge SEKV. ID. NR. 9.

Generelt vil det humane antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse omfatte et antigenbindende område som omfatter minst ett humant komplementaritetsbestemmende område (CDR1, CDR2 og CDR3) eller en variant av minst ett variabelt tungkjedeområde, og minst ett humant komplementaritetsbestemmende område (CDR1, CDR2 og CDR3) eller en variant av

minst ett variabelt lettjedeområde. Antistoffet kan omfatte minst en tungkjede-CDR3 med aminosyresekvensen ifølge SEKV. ID. NR. 3 og/eller en lettjede-CDR med aminosyresekvensen ifølge SEKV. ID. NR. 6. Antistoffet kan ha et antigenbindende område som omfatter minst en del av minst ett tungkjede-CDR (dvs. CDR1, CDR2 og/eller CDR3) med aminosyresekvensen til de tilsvarende CDR1, 2 og/eller 3 (for eksempel SEKV. ID. numrene 1, 2 og/eller 3). Antistoffet kan også ha et antigenbindende område som omfatter minst en del av minst ett lettjede-CDR (dvs. CDR1, CDR2 og/eller CDR3) med aminosyresekvensen til de tilsvarende CDR1, 2 og/eller 3 (for eksempel SEKV. ID. numrene 4, 5 og/eller 6). Det er også mulig at de tre tungkjede-CDR og de tre lettjede-CDR i antistoffet har aminosyresekvensen til de tilsvarende CDR i minst ett av mAb 12B75, C340 eller ethvert annet som beskrives heri. Slike antistoffer kan fremstilles ved kjemisk sammenkobling av de forskjellige delene (for eksempel CDR, rammeverk) av antistoffet ved anvendelse av konvensjonelle teknikker, ved å fremstille og uttrykke et (dvs. ett eller flere) nukleinsyremolekyler som koder for antistoffet ved anvendelse av konvensjonelle teknikker innen rekombinant DNA-teknologi, eller ved anvendelse av enhver annen, egnet fremgangsmåte.

Anti-IL-12-antistoffet kan omfatte minst ett variabelt tungkjede- eller lettjedeområde med en definert aminosyresekvens. For eksempel kan anti-IL-12-antistoffet omfatte minst ett variabelt tungkjedeområde, om ønskelig med aminosyresekvensen ifølge SEKV. ID. NR. 7, og/eller minst ett variabelt lettjedeområde, om ønskelig med aminosyresekvensen ifølge SEKV. ID. NR. 8. Antistoffer som bindes til humant IL-12 og som omfatter et definert, variabelt tungkjede- eller lettjedeområde, kan fremstilles ved anvendelse av egnede fremgangsmåter, for eksempel bakteriofagfremvisning (Katsube, Y. et al., *Int. J. Mol. Med.*, 1(5):863-868 (1998)) eller fremgangsmåter som benytter transgene dyr, som kjent innen faget og/eller som beskrevet heri. For eksempel kan en transgen mus som omfatter et funksjonelt rearrangert, humant immunglobulintungkjedetransgen og et transgen som omfatter DNA fra et humant immunglobulinlettjedelocus, som kan gjennomgå funksjonell rearrangering, immuniseres med humant IL-12 eller et fragment derav for å utløse dannelse av antistoffer. Om ønskelig kan de antistoffproduserende celler isoleres og hybridomer eller andre immortaliserte antistoffproduserende celler fremstilles som beskrevet heri og/eller som kjent innen faget. Alternativt kan antistoffet eller den spesifiserte del eller variant derav uttrykkes ved anvendelse av den kodende nukleinsyre eller en del av denne i en egnet vertscelle.

- Oppfinnelsen gjelder også antistoffer, antigenbindende fragmenter, immunglobulinkjeder og CDR som omfatter aminosyrer i en sekvens som i det vesentlige er den samme som en aminosyresekvens som beskrives heri. Slike antistoffer eller antigenbindende fragmenter eller antistoffer som omfatter slike kjeder eller CDR,
- 5 kan fortrinnsvis binde humant IL-12 med høyaffinitet (for eksempel K_D mindre enn eller lik tilnærmet 10^{-9} M). Aminosyresekvenser som i det vesentlige er de samme som sekvensene som beskrives heri omfatter sekvenser som inneholder konservative aminosyresubstitusjoner, så vel som aminosyredelesjoner og/eller -insersjoner. En konservativ aminosyresubstitusjon viser til erstatning av en første aminosyre med en
- 10 annen aminosyre som har kjemiske og/eller fysiske egenskaper (for eksempel ladning, struktur, polaritet, hydrofobisitet/hydrofilisitet) som likner egenskapene til den første aminosyren. Konservative substitusjoner omfatter erstatning av en aminosyre med en annen innen følgende grupper: lysin (K), arginin (R) og histidin (H); aspartat (D) og glutamat (E); asparagin (N), glutamin (Q), serin (S), treonin (T), tyrosin (Y).
- 15 K, R, H, D og E; alanin (A), valin (V), leucin (L), isoleucin (I), prolin (P), fenylalanin (F), tryptofan (W), metionin (M), cystein (C) og glysin (G); F, W og Y; C, S og T.

Aminosyrekoder

- Aminosyrene som utgjør anti-IL-12-antistoffene ifølge foreliggende oppfinnelse er ofte
- 20 forkortete. Aminosyrebetegnelse kan angis ved å betegne aminosyren med dens enbokstavkode, dens trebokstavkode, dens navn eller dens trenukleotidkodon(er), som velkjent innen faget (se Alberts, B., et al., Molecular Biology of The Cell, 3. utgave, Garland Publishing, Inc., New York, 1994):

EN-BOKSTAV KODE	TRE-BOKSTAV KODE	NAVN	TRENUKLEOTID KODON(ER)
A	Ala	Alanin	GCA, GCC, GCG, GCU
C	Cys	Cystein	UGC, UGU
D	Asp	Asparginsyre	GAC, GAU
E	Glu	Glutaminsyre	GAA, GAG
F	Phe	Fenylalanin	UUC, UUU
G	Gly	Glycin	GGA, GGC, GGG, GGU
H	His	Histidin	CAC, CAU
I	Ile	Isoleucin	AUA, AUC, AUU
K	Lys	Lysin	AAA, AAG

L	Leu	Leucin	UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU
M	Met	Metionin	AUG
N	Asn	Asparagin	AAC, AAU
P	Pro	Prolin	CCA, CCC, CCG, CCU
Q	Gln	Glutamin	CAA, CAG
R	Arg	Arginin	AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU
S	Ser	Serin	AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU
T	Thr	Treonin	ACA, ACC, ACG, ACU
V	Val	Valin	GUA, GUC, GUG, GUU
W	Trp	Tryptofan	UGG
Y	Tyr	Tyrosin	UAC, UAU

Et anti-IL-12-antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse kan omfatte en eller flere aminosyresubstitusjoner, -delesjoner eller -addisjoner, enten grunnet naturlige mutasjoner eller human manipulering, som spesifisert heri.

5

Naturligvis vil antall aminosyresubstitusjoner som en erfaren fagperson vil innføre, avhenge av mange faktorer, innbefattet faktorene beskrevet ovenfor. Generelt sett vil antall aminosyresubstitusjoner, -inersjoner eller -delesjoner for et gitt anti-IL-12-Ig-avledet protein, fragment eller variant, ikke være mer enn 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, for eksempel 1-30 eller ethvert område eller
10 enhver verdi innenfor dette område, som spesifisert heri.

Aminosyrer i en anti-IL-12-antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse som er avgjørende for funksjonen, kan påvises ved fremgangsmåter som er kjente innen faget, for
15 eksempel setestyrte mutagenese eller alanin-skannende mutagenese (se for eksempel Ausubel, *supra*, kapitlene 8, 15; Cunningham og Wells, Science 244:1081-1085 (1989)). Denne siste fremgangsmåten innfører enkeltvis alaninmutasjoner i hver posisjon i molekylet. De resulterende mutante molekyler analyseres så for biologisk aktivitet, for eksempel, men ikke begrenset til, minst en IL-12-nøytraliserende aktivitet.
20 Seter som er avgjørende for antistoffbindingen kan også påvises ved strukturell analyse, for eksempel krystallisering, kjernemagnetisk resonans eller fotoaffinitetsmerking (Smith, et al., J. Mol. Biol., 224:899-904 (1992), og de Vos, et al., Science 255:306-312 (1992)).

Anti-IL-12-antistoffer kan omfatte, minst en del, sekvens eller kombinasjon, utvalgt blant fra 5 til alle de på hverandre følgende aminosyrer i minst en av SEKV. ID. numrene 1, 2, 3, 4, 5 og 6.

- 5 IL-12-antistoffer eller spesifiserte deler eller varianter derav, kan omfatte, men er ikke begrenset til, minst en del, sekvens eller kombinasjon, utvalgt blant minst 3-5 på hverandre følgende aminosyrer i SEKV. ID. numrene 1, 5-17 på hverandre følgende aminosyrer i SEKV. ID. numrene 2, 5-10 på hverandre følgende aminosyrer i SEKV. ID. numrene 3, 5-11 på hverandre følgende aminosyrer i SEKV. ID. numrene 4, 5-7 på
- 10 hverandre følgende aminosyrer i SEKV. ID. numrene 5, 5-9 på hverandre følgende aminosyrer i SEKV. ID. NR. 6, og Leu21, Lys76, Met83 og Ser85 i SEKV. ID. NR. 7.

Et anti-IL-12-antistoff kan videre, om ønskelig, omfatte et polypeptid med minst 70-100% av 5, 17, 10, 11, 7, 9, 119 eller 108 på hverandre følgende aminosyrer fra minst

15 en av SEKV. ID. numrene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 og 8.

Aminosyresekvensen til en immunglobulinkjede eller en del derav (for eksempel det variable området CDR) kan ha tilnærmet 70-100% identitet (for eksempel 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95,

20 96, 97, 98, 99, 100 eller ethvert område eller enhver verdi deri) med aminosyresekvensen til den tilsvarende kjede i minst en av SEKV. ID. numrene 7 og 8. For eksempel kan aminosyresekvensen til et variabelt lettkjedeområde sammenliknes med sekvensen ifølge SEKV. ID. NR.8, eller aminosyresekvensen til en tungkjede-CDR3 kan sammenliknes med SEKV. ID. NR.3. Fortrinnsvis bestemmes 70-100%

25 aminosyreidentitet (dvs. 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 eller ethvert område eller enhver verdi deri) ved anvendelse av en egnet datamaskinalgoritme, som kjent innen faget.

Eksemplariske sekvenser for variable områder fra tungkjede og lettkjede gis i SEKV. ID. numrene 7 og 8. Antistoffene kan omfatte ethvert antall på hverandre følgende aminosyrerester fra et antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse, hvori antallet er utvalgt fra gruppen av heltall som består av fra 10 til 100% av antall på hverandre følgende aminosyrerester i et anti-IL-12-antistoff. Om ønskelig er denne undersekvens av på

30 hverandre følgende aminosyrer minst tilnærmet 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250 eller flere

35 aminosyrer i lengde, eller ethvert område eller enhver verdi deri. Videre kan antall slike

undersekvenser være ethvert heltall utvalgt fra gruppen som består av 1 til 20, for eksempel minst 2, 3, 4 eller 5.

Som fagfolk vil forstå, omfatter foreliggende oppfinnelse minst ett biologisk aktivt antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse. Biologisk aktive antistoffer har en spesifikk aktivitet på minst 20%, 30% eller 40%, fortrinnsvis minst 50%, 60% eller 70%, og mest foretrukket minst 80%, 90% eller 95%-100% av aktiviteten til det native (ikke-syntetiske), endogene eller beslektete og kjente antistoff. Fremgangsmåter for analyse og kvantifisering av enzymatisk aktivitet og substratspesifisitet er velkjente blant fagfolk.

Humane antistoffer og antigenbindende fragmenter som beskrevet heri, kan modifiseres ved kovalent tilkobling av en organisk gruppe. Slik modifisering kan gi et antistoff eller antigenbindende fragment med forbedrede, farmakokinetiske egenskaper (for eksempel forlenget halveringstid i serum *in vivo*). Den organiske gruppe kan være en uforgrenet eller forgrenet, hydrofil, polymer gruppe, fettsyregruppe eller fettsyreestergruppe. Den hydrofile, polymere gruppe også ha en molekylvekt på fra tilnærmet 800 til tilnærmet 120000 dalton, og kan være en polyalkanglykol (for eksempel polyetylenglykol (PEG), polypropylenglykol (PPG)), en karbohydratpolymer, en aminosyrepolymer eller polyvinylpyrrolidon, og fettsyre- eller fettsyreestergruppen kan omfatte fra tilnærmet 8 til tilnærmet 40 karbonatomer.

De modifiserte antistoffer ifølge oppfinnelsen, kan omfatte en eller flere organiske grupper som er direkte eller indirekte kovalent bundet til antistoffet. Hver av de organiske gruppene som er bundet til et antistoff eller antigenbindende fragment ifølge oppfinnelsen, kan uavhengig av hverandre være en hydrofil polymer gruppe, en fettsyregruppe eller en fettsyreestergruppe. Som anvendt heri omfatter begrepet "fettsyre" monokarboksytsyrer og dikarboksytsyrer. En "hydrofil polymer gruppe" som anvendt heri viser til en organisk polymer som er mer løselig i vann enn i oktan. For eksempel er polylysin mer løselig i vann enn i oktan. Et antistoff modifisert ved kovalent tilkobling av polylysin omfattes således av oppfinnelsen. Hydrofile polymerer som er egnede for modifisering av antistoffer ifølge oppfinnelsen, kan være uforgrenete eller forgrenete og omfatter for eksempel polyalkanglykoler (for eksempel PEG, monometoksyppolyetylenglykol (mPEG), og liknende), karbohydrater (for eksempel dekstran, cellulose, oligosakkarider, polysakkarider og liknende), polymerer av hydrofile aminosyrer (for eksempel polylysin, polyarginin, polyaspartat og liknende), polyalkanoksider (for eksempel polyetylenoksid, polypropylenoksid og liknende), og

polyvinylpyrrolidon. Den hydrofile polymer som modifiserer antistoffet har fortrinnsvis en molekylvekt på fra tilnærmet 800 til tilnærmet 150000 dalton som en separat molekylær enhet. For eksempel kan PEG_{5.000} og PEG_{20.000} hvori subskriptet angir gjennomsnittsmolekylvekten til polymeren i dalton, anvendes. Den hydrofile, polymere gruppe kan være substituert med fra en til tilnærmet seks alkylgrupper, fettsyregrupper eller fettsyreestergrupper. Hydrofile polymerer som er substituert med en fettsyregruppe eller fettsyreestergruppe kan fremstilles ved anvendelse av egnete fremgangsmåter. For eksempel kan en polymer som omfatter en amingruppe kobles til et karboksylat av fettsyren eller fettsyreesteren, og et aktivert karboksylat (for eksempel aktivert med N,N-karbonyldiimidazol) på en fettsyre eller fettsyreester, kan kobles til en hydroksylgruppe i en polymer.

Fettsyrer og fettsyreestere som er egnete for modifisering av antistoffer ifølge oppfinnelsen, kan være mettede, eller de kan inneholde en eller flere umettete enheter. Fettsyrer egnete for modifisering av antistoffer ifølge oppfinnelsen omfatter for eksempel n-dodekanoat (C₁₂, laurat), n-tetradekanoat (C₁₄, myristat), n-oktadekanoat (C₁₈, stearat), n-eikosanoat (C₂₀, arachidat), n-dokosanoat (C₂₂, behenat), n-triakontanoat (C₃₀), n-tetrakontanoat (C₄₀), *cis*-Δ⁹-oktadekanoat (C₁₈, oleat) alle *cis*-Δ^{5,8,11,14}-eikosatetraenoat (C₂₀, arachidonat), oktandionsyre, tetradekandionsyre, oktadekandionsyre, dokosandionsyre og liknende. Egnete fettsyreestere omfatter monoestere av dikarboksylysyrer som omfatter en uforgrenet eller forgrenet, lavere alkylgruppe. Den lavere alkylgruppe kan omfatte fra ett til tilnærmet tolv karbonatomer, fortrinnsvis fra ett til tilnærmet seks karbonatomer.

De modifiserte, humane antistoffer og antigenbindende fragmenter kan fremstilles ved anvendelse av egnete fremgangsmåter, for eksempel ved reaksjon med ett eller flere modifiserende midler. Et "modifiserende middel" som anvendt heri, viser til en egnet, organisk gruppe (for eksempel en hydrofil polymer, en fettsyre eller en fettsyreester) som omfatter en aktiverende gruppe. En "aktiverende gruppe" er en kjemisk rest eller funksjonell gruppe som under egnete betingelser kan reagere med en annen kjemisk gruppe, hvorved det dannes en kovalent binding mellom det modifiserende middel og den andre kjemiske gruppen. For eksempel omfatter aminreaktive aktiverende grupper elektrofile grupper som tosylat, mesylat, halo(klor, brom, fluor, jod), N-hydroksysuksinimidylestere (NHS), og liknende. Aktiverende grupper som kan reagere med tioler inkluderer for eksempel maleimid, jodacetyl, akryløl, pyridyldisulfider, 5-tiol-2-nitrobenzosyretiol (TNB-tiol) og liknende. En funksjonell aldehydgruppe kan kobles til amin- eller hydrazidholdige molekyler, og en azidgruppe kan reagere med en

- trivalent fosforgruppe for dannelse av fosforamidat- eller fosforimidbindinger. Egnete fremgangsmåter for innføring av aktiverende grupper i molekyler er kjente innen faget (se for eksempel Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press; San Diego, CA. (1996)). En aktiverende gruppe kan bindes direkte til den organiske gruppe (for eksempel den hydrofile polymer, fettsyre, fettsyreesteren), eller via en linkergruppe, for eksempel en divalent C₁-C₁₂-gruppe, hvori ett eller flere karbonatomer kan være erstattet med et heteroatom, for eksempel oksygen, nitrogen eller svovel. Egnete linkergrupper omfatter for eksempel tetraetylglykol, -(CH₂)₃-, -NH-(CH₂)₆-NH-, -(CH₂)₂-NH- og -CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-NH-. Modifiserende midler som omfatter en linkergruppe kan for eksempel fremstilles ved å la et mono-Boc-alkyldiamin (for eksempel mono-Boc-etylendiamin, mono-Boc-diaminheksan) reagere med en fettsyre i nærvær av 1-etyl-3-(3-dimetylaminpropyl)karbodiimid (EDC) for dannelse av en amidbinding mellom det frie amin og fettsyrekarboksylatet. Boc-beskyttelsesgruppen kan fjernes produktet ved behandling med trifluoreddiksyre (TFA) for eksponering av et primært amin som kan tilkobles et annet karboksylat som beskrevet, eller som kan reagere med maleinsyreanhydrid og det resulterende produkt sykliseres for dannelse av et aktivert maleimidderivat av fettsyren. (Se for eksempel Thompson et al., WO 92/16221).
- De modifiserte antistoffene ifølge oppfinnelsen kan fremstilles ved å la et humant antistoff eller antigenbindende fragment reagere med et modifiserende middel. For eksempel kan de organiske gruppene bindes til antistoffet på en ikke-setespesifikk måte ved å benytte et aminreaktivt, modifiserende middel, for eksempel en NHS-ester av PEG. Modifiserte, humane antistoffer eller antigenbindende fragmenter kan også fremstilles ved å redusere disulfidbindinger (for eksempel intrakjede-disulfidbindinger) i et antistoff eller antigenbindende fragment. Det reduserte antistoff eller antigenbindende fragment kan så få reagere med et tiolreaktivt modifiserende middel for dannelse av det modifiserte antistoff ifølge oppfinnelsen. Modifiserte, humane antistoffer og antigenbindende fragmenter som omfatter en organisk gruppe som er bundet til spesifikke seter i et antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse, kan fremstilles ved anvendelse av egnete fremgangsmåter, for eksempel revers proteolyse (Fisch et al., *Bioconjugate Chem.*, 3:147-153 (1992); Werlen et al., *Bioconjugate Chem.*, 5:411-417 (1994); Kumaran et al., *Protein Sci.* 6(10):2233-2241 (1997); Itoh et al., *Bioorg. Chem.*, 24(1):59-68 (1996); Capellas et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4):456-463 (1997)), og fremgangsmåtene beskrevet i Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, CA. (1996).

ANTI-IL-12-IG-AVLEDEDE PROTEINSAMMENSETNINGER

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også minst en anti-IL-12-antistoffsammensetning som kan omfatte minst ett, minst to, minst tre, minst fire, minst fem, minst seks eller flere anti-IL-12-antistoffer, som beskrevet heri og/eller som kjent
 5 innen faget, som tilveiebringes i en ikke naturlig forekommende sammensetning, blanding eller form. Slike sammensetninger omfatter ikke naturlig forekommende sammensetninger som omfatter minst en eller to fullengde, C- og/eller N-terminalt delerte varianter, doméner, fragmenter eller spesifiserte varianter av anti-IL-12-antistoffet, med en aminosyresekvens utvalgt fra gruppen bestående av 70-100% av de
 10 på hverandre følgende aminosyrene i SEKV. ID. numrene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 eller 8, eller spesifiserte fragmenter, doméner eller varianter derav. Anti-IL-12-avledete proteinsammensetninger, fragmentsammensetninger eller variantsammensetninger, kan omfatte minst ett eller to fullengde fragmenter, fullengde doméner eller fullengde varianter av minst ett CDR-holdig område fra anti-IL-12-antistoff-sekvensen,
 15 omfattende 70-100% av SEKV. ID. numrene 1, 2, 3, 4, 5, 6, eller spesifiserte fragmenter, doméner eller varianter derav. Ytterligere sammensetninger omfatter 40-99% av minst én av 70-100% av SEKV. ID. numrene 1, 2, 3, 4, 5, 6, eller spesifiserte fragmenter, doméner eller varianter derav. Disse prosentverdiene for sammensetningene er basert på vekt, volum, konsentrasjon, molaritet eller molalitet som flytende eller faste
 20 løsninger, blandinger, suspensjoner, emulsjoner eller kolloidale løsninger, som kjent innen faget eller som beskrevet heri.

Anti-IL-12-antistoffsammensetninger ifølge foreliggende oppfinnelse kan videre omfatte minst en av enhver egnet eller effektiv mengde av en sammensetning eller et
 25 farmasøytisk preparat som omfatter minst ett anti-IL-12-antistoff til en celle, et vev, et organ, et dyr eller en pasient med behov for slik modulering, behandling eller terapi, om ønskelig videre omfattende minst én forbindelse utvalgt blant minst én TNF-antagonist (for eksempel, men ikke begrenset til, et TNF-antistoff eller -fragment, en løselig TNF-reseptor eller et fragment derav, fusjonsproteiner derav eller en lavmolekylær TNF-antagonist), et antirevmatisk middel (for eksempel metotreksat, auranofin,
 30 aurotioglukose, azatioprin, etanercept, gull-natriumtiomalat, hydroksyklorokinsulfat, leflunomid, sulfasalzin), et muskelavslappende middel, et narkotisk middel, et ikke-steroid antiinflammatorisk medikament (NSAID), et smertestillende middel, et anestesimiddel, et beroligende middel, et lokalbedøvende middel, et neuromuskulært
 35 blokkerende middel, et antimikrobielt middel (for eksempel aminoglykosid, et antifungalt middel, et antiparasittmiddel, et antiviralt middel, et karbapenem, cefalosporin, et fluorkinolon, et makrolid, et penicillin, et sulfonamid, et tetrasyklin, et

annet antimikrobielt middel), et antipsoriasis middel, et corticosteroid, et anabolsk steroid, et diabetesforbundet middel, et mineral, et næringsstoff, et tyroid middel, et vitamin, et kalsiumforbundet hormon, et anti-diaréetisk middel, et hostestillende middel, et antiemetisk middel, et anti-ulcermiddel, et avføringsmiddel, et anti-

5 koagulasjonsmiddel, et erythropoietin (for eksempel epoetin alfa), et filgrastim (for eksempel G-CSF, Neupogen), et sargramostim (GM-CSF, Leukine), en immunisering, et immunglobulin, et immunsupprimerende middel (for eksempel basiliximab, syklosporin, daclizumab), et veksthormon, et hormonerstatningsmedikament, en østrogenreseptormodulator, et mydriatisk middel, et sykloplegiamiddel, et alkylerende

10 middel, en antimetabolitt, en mitoseinhibitor, et radioaktivt merket farmasøytisk middel, et anti-depressivum, et anti-manisk middel, et anti-psykotisk middel, et anxiolytisk middel, et hypnotikum, et sympatomimetisk middel, et stimulerende middel, donepezil, tacrin, et astma medikament, en beta agonist, et inhalert steroid, en leukotrien inhibitor, et metylxantin, et cromolyn, et epinefrin eller en analog derav, dornase alfa

15 (Pulmozyme), et cytokin eller en cytokinantagonist. Ikke-begrensede eksempler på slike cytokiner inkluderer, men er ikke begrenset til, ethvert cytokin fra IL-1 til IL-23. Egnede doser er velkjente innen faget. Se for eksempel Wells et al., red., Pharmacotherapy Handbook, 2, utg., Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon

20 Publishing, Loma Linda, Ca. (2000).

Slike anticancermidler og antiinfeksjonsmidler kan også omfatte toksinmolekyler som er assosiert, bundet, utformet sammen med eller tilført sammen med minst ett antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse. Toksinet kan om ønskelig virke slik at det selektivt

25 dreper den patologiske celle eller det patologiske vev. Den patologiske celle kan være en kreftcelle eller en annen celle. Slike toksiner kan være, men er ikke begrenset til, rensed eller rekombinant toksin eller et toksinfragment som omfatter minst ett funksjonelt cytotoxisk toksindomène, for eksempel utvalgt blant en eller flere av ricin, difteritoksin, et slangetoksin eller et bakterietoksin. Begrepet toksin omfatter både

30 endotoksiner og exotoksiner som dannes av enhver naturlig forekommende, mutert eller rekombinant bakterie eller virus som kan forårsake enhver patologisk tilstand i mennesker og andre pattedyr, innbefattet toksinsjokk, som kan føre til døden. Slike toksiner kan omfatte, men er ikke begrenset til, varmelabilt enterotoksin (LT) fra enterotoksigen *E. coli*, varmestabilt enterotoksin (ST), *Shigella*-cytokin, *Aeromonas*-

35 enterotoksiner, toksisk sjokksyndrom toksin-1 (TSST-1), stafylokokk-enterotoksin A (SEA), B (SEB) eller C (SEC), streptokokkenterotoksiner, og liknende. Slike bakterier omfatter, men er ikke begrenset til, stammer av en art av enterotoksigenet *E. coli*

- (ETEC), enterohemorragisk *E. coli* (for eksempel stammer av serotype 0157:H7), stafylokokkarter (for eksempel *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*), *Shigella*-arter (for eksempel *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* og *Shigella sonnei*), *Salmonella*-arter (for eksempel *Salmonella typhi*, *Salmonella cholera-*
 5 *suis*, *Salmonella enteritidis*), *Clostridium*-arter (for eksempel *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*), *Camphlobacter*-arter (for eksempel *Camphlobacter jejuni*, *Camphlobacter fetus*), *Heliobacter*-arter (for eksempel *Heliobacter pylori*), *Aeromonas*-arter (for eksempel *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Pleisomonas Shigelloides*, *Yersina enterocolitica*),
 10 *Vibrios*-arter (for eksempel *Vibrios cholerae*, *Vibrios parachemolyticus*), *Klebsiella*-arter, *Pseudomonas aeruginosa* og *Streptococci*. Se for eksempel Stein, red., INTERNAL MEDICINE, tredje utg., s. 1-13, Little, Brown and CO., Boston, (1990); Evans et al., red., Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control, 2. utg., s. 239-254, Plenum Medical Book Co., New York (1991; Mandell et al., Principles and
 15 Practice of Infectious Diseases, 3. utg., Churchill Livingstone, New York (1990); Berkow et al., red., *The Merck Manual*, 16.utg, Merck and Co., Rahway, N. J., 1992; Wood et al., FEMS Microbiology Immunology, 76:121-134 (1991); Marrack et al., Science, 248:705-711 (1990).
- 20 Anti-IL-12-antistoff-forbindelser eller sammensetninger ifølge foreliggende oppfinnelse, kan videre omfatte ett eller flere egnete tilleggsstoffer, for eksempel, men ikke begrenset til, fortynningsmidler, bindemidler, stabilisatorer, buffere, salter, lipofile løsemidler, konserveringsmidler, adjuvaner eller liknende. Farmasøytisk aksepterbare tilleggsstoffer foretrekkes. Ikke-begrensende eksempler på og fremgangsmåter for
 25 fremstilling av slike sterile løsninger er velkjente innen faget, for eksempel, men ikke begrenset til, Gennaro, red., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18. utg., Mack Publishing Co., (Easton , PA) 1990. Farmasøytisk aksepterbare bærerestoffer som er egnete for den valgte tilførselsvei, løselighet og/eller stabilitet av anti-IL-12-antistoffet, -fragmentet eller -variantsammensetningen, kan utvelges rutinemessig, som velkjent
 30 innen faget eller som beskrevet heri.
- Farmasøytiske eksipienser og tilsetningsstoffer som er anvendbare i foreliggende oppfinnelsen, omfatter, men er ikke begrenset til, proteiner, peptider, aminosyrer, lipider og karbohydrater (for eksempel sukkere, innbefattet monosakkarider, di-, tri-, tetra- og
 35 oligosakkarider, derivatiserte sukkere, for eksempel alditoler, aldonsyrer, forestrede sukkere og liknende, og polysakkarider eller sukkerpolymerer), som kan foreligge enkeltvis eller i kombinasjon og som alene eller i kombinasjon utgjør 1-99,99%

(vekt/vekt eller vol/vol). Eksempler på proteineksipienser omfatter serumalbumin, for eksempel humant serumalbumin (HSA), rekombinant humant albumin (rHA), gelatin, kasein og liknende. Representative aminosyre/antistoffbestanddeler, som også kan fungere som buffere, omfatter alanin, glycin, arginin, betain, histidin, glutaminsyre, asparaginsyre, cystein, lysin, leucin, isoleucin, valin, metionin, fenylalanin, aspartam og liknende. En foretrukket aminosyre er glycin.

Karbohydrateksipienser som er egnede for anvendelse i oppfinnelsen omfatter for eksempel monosakkarider som fruktose, maltose, galaktose, glukose, D-mannose, sorbose og liknende, disakkarider som laktose, sukrose, trehalose, cellobiose og liknende, polysakkarider som raffinose, melezitose, maltodekstriner, dekstraner, stivelser og liknende, og alditoler som mannitol, xylitol, maltitol, laktitol, xylitolsorbitol (glucitol), myoinositol og liknende. Foretrukne karbohydrateksipienser for anvendelse i foreliggende oppfinnelsen er mannitol, trehalose og raffinose.

Anti-IL-12-antistoffsammensetninger kan også omfatte en buffer eller et pH-justerende middel, bufferen er typisk et salt, fremstilt fra en organisk syre eller base.

Representative buffere omfatter organiske syresalter, som salter av sitronsyre, askorbinsyre, glukonsyre, karbonsyre, vinsyre, ravsyre, eddiksyre eller ftalsyre, Tris, trometamin-hydroklorid eller fosfatbuffere. Foretrukne buffere for anvendelse i foreliggende oppfinnelse er salter av organiske syrer, for eksempel sitrat.

I tillegg kan anti-IL-12-antistoffsammensetninger ifølge oppfinnelsen omfatte polymere eksipienser/tilsetningsstoffer som polyvinylpyrrolidoner, ficoller (et polymert sukker), dekstrater (for eksempel syklodekstriner som 2-hydroksypropyl- β -syklodekstrin), polyetylenglykoler, smaksmidler, antimikrobielle midler, søtningsmidler, antioksidanter, antistatiske midler, overflateaktive midler (for eksempel polysorbater som "TWEEN 20" og "TWEEN 80"), lipider (for eksempel fosfolipider, fettsyrer), steroider (for eksempel kolesterol) og gelateringsmidler (for eksempel EDTA).

Disse og andre kjente farmasøytiske eksipienser og/eller tilsetningsstoffer som er egnede for anvendelse i anti-IL-12-antistoffsammensetningen, delssammensetningen eller variantsammensetningen ifølge foreliggende oppfinnelse, er kjente innen faget, for eksempel som opplistet i "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19. utg., Williams & Williams, (1995), og i "Physician's Desk Reference", 52. utg., Medical Economics, Montvale, NJ (1998). Foretrukne bærer- eller eksipiensmaterialer kan være karbohydrater (for eksempel sakkarider og alditoler) og buffere (for eksempel sitrat)

eller polymere midler.

Utforminger

Oppfinnelsen kan tilveiebringes i stabile utforminger, som fortrinnsvis omfatter en
 5 fosfatbuffer med natriumklorid eller et annet salt, så vel som konserverte løsninger og
 sammensetninger som inneholder et konserveringsmiddel, så vel som konserverte
 sammensetninger for flere gangers bruk, egnete for farmasøytisk eller
 veterinærmedisinsk anvendelse, som omfatter minst ett anti-IL-12-antistoff i en
 farmasøytisk akseptert sammensetning. Konserverte sammensetninger inneholder
 10 minst ett kjent konserveringsmiddel eller om ønskelig, utvalgt fra gruppen bestående av
 minst en fenol, m-kresol, p-kresol, o-kresol, klorkresol, benzylalkohol,
 fenylkvikksølvnitritt, fenoksyetanol, formaldehyd, klorbutanol, magnesiumklorid (for
 eksempel heksahydratet), alkylparaben (metyl, etyl, propyl, butyl og liknende),
 benzalkoniumklorid, benzetoniumklorid, natriumdehydroacetat og timerosal, eller
 15 blandinger av disse i et vandig fortynningsmiddel. Enhver egnet konsentrasjon eller
 blanding kan anvendes som kjent innen faget, for eksempel 0,001-5%, eller ethvert
 område eller enhver verdi deri, for eksempel, men ikke begrenset til, 0,001, 0,003,
 0,005, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0,
 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0,
 20 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,3, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 eller ethvert
 område eller enhver verdi deri. Ikke-begrensede eksempler omfatter intet
 konserveringsmiddel, 0,1-2% m-kresol (for eksempel 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,9, 1,0%),
 0,1-3% benzylalkohol (for eksempel 0,5, 0,9, 1,1, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5%), 0,001-0,5%
 timerosal (for eksempel 0,005, 0,01), 0,001-2,0% fenol (for eksempel 0,05, 0,25, 0,28,
 25 0,5, 0,9, 1,0%), 0,0005-1,0% alkylparaben(er), (for eksempel 0,00075, 0,0009, 0,001,
 0,002, 0,005, 0,0075, 0,009, 0,01, 0,02, 0,05, 0,075, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,75, 0,9,
 1%) og liknende.

Oppfinnelsen kan fremstilles i en gjenstand som omfatter innpakkingsmateriale og
 30 minst en ampulle som omfatter en løsning av minst ett anti-IL-12-antistoff med de
 foreskrevne buffere og/eller konserveringsmidler, om ønskelig i et vandig
 fortynningsmiddel, hvori innpakkingsmaterialet omfatter en merkelapp som angir at
 løsningen skal lagres over et tidsrom på 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48,
 54, 60, 66, 72 timer eller mer. Videre kan det fremstilles et produkt som omfatter
 35 innpakkingsmateriale, en første ampulle som inneholder minst ett frysetørket anti-IL-
 12-antistoff og en andre ampulle som omfatter et vandig fortynningsmiddel med en
 foreskrevet buffer eller et konserveringsmiddel, hvori innpakkingsmaterialet omfatter en

merkelapp som instruerer en pasient vedrørende rekonstituering av anti-IL-12-antistoffet eller -antistoffene i det vandige fortynningsmiddel for dannelselse av en løsning som kan lagres over et tidsrom på 24 timer eller mer.

- 5 Anti-IL-12-antistoffet eller -antistoffene som anvendes i samsvar med foreliggende oppfinnelse kan fremstilles ved rekombinante midler, innbefattet fra pattedyrceller eller transgene preparater, eller de kan renses fra andre biologiske kilder som beskrevet heri eller som kjent innen faget.
- 10 Konsentrasjonsområdet for anti-IL-12-antistoffet eller -antistoffene i produktet kan omfatte mengder som etter rekonstituering i et flytende /tørt system gir konsentrasjoner på fra tilnærmet 1,0 µg/ml til tilnærmet 1000 mg/ml, selv om lavere og høyere konsentrasjoner har aktivitet, og avhenger av den påtenkte tilførselsbærer, for eksempel vil flytende utforminger være forskjellige fra transdermale plastere, pulmonare
15 fremgangsmåter, transmukosale fremgangsmåter eller fremgangsmåter som omfatter osmotiske pumper eller mikropumper.

- Det vandige fortynningsmiddel omfatter fortrinnsvis om ønskelig, videre et farmasøytisk aksepterbart konserveringsmiddel. Foretrukne konserveringsmidler
- 20 omfatter konserveringsmidler utvalgt fra gruppen bestående av fenol, m-kresol, p-kresol, o-kresol, klorkresol, benzylalkohol, alkylparaben, (metyl, etyl, propyl, butyl og liknende), benzalkoniumklorid, benzetoniumklorid, natriumdehydroacetat og timerosal, eller blandinger av disse. Konsentrasjonen av konserveringsmiddel som anvendes i sammensetningen er en konsentrasjon som er tilstrekkelig til å gi en antimikrobiell
25 virkning. Konsentrasjonen avhenger av det valgte konserveringsmiddel og kan lett bestemmes av den erfarne fagperson.

- Andre eksipienser, for eksempel isotonisitetsmidler, buffere, antioksidanter eller konserveringsforsterkere, kan om ønskelig og fortrinnsvis tilsettes til
- 30 fortynningsmiddelet. Et isotonisitetsmiddel, for eksempel glyserin, anvendes hyppig i kjente konsentrasjoner. En fysiologisk tolererbar buffer tilsettes fortrinnsvis for å gi forbedret pH-kontroll. Utformingene kan dekke et bredt pH-område, for eksempel fra tilnærmet pH 4 til pH 10, og foretrukne områder fra tilnærmet pH 5 til tilnærmet pH 9, og et mest foretrukket område fra tilnærmet 6,0 til tilnærmet 8,0. Utformingene ifølge
35 foreliggende oppfinnelse har fortrinnsvis en pH mellom tilnærmet 6,8 og tilnærmet 7,8. Foretrukne buffere omfatter fosfatbuffere, mest foretrukket natriumfosfat, spesielt foretrukket fosfatbufret saltvann (PBS).

Andre tilsetningsstoffer, for eksempel farmasøytisk aksepterbare solubiliseringssmidler som Tween 20 (polyoksyetylen (20) sorbitanmonolaurat), Tween 40 (polyoksyetylen (20) sorbitanmonopalmitat), Tween 80 (polyoksyetylen (20) sorbitanmonooleat),
5 Pluronic F68 (polyoksyetylen-polyoksypropylen-blokkpolymerer) og PEG (polyetylenglykol eller ikke-ioniske overflateaktive midler som polysorbat 20 eller 80 eller poloksamér 184 eller 188, "Pluronic"-polymerer, andre blokk ko-polymerer og chelatorer som EDTA og EGTA, kan om ønskelig tilsettes til utformingene eller sammensetningene for redusering av aggregering. Disse tilsetningsstoffene er spesielt
10 anvendbare dersom en pumpe eller plastbeholder anvendes for tilførsel av sammensetningen. Nærvær av farmasøytisk aksepterbare overflateaktive midler reduserer proteinets tendens til aggregering.

Utformingene kan fremstilles ved en prosess som omfatter sammenblanding av minst ett
15 anti-IL-12-antistoff og et konserveringsmiddel utvalgt fra gruppen bestående av fenol, m-kresol, p-kresol, o-kresol, klorkresol, benzylalkohol, alkylparaben, (metyl, etyl, propyl, butyl og liknende), benzalkoniumklorid, benzetoniumklorid, natriumdehydroacetat og timerosal, eller blandinger av disse i et vandig fortynningsmiddel. Sammenblanding av minst ett anti-IL-12-antistoff og
20 konserveringsmiddel i et vandig fortynningsmiddel, utføres ved anvendelse av konvensjonelle oppløsnings- og sammenblandingsfremgangsmåter. For fremstilling av en egnet utforming blandes for eksempel en utmålt mengde av minst ett anti-IL-12-antistoff i en bufret løsning med det ønskete konserveringsmiddel i en bufret løsning i mengder som er tilstrekkelige til å gi protein og konserveringsmiddel i den ønskete
25 konsentrasjon. Varianter av denne prosess vil være kjente blant gjennomsnittsfagfolk. For eksempel, rekkefølgen som bestanddelene tilsettes i, dersom ytterligere tilsetningsstoffer anvendes, og temperatur og pH sammensetningen fremstilles ved, er alle faktorer som kan optimaliseres for den anvendte konsentrasjon og tilførselsmåte.

30 Utformingene, ifølge kravene, kan tilføres til pasienter som klare løsninger eller som to ampuller, hvor den ene ampulle inneholder minst ett frysetørket anti-IL-12-antistoff som rekonstitueres med en andre ampulle som inneholder vann, et konserveringsmiddel og/eller eksipienser, fortrinnsvis en fosfatbuffer og/eller natriumklorid og et utvalgt salt, i et vandig fortynningsmiddel. Den ene ampulle med løsningen eller de to ampuller som
35 krever rekonstituering, kan anvendes flere ganger og kan være tilstrekkelig for en eller flere sykluser med pasientbehandling, og kan således gi et mer praktisk behandlingsskjema enn hva som nå er tilgjengelig.

De fremstilte artiklene er anvendbare for tilførsel over et tidsrom som strekker seg fra umiddelbart til 24 timer eller mer. Følgelig byr de fremstilte artikler på vesentlige fordeler for pasienten. Utformingene kan om ønskelig trygt lagres ved temperaturer på mellom ca. 2 og ca. 40 °C, og bibeholde proteinets biologiske aktivitet over lengre tidsrom, noe som tillater en merkelapp som angir at løsningen kan lagres og/eller anvendes over et tidsrom på 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 eller 96 timer eller mer. Dersom et fortynningsmiddel med konserveringsmiddel anvendes, kan merkelappen angi anvendelse i opptil 1-12 måneder, et halvt år, 1,5 år og/eller 2 år.

Løsninger av ett eller flere anti-IL-12-antistoffer i oppfinnelsen kan fremstilles ved en fremgangsmåte som omfatter sammenblanding av minst ett antistoff i et vandig fortynningsmiddel. Sammenblandingen utføres ved anvendelse av konvensjonelle fremgangsmåter for oppløsning og sammenblanding. For fremstilling av et egnet fortynningsmiddel blandes for eksempel en utmålt mengde av minst ett antistoff i vann eller buffer i mengder som er tilstrekkelige til at proteinet og om ønskelig, konserveringsmiddel eller buffer foreligger i den ønskete konsentrasjon. Varianter av denne fremgangsmåte vil være kjente blant gjennomsnittsfagfolk. For eksempel, rekkefølgen som bestanddelene tilsettes i, hvorvidt ytterligere tilsetningsstoffer anvendes, og temperatur og pH sammensetningen fremstilles ved, er alle faktorer som kan optimaliseres for den anvendte konsentrasjon og tilførselsmåte.

Produktene kan tilføres til pasienter som klare løsninger eller som to ampuller, hvor den ene ampulle inneholder minst ett frysetørket anti-IL-12-antistoff som rekonstitueres med en andre ampulle som inneholder det vandige fortynningsmiddel. Den ene ampulle med løsningen eller de to ampuller som krever rekonstituering, kan anvendes flere ganger og kan være tilstrekkelig for en eller flere sykluser med pasientbehandling, og kan således gi et mer praktisk behandlingsskjema enn hva som nå er tilgjengelig.

Produktene kan tilføres indirekte til pasienter ved at apoteker, klinikker eller andre tilsvarende institusjoner og fasiliteter tilføres klare løsninger eller to ampuller som omfatter en ampulle med minst et frysetørket anti-IL-12-antistoff som rekonstitueres med en andre ampulle som inneholder det vandige fortynningsmiddel. Den klare løsning kan i dette tilfelle omfatte opptil en liter eller mer, noe som gir et stort reservoar, som mindre porsjoner av oppløsningen av ett eller flere antistoffer kan uttas fra, en eller flere ganger, for overføring til mindre ampuller, og overføres fra apoteket eller klinikken til kundene og/eller pasientene.

- Anerkjente innretninger som omfatter disse enkeltampullesystemene, omfatter penn-injeksjonsinnretninger for tilførsel av en løsning som BD Pens, BD "Autojector", "Humaject", "NovoPen", "B-D"Pen, "AutoPen" og "OptiPen", "GenotropinPen",
- 5 "Genotronorm Pen", "Humatro Pen", "Reco-Pen", "Roferon Pen", "Biojector", "iject", "J-tip Needle-Free Injector", "Intraject", "Medi-Ject", for eksempel som fremstilt eller utviklet av Becton Dickenson (Franklin Lakes, NJ, www.bectondickenson.com), Disetronic (Burgdorf, Sveits, www.disetronic.com; Bioject, Portland, Oregon (www.bioject.com); National Medical Products, Weston Medical (Peterborough, UK,
- 10 www.weston-medical.com), Medi-Ject Corp. (Minneapolis, MN, www.mediject.com). Anerkjente innretninger som omfatter et to-ampullesystem omfatter penn-injeksjonssystemer for rekonstituering av et frysetørket medikament i en patron for tilførsel av den rekonstituerte løsning, for eksempel "HumatroPen".
- 15 Produktene omfatter innpakkingsmateriale. Innpakkingsmaterialet gir i tillegg til den informasjon som kreves av myndighetene, betingelsene som produktet skal anvendes under. Innpakkingsmaterialet gir pasienten instruksjoner vedrørende rekonstituering av anti-IL-12-antistoffet eller -antistoffene i det vandige fortynningsmiddel for dannelsen av en løsning, og vedrørende anvendelse av løsningen over et tidsrom på 2-24 timer eller
- 20 mer for to-ampulle-løsning/faststoff-produktet. For det oppløste produkt i den ene ampulle angir merkelappen at løsningen kan anvendes over et tidsrom på 2-24 timer eller mer. Produktene er anvendbare for anvendelse som humane, farmasøytiske produkter.
- 25 Utformingene fremstilles ved en prosess som omfatter sammenblanding av minst ett anti-IL-12-antistoff og en utvalgt buffer, fortrinnsvis en fosfatbuffer som inneholder natriumklorid eller et annet salt. Sammenblanding av antistoffet eller antistoffene og bufferen i et vandig fortynningsmiddel utføres ved anvendelse av konvensjonelle fremgangsmåter for oppløsning og sammenblanding. For fremstilling av en egnet sammensetning, blandes for eksempel en utmålt mengde av minst ett antistoff i vann
- 30 eller buffer med det ønskete bufringsmiddel i vann, i mengder som er tilstrekkelige til å gi protein i den ønskete konsentrasjon. Varianter av denne fremgangsmåte vil være kjente blant gjennomsnittsfagfolk. For eksempel, rekkefølgen som bestanddelene tilsettes i, hvorvidt ytterligere tilsetningsstoffer anvendes, og temperatur og pH
- 35 sammensetningen fremstilles ved, er alle faktorer som kan optimaliseres for den anvendte konsentrasjon og tilførselsmåte.

- De stabile eller konserverte sammensetningen ifølge kravet, kan tilføres pasienter som klare løsninger eller som to ampuller som omfatter en ampulle med minst ett frysetørket anti-IL-12-antistoff som rekonstitueres med en andre ampulle som inneholder et konserveringsmiddel eller en buffer og eksipienser i et vandig fortynningsmiddel. Den ene ampulle med løsningen eller de to ampullene som krever rekonstituering, kan anvendes flere ganger og kan være tilstrekkelig for en eller flere sykluser med pasientbehandling, og tilveiebringer således et mer hendig behandlingsskjema en hva som i dag er tilgjengelig.
- Minst ett anti-IL-12-antistoff i enten de stabile eller konserverte sammensetningene eller løsningene som beskrives heri, kan tilføres til en pasient i samsvar med foreliggende oppfinnelse via en rekke tilførselsfremgangsmåter, innbefattet SC- eller IM-injeksjon, transdermalt, pulmonart, transmukosalt, ved implantering, via en osmotisk pumpe, patron, mikropumpe eller andre midler som er kjente blant fagfolk, som velkjent innen faget.

Terapeutiske anvendelser

- Foreliggende oppfinnelse kan anvendes i en fremgangsmåte for modulering eller behandling av minst én immunforbundet sykdom i en celle, et vev, et organ, et dyr eller en pasient, som omfatter, men ikke begrenset til, en eller flere av reumatoid artritt, juvenil reumatoid artritt, systemisk juvenil reumatoid artritt, psoriatisk artritt, ankyloserende spondylitt, magesår, seronegative artropatier, osteoartritt, inflammatorisk tarmsykdom, ulcerativ kolitt, systemisk lupus erytematosus, antifosfolipidsyndrom, iridosyklitt/uveitt/optisk neuritt, idiopatisk pulmonar fibrose, systemisk vasculitt/wegener's granulomatose, sarkoidose, orchitt/fremgangsmåter for vasktomireversering, allergiske/atopiske sykdommer, astma, allergisk rhinitt, eksem, allergisk kontaktdermatitt, allergisk konjunktivitt, hypersensitivitetspneumonitt, transplantater, organtransplantasjonsavvisning, "graft-versus-host"-sykdom, systemisk inflammatorisk responssyndrom, sepsis syndrom, gram-positiv sepsis, gram-negativ sepsis, dyrkingsnegativ sepsis, fungal sepsis, neutropen feber, urosepsis, meningokokkemi, traume/blødning, brannsåre, eksponering overfor ioniserende stråling, akutt pankreatitt, sjokklunge, reumatoid artritt, alkoholindusert hepatitt, kroniske inflammatoriske sykdomstilstander, sarkoidose, Crohn's sykdom, sigdcelleanemi, diabetes, nefrose, atopiske sykdommer, hypersensitivitetsreaksjoner, allergisk rhinitt, høysnue, helårsrhinitt, konjunktivitt, endometriose, astma, urticaria, systemisk anafalaksi, dermatitt, pernisiøs anemi, hemolyttisk sykdom, trombocytopeni, transplantatrejeksjon av ethvert organ eller vev, nyretransplantatrejeksjon,

hjertetransplantatreksjon, levertransplantatreksjon,
 bukspyttkjerteltransplantatreksjon, lungetransplantatreksjon, beinmargstransplantat
 (BMT)-reksjon, hudallograft reksjon, bindevevstransplantatreksjon,
 beintransplantatreksjon, tynntarmstransplantatreksjon, reksjon av implantering av
 5 føtalt brissel, paratyroid transplantatreksjon, xenograft reksjon av ethvert organ eller
 vev, allograft reksjon, anti-reseptor-hypersensitivetsreaksjoner, Graves sykdom,
 Raynoud's sykdom, type B insulinresistent diabetes, astma, myastenia gravis, antistoff-
 formidlet cytotoxisitet, type III-hypersensitivetsreaksjoner, systemisk lupus
 erythematosus, POEMS syndrom (polyneuropati, organomegali, endokrinopati,
 10 monoklonal gammopati og hudendringssyndrom), polyneuropati, organomegali,
 endokrinopati, monoklonal gammopati, hudendringssyndrom, antifosfolipid syndrom,
 pemphigus, skleroderma, blandet bindevevssykdom, idiopatisk Addison's sykdom,
 diabetes mellitus, kronisk aktiv hepatitt, primær gallecirrhose, vitiligo, vasculitt, post-
 MI-kardiotomisyndrom, type IV hypersensitivitet, kontaktdermatitt,
 15 hypersensitivitetspneumonitt, allograftplantatreksjon, granulomer grunnet
 intracellulære organismer, medikamentsensitivitet, metabolsk/idiopatisk, Wilson's
 sykdom, hemakromatose, alfa 1-antitrypsin mangel, diabetisk retinopati, hashimoto's
 tyreoiditt, osteoporose, hypotalamus-hypofyse-binyreakse evaluering, primær
 gallecirrhose, tyreoiditt, encefalomyelitt, kachexi, cystisk fibrose, neonatal kronisk
 20 lungesykdom, kronisk obstruktiv lungesykdom (COPD), familiær hematofagocytisk
 lymfocytose, dermatologiske tilstander, psoriasis, alopeci, nefrotisk syndrom,
 nefritt, glomerulær nefritt, akutt nyresvikt, hemodialyse, uremi, toksisitet, preeklampsi,
 okt3-behandling, anti-cd3-behandling, cytokin behandling, kjemoterapi,
 strålebehandling (innbefattet, men ikke begrenset til asteni, anemi, kachexi og
 25 liknende), kronisk salicylat intoksikasjon og liknende. Se for eksempel Merck Manual,
 12.-17. utgave, Merck & Company, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999),
 Pharmacotherapy Handbook, Wells et al., red., 2. utgave, Appleton and Lange,
 Stamford, Conn. (1998, 2000).

30 Foreliggende oppfinnelse kan også anvendes i en fremgangsmåte for modulering eller
 behandling av minst en kardiovaskulær sykdom i en celle, et vev, et organ, et dyr eller
 en pasient, innbefattet,

Side 40 og side 41 i originalen mangler her

35

samtidig med og/eller etter minst en forbindelse utvalgt blant minst en TNF-antagonist
 (for eksempel, men ikke begrenset til, et TNF-antistoff eller et fragment derav, en

løselig TNF-reseptor eller et fragment derav, fusjonsproteiner derav eller en lavmolekylær TNF-antagonist), et antirevmatisk middel (for eksempel metotrexat, auranofin, aurotioglukose, azatioprin, etanercept, gull-natriumtiomalat, hydroksyklorokinsulfat, leflunomid, sulfasalzin), et muskelavslappende middel, et
 5 narkotisk middel, et ikke-steroid antiinflammatorisk medikament (NSAID), et analgetisk middel, et anestetisk middel, et beroligende middel, et lokalbedøvende middel, et neuromuskulært blokkerende middel, et antimikrobielt middel (for eksempel aminoglykosid, et antifungalt middel, et antiparasitt middel, et antiviralt middel, et karbapenem, cefalosporin, et flurorkinolon, et makrolid, et penicillin, et sulfonamid, et
 10 tetrasyklin, et annet antimikrobielt middel), et antipsoriatisk middel, et kortikosteroid, et anabolsk steroid, et diabetesforbundet middel, et mineral, et næringsstoff, et tyroid middel, et vitamin, et kalsiumforbundet hormon, et antidiarétisk middel, et hostemiddel, et antiemetisk middel, et antiulcermiddel, et avføringsmiddel, et antikoagulasjonsmiddel, et erythropoeitin (for eksempel epoetin alfa), et filgrastim (for
 15 eksempel G-CSF, Neupogen), et sargramostim (GM-CSF, Leukin), en immunisering, et immunglobulin, et immunsupprimerende middel (for eksempel basiliximab, syklosporin, daclizumab), et veksthormon, et hormonerstatningsmedikament, en østrogenreseptormodulator, et mydriatisk middel, et sykloplegisk middel, et alkyleringsmiddel, en antimetabolitt, en mitoseinhibitor, et radioaktivt farmasøytisk
 20 middel, et antidepressjonsmiddel, et antimanisk middel, et antipsykotisk middel, et anxiolytisk middel, et hypnotisk middel, et sympatomimetisk middel, et stimuleringsmiddel, donepezil, takrin, et astmamedikament, en beta-agonist, et inhalert steroid, en leukotrien inhibitor, et metylxantin, et cromolyn, et epineprin eller en analog derav, dornase alfa (Pulmozyme), et cytokin eller en cytokin antagonist. Egnete doser er
 25 velkjente innen faget. Se for eksempel Wells et al., red., Pharmacotherapy Handbook, 2. utg., Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000).

TNF- antagonist som er egnete for sammensetninger, kombinasjonsbehandling, samtidig tilførsel, innretninger og/eller fremgangsmåter (videre omfattende minst ett
 30 antistoff, en spesifisert del eller variant derav), kan omfatte, anti-TNF-antistoffer, antigenbindende fragmenter derav og reseptormolekyler som bindes spesifikt til TNF; forbindelser som forhindrer og/eller inhiberer TNF-syntese, TNF-frigivning eller TNF's virkning på målceller, for eksempel thalidomid, tenidap, fosfodiesteraseinhibitorer (for
 35 eksempel pentoksifyllin og rolipram), A2b-adenosinreseptoragonister og A2b-adenosinreseptorforsterkere; forbindelser som forhindrer og/eller inhiberer TNF-reseptorsignalisering, for eksempel mitogenaktivert proteinkinaseinhibitorer (MAP)

kinaseinhibitorer; forbindelser som blokkerer og/eller inhiberer spaltning av TNF i membranen, for eksempel metalloproteinaseinhibitorer, forbindelser som blokkerer og/eller inhiberer TNF-aktivitet, for eksempel angiotensinkonverterende enzym (ACE)-inhibitorer (for eksempel kaptopril); og forbindelser som blokkerer og/eller inhiberer
 5 TNF-dannelse og/eller syntese, for eksempel MAP-kineaseinhibitorer.

Som anvendt heri vil et "tumornekrosefaktorantistoff", "TNF-antistoff", "TNF-antistoff" eller et fragment eller liknende derav redusere, blokkere, inhibere, fjerne eller interferere med TNF-aktivitet *in vitro*, *in situ* og/eller fortrinnsvis *in vivo*. For eksempel
 10 kan et egnet humant TNF-antistoff binde TNF α og omfatter anti-TNF-antistoffer, antigenbindende fragmenter derav og spesifiserte mutanter eller doméner derav, som spesifikt bindes til TNF α . Et egnet TNF-antistoff eller fragment derav kan også redusere, blokkere, fjerne, interferere, forhindre og/eller inhibere TNF-RNA-, -DNA- eller -proteinsyntese, TNF-frigivning, TNF-reseptorsignalisering, spaltning av TNF i
 15 membranen, TNF-aktivitet, TNF-dannelse og/eller -syntese.

Det kimære antistoff cA2 består av det antigenbindende, variable området fra det nøytraliserende anti-human-TNF α -IgG1-antistoff med høy affinitet fra mus, betegnet A2 og de konstante områder fra et humant IgG1 kappa immunglobulin. Det humane
 20 IgG1 Fc-området forbedrer allogeneisk antistoffeffektorfunksjon, forhøyer serumhalveringstiden i sirkulasjonen og reduserer antistoffets immunogenisitet. Aviditet og epitopspesifisitet for det kimære antistoff cA2 er avledet fra det variable området fra museantistoff A2. I en spesiell utførelse er en foretrukket kilde for nukleinsyrer som koder for det variable område i A2-museantistoff, A2-hybridomcellelinjen.

25 Kimært A2 (cA2) nøytraliserer den cytotoksiske virkning av både naturlig og rekombinant human TNF- α på en doseavhengig måte. Ut fra bindingsanalyser av det kimære antistoff cA2 og rekombinant, humant TNF- α , ble affinitetskonstanten for det kimære antistoff cA2 beregnet til $1,04 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$. Foretrukne fremgangsmåter for
 30 bestemmelse av monoklonale antistoffers spesifisitet og affinitet ved kompetitiv inhibering, kan finnes i Harlow et al., *antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988; Colligan et al., red., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, New York, (1992-2000); Kozbor et al., *Immunol. Today*, 4:72-79 (1983); Ausubel et al.,
 35 red., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, New York (1987-2000); og Muller, *Meth. Enzymol.*, 92:589-601 (1983).

Monoklonale antistoff A2 framus av en cellelinje betegnet c134A kan fremstilles. Det kimære antistoff cA2 dannes av en cellelinje betegnet c168A.

Ytterligere eksempler på monoklonale anti-TNF-antistoffer som kan anvendes i foreliggende oppfinnelse er beskrevet innen faget (se for eksempel U.S. patentskrift nummer 5 231 024; Möller, A. et al., *Cytokine* 2(3):162-169 (1990); U.S. patentsøknad nr. 07/943 852 (innlevert 11. september 1992); Rathjen et al., Internasjonalt patentskrift WO 91/02078 (publisert 21. februar 1991); Rubin et al., EPO-patentskrift nr. 0218868 (publisert 22. april 1987); Yone et al., EPO patentskrift nr. 0288088 (26. oktober 1988); Liang, et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 137:847-854 (1986); Meager et al., *Hybridoma* 6:305-311 (1987); Fendly et al., *Hybridoma* 6:359-369 (1987); Bringman et al., *Hybridoma* 6:489-507 (1987); og Hirai et al., *J. Immunol. Meth.* 96:57-62 (1987).

TNF-reseptormolekyler

TNF-reseptormolekyler som kan være anvendbare er molekyler som binder TNF med høy affinitet (se for eksempel Feldmann et al., internasjonalt patentskrift WO 92/07076 (publisert 30. april 1992); Schall et al., *Cell* 61:361-370 (1990); og Loetscher et al., *Cell* 61:351-359 (1990)) og besitter om ønskelig lav immunogenisitet. Nærmere bestemt er TNF-celleoveflatereseptorene på 55 kDa (p55 TNF-R) og 75 kDa (p75 TNF-R) kan anvendes. Avkortete former av disse reseptorene, som omfatter de ekstracellulære doméner (ECD) i reseptorene eller funksjonelle deler av disse (se for eksempel Corcoran et al., *Eur. J. Biochem.* 223:831-840 (1994)), er også anvendbare i. Avkortete former av TNF-reseptorene som omfatter ECD, har blitt påvist i urin og serum som inhiberende TNF-bindende proteiner på 30 kDa og 40 kDa (Engelmann, H. et al., *J. Biol. Chem.* 265:1531-1536 (1990)). Multimere TNF-reseptormolekyler, TNF-immunreseptorfusjonsmolekyler og derivater, fragmenter eller deler av disse er ytterligere eksempler på TNF-reseptormolekyler som er anvendbare i fremgangsmåtene og sammensetningene. TNF-reseptormolekylene som kan anvendes i oppfinnelsen, særpreges ved deres evne til å behandle pasienter over lengre tidsrom med god til utmerket lindring av symptomer og lav toksisitet. Lav immunogenisitet og/eller høy affinitet, så vel som andre ikke-definerte egenskaper, kan bidra til de oppnådde terapeutiske resultater.

Multimere TNF-reseptormolekyler som kna være anvendbare, omfatter hele eller en funksjonell del av ECD fra to eller flere TNF-reseptorer, sammenkoblet via en eller flere polypeptidlinkere eller andre ikke-peptidlinkere, for eksempel polyetylenglykol (PEG). De multimere molekylene kan videre omfatte et signalpeptid fra et utskilt

protein for å styre ekspresjonen av det multimer molekyl. Disse multimer molekylene og fremgangsmåter for fremstilling av dem, er beskrevet i U.S. patentsøknad nr. 08/437 533 (innlevert 9. mai 1995).

- 5 TNF-immunreseptorfusjonsmolekyler som kan være anvendbare i fremgangsmåtene og sammensetningene, omfatter minste én del av et eller flere immunglobulinmolekyler og hele eller en funksjonell del av en eller flere TNF-reseptorer. Disse immunreseptorfusjonsmolekylene kan oppbygges som monomerer eller hetero- eller homomultimerer. Immunreseptorfusjonsmolekylene kan også være monovalente eller
- 10 multivalente. Et eksempel på et slikt TNF-immunreseptorfusjonsmolekyl er TNF-reseptor/IgG-fusjonsprotein. TNF-immunreseptorfusjonsmolekyler og fremgangsmåter for fremstilling av disse er beskrevet innen faget (Lesslauer et al., *Eur. J. Immunol.* 21:2883-2886 (1991); Ashkenazi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10535-10539 (1991); Peppel et al.,
- 15 *J. Exp. Med.* 174:1483-1489 (1991); Kolls et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:215-219 (1994); Butler et al., *Cytokine* 6(6):616-623 (1994); Baker et al., *Eur. J. Immunol.* 24:2040-2048 (1994); Beutler et al., U.S. patentskrift nr. 5 447 851; og U.S. patentsøknad nr. 08/442 133 (innlevert 16. mai 1995). Fremgangsmåter for fremstilling av immunreseptorfusjonsmolekyler kan også finnes i Capon et al., U.S. patentskrift nr.
- 20 5 116 964; Capon et al., U.S. patentskrift nr. 5 225 538; og Capon et al., *Nature* 337:525-531 (1989).

En funksjonell ekvivalent, et derivat, et fragment eller et område fra et TNF-reseptormolekyl viser til den del av TNF-reseptormolekylet eller den del av TNF-reseptormolekylsekvensen som koder for TNF-reseptormolekylet som er av tilstrekkelig størrelse og omfatter tilstrekkelig sekvens til funksjonelt å likne TNF-reseptormolekyler som kan anvendes i foreliggende oppfinnelse (som for eksempel binder TNF med høy affinitet og besitter lav immunogenisitet). En funksjonell ekvivalent av et TNF-reseptormolekyl omfatter også modifiserte TNF-reseptormolekyler som funksjonelt

30 likner TNF-reseptormolekyler som kan anvendes i foreliggende oppfinnelse (som for eksempel binder TNF med høy affinitet og besitter lav immunogenisitet). En funksjonell ekvivalent av et TNF-reseptormolekyl kan for eksempel inneholde en "TAUS" kodonendring eller en eller flere aminosyresubstitusjoner, -delesjoner eller -addisjoner (for eksempel erstatning av en sur aminosyre med en annen sur aminosyre, eller erstatning av ett kodon som koder for en hydrofob aminosyre med et annet kodon

35 som koder for den samme eller en annen hydrofob aminosyre). Se Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley-

Interscience, New York (1987-2000).

Cytokiner omfatter ethvert kjent cytokin. Se for eksempel

www.CopewithCytokines.com. Cytokinantagonister omfatter, men er ikke begrenset

- 5 til, ethvert antistoff, antistoff-fragment eller antistoffetterliknende molekyl, enhver løselig reseptor, fragment derav eller etterliknende molekyl, enhver lavmolekylær antagonist eller enhver kombinasjon av disse.

Terapeutiske behandlinger

- 10 Enhver fremgangsmåte som omfatter en fremgangsmåte for behandling av en IL-12-formidlet sykdom, som omfatter tilførsel av en effektiv mengde av en sammensetning eller et farmasøytisk preparat, som omfatter minst ett anti-IL-12-antistoff til en celle, et vev, et organ, et dyr eller en pasient med behov for slik modulering, behandling eller terapi. En slik fremgangsmåte kan om ønskelig videre omfatte samtidig tilførsel eller
- 15 kombinasjonsbehandling for behandling av slike immunsykdommer, hvori tilførselen av ett eller flere anti-IL-12-antistoffer eller spesifiserte deler eller varianter av disse videre omfatter tilførsel før, samtidig med og/eller etter, av minst én forbindelse utvalgt blant minst en TNF-antagonist (for eksempel, men ikke begrenset til, ett TNF-antistoff eller et fragment derav, en løselig TNF-reseptor eller et fragment derav, fusjonsproteiner
- 20 derav eller en lavmolekylær TNF-antagonist), et antirevmatisk middel (for eksempel metotrexat, auranofin, aurotioglukose, azatioprin, etanercept, gull-natriumtiomalat, hydroksyklorokinsulfat, leflunomid, sulfasalzin), et muskelavslappende middel, et narkotisk middel, et ikke-steroid antiinflammatorisk medikament (NSAID), et analgetisk middel, et anestetisk middel, et beroligende middel, et lokalbedøvende
- 25 middel, et neuromuskulært blokkerende middel, et antimikrobielt middel (for eksempel aminoglykosid, et antifungalt middel, et antiparasittmiddel, et antiviralt middel, et karbapenem, cefalosporin, et fluorkinolon, et makrolid, et penicillin, et sulfonamid, et tetrasyklin, et annet antimikrobielt middel), et antipsoriatisk middel, et corticosteroid, et anabolsk steroid, et diabetesforbundet middel, et mineral, et næringsstoff, et tyroid
- 30 middel, et vitamin, et kalsiumforbundet hormon, et anti-diaréttisk middel, et hostemiddel, et antiemetisk middel, et anti-ulcermiddel, et avføringsmiddel, et anti-koagulasjonsmiddel, et erythropoietin (for eksempel epoetin alfa), et filgrastim (for eksempel G-CSF, Neupogen), et sargramostim (GM-CSF, Leukine), en immunisering, et immunglobulin, et immunsupprimerende middel (for eksempel basiliximab,
- 35 syklosporin, daclizumab), et veksthormon, et hormonerstatningsmedikament, en østrogenreseptormodulator, et mydriatisk middel, et sykloplegisk middel, et alkyleringsmiddel, en antimetabolitt, en mitoseinhibitor, et radioaktivt merket

farmasøytisk middel, et anti-depresjonsmiddel, et anti-manisk middel, et anti-psykotisk middel, et anxiolytisk middel, et hypnotisk middel, et sympatomimetisk middel, et stimulerende middel, donepezil, tacrin, et astmamedikament, en beta-agonist, et inhalert steroid, en leukotrien inhibitor, et metylxantin, et cromolyn, et epinefrin eller en analog
 5 derav, dornase alfa (Pulmozyme), et cytokin eller en cytokinantagonist.

Behandling av patologiske tilstander oppnås typisk ved tilførsel av en effektiv mengde eller dose av minst én anti-IL-12-antistoffsammensetning som i alt utgjør fra minst tilnærmet 0,01 til 500 mg av minst ett anti-IL-12-antistoff pr. kg pasient pr. dose, og
 10 fortrinnsvis fra minst tilnærmet 0,1 til 100 mg antistoff/kg kroppsvekt pr. enkeltvis eller multiple tilførsler, avhengig av sammensetningens spesifikke aktivitet. Alternativt kan den effektive serumkonsentrasjon utgjøre 0,1-5000 µg/ml serum pr. enkeltvis eller multiple tilførsler. Egnede doser er kjente blant medisinsk personell og vil naturligvis avhenge av den gitte sykdomstilstand, den spesifikke aktivitet av sammensetningen som
 15 tilføres og pasienten som skal behandles. I visse tilfeller kan det for å oppnå den ønskede, terapeutiske mengde, være nødvendig å foreta flere gangers tilførsel, dvs. gjentatt enkeltvis tilførsel av en spesielt utmålt dose, hvor den enkeltvis tilførsel gjentas inntil den ønskete, daglige dose eller virkning oppnås.

Foretrukne doser kan om ønskelig omfatte 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99
 25 og/eller 100-500 mg/kg pr. tilførsel, eller ethvert område, enhver verdi eller enhver fraksjon derav, eller for oppnåelse av en serumkonsentrasjon på 0,1, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5, 2,9, 3,0, 3,5, 3,9, 4,0, 4,5, 4,9, 5,0, 5,5, 5,9, 6,0, 6,5, 6,9, 7,0, 7,5, 7,9, 8,0, 8,5, 8,9, 9,0, 9,5, 9,9, 10, 10,5, 10,9, 11, 11,5, 11,9, 12, 12,5, 12,9, 13,0, 13,5, 13,9, 14,0, 14,5, 4,9, 5,0, 5,5, 5,9, 6,0, 6,5, 6,9, 7,0, 7,5, 7,9, 8,0, 8,5, 8,9, 9,0, 9,5, 9,9,
 30 10, 10,5, 10,9, 11, 11,5, 11,9, 12, 12,5, 12,9, 13,0, 13,5, 13,9, 14, 14,5, 15, 15,5, 15,9, 16, 16,5, 16,9, 17, 17,5, 17,9, 18, 18,5, 18,9, 19, 19,5, 19,9, 20, 20,5, 20,9, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 96, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 790, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 og/eller 5000 µg/ml pr. enkeltvis eller flere gangers tilførsler, eller ethvert område,
 35 enhver verdi eller enhver fraksjon derav.

Alternativt kan den tilførte dose variere avhengig av kjente faktorer, for eksempel det

gitte middels farmakodynamiske egenskaper, tilførselsmåte og tilførselsvei, mottakerens alder, helsetilstand og vekt, symptomenes omfang og natur, hva slags type samtidig behandling som gis, behandlingens hyppighet og den ønskete virkning. Vanligvis kan dosen av aktiv bestanddel være fra tilnærmet 0,1 til 100 mg pr. kg kroppsvekt.

- 5 Vanligvis er fra 0,1 til 50, og fortrinnsvis 0,1 til 10 mg pr. kg kroppsvekt pr. tilførsel, eller i en form for vedvarende frigivelse effektivt når det gjelder erholdelse av de ønskete resultater.

- Som et eksempel, kan behandling av mennesker eller dyr gis som en enkelt dose eller en
 10 regelmessig tilført dose av minst ett antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse på 0,1 til 100 mg/kg, for eksempel 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 eller 100 mg/kg pr. dag, på minst en av dagene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37,
 15 38, 39, 40 eller alternativt eller i tillegg, minst en av ukene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 eller 52, eller alternativt eller i tillegg, minst en av årene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 eller 20 eller enhver kombinasjon derav, ved anvendelse av enkeltvis
 20 doser, infusjonsdoser eller gjentatte doser.

- Doseringsformer (preparater) som er egnede for intern tilførsel inneholder generelt fra tilnærmet 0,1 mg til tilnærmet 500 mg av de aktive bestanddeler pr. enhet eller beholder. I disse farmasøytiske preparatene vil den aktive bestanddel vanligvis foreligge
 25 i en mengde som utgjør fra tilnærmet 0,5 til 99,999% av vekten, basert på preparatets totalvekt.

- For parenteral tilførsel kan antistoffet utformes som en løsning, en suspensjon, en emulsjon eller et frysetørket pulver, levert sammen med eller med separat levering av et
 30 farmasøytisk aksepterbart parenteralt bærerstoff. Eksempler på slike bærerstoffer er vann, saltvann, Ringer's løsning, dekstroseløsning og 1-10% humant serumalbumin. Liposomer og ikke-vandige bærerstoffer, for eksempel fettoljer, kan også anvendes. Bærerstoffet eller det frysetørkede pulveret kan inneholde tilsetningsstoffer som opprettholder isotonisiteten (for eksempel natriumklorid, mannitol) og den kjemiske
 35 stabilitet (for eksempel buffere og konserveringsmidler). Utformingen steriliseres ved kjente eller egnede teknikker.

Egnete farmasøytiske bærestoffer er beskrevet i den siste utgave av Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, et standard referanseverk innen feltet.

Alternativ tilførsel

- 5 Mange kjente og utviklete tilførselsmåter kan anvendes for tilførsel av farmasøytisk effektive mengder av minst ett anti-IL-12-antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse. Selv om pulmonar tilførsel anvendes i den påfølgende beskrivelse, kan andre tilførselsmåter anvendes med gode resultater.
- 10 IL-12-antistoffer ifølge foreliggende oppfinnelse kan tilføres i et bærestoff, som en løsning, en emulsjon, en kolloidal løsning, en suspensjon eller som et tørt pulver ved anvendelse av en rekke innretninger og fremgangsmåter som er egnete for tilførsel ved inhalering eller andre måter, som beskrives heri eller som er kjente innen faget.

15 Parenterale utforminger og parenteral tilførsel

- Utforminger for parenteral tilførsel kan som vanlige eksipienser inneholde sterilt vann eller saltvann, polyalkylenglykoler som polyetylenglykol, vegetabiliske oljer, hydrogenerte naftalener og liknende. Suspensjoner i vann eller olje for injeksjon kan fremstilles ved anvendelse av et egnet emulsjonsmiddel eller fuktningsmiddel, og et
- 20 suspensjonsmiddel ifølge kjente fremgangsmåter. Midler for injeksjon kan være ikke-toksiske, ikke oralt tilførbare fortynningsmidler, for eksempel vandige løsninger eller en steril, injiserbar løsning eller suspensjon i et løsemiddel. Som anvendbare bærestoffer eller løsemidler er vann, Ringers løsning, isotont saltvann og så videre tillatt, som et vanlig løsemiddel eller suspensjonsmiddel kan en steril, ikke-flyktig olje anvendes. For
 - 25 disse forhold kan enhver type ikke-flyktig olje og fettsyre anvendes, innbefattet naturlige, syntetiske eller halvsyntetiske fettoljer eller fettsyrer, naturlige, syntetiske eller halvsyntetiske mono-, di- eller triglyserider. Parenteral tilførsel er kjent innen faget, og omfatter, men er ikke begrenset til, konvensjonelle injeksjonsmåter, en gassdrevet injeksjonsinnretning uten kanyle, som beskrevet i U.S. patentskrift nr.
 - 30 5 851 198, og en laserperforeringsinnretning som beskrevet i U.S. patentskrift nr. 5 839 446.

Alternativ tilførsel

- Oppfinnelsen gjelder videre tilførsel av minst ett anti-IL-12-antistoff ved parenteral,
- 35 subkutan, intramuskulær, intravenøs, intraartikulær, intrabronkial, intraabdominal, intrakapsulær, intrakartilaginøs, intrakavitarisk, intracelial, intracelebellar, intracerebroventrikulær, intrakolisk, intracervikal, intragastrisk, intrahepatisk,

intramyokardial, intraosteal, intrapelvisk, intraperikardial, intraperitoneal, intrapleural, intraprostatisk, intrapulmonar, intrarektal, intrarenal, intraretinal, intraspinal, intrasynovial, intrathoracisk, intrauterin, intravesical, bolus, vaginal, rektal, buccal, sublingual, intranasal eller transdermal tilførsel. En sammensetning med minst ett anti-IL-12-antistoff kan fremstilles for anvendelse for parenteral (subkutan, intramuskulær eller intravenøs) eller enhver annen form for tilførsel, fortrinnsvis i form av flytende løsninger eller suspensjoner, for anvendelse ved vaginal eller rektal tilførsel, fortrinnsvis i halvfast form, for eksempel, men ikke begrenset til, kremer og stikkpiller, for bukal eller sublingual tilførsel, for eksempel, men ikke begrenset til, i form av tabletter eller kapsler, eller intranasalt, for eksempel, men ikke begrenset til, i form av pulvere, nesesdråper, aerosoler eller visse midler, eller transdermalt, for eksempel, men ikke begrenset til, som en gel, salve, lotion, suspensjon eller et plastertilførselssystem med kjemiske forsterkere som dimetylsulfoksid for enten å modifisere hudstrukturen eller å øke medikamentkonsentrasjonen i det transdermale plaster (Junginger et al., i "Drug Permeation Enhancement"; Hsieh, D. S., red., s. 59-90 (Marcel Dekker, Inc. New York 1994) eller med oksidasjonsmidler som tillater påføring av preparater som inneholder proteiner eller peptider på huden (WO 98/53847), eller påføring av elektriske felt for dannelse av midlertidige transportveier, for eksempel ved elektroporering, eller å øke mobiliteten av ladete medikamenter gjennom huden, for eksempel ved iontoforese, eller ved benyttelse av ultralyd, for eksempel sonoforese (U.S. patentskrift nr. 4 309 989 og 4 767 402).

Pulmonar/nasal tilførsel

For pulmonar tilførsel tilføres en sammensetning med minst ett anti-IL-12-antistoff i en partikkelstørrelse som effektivt når de nedre luftveier i lunge eller sinus. Ifølge oppfinnelsen kan ett eller flere anti-IL-12-antistoffer tilføres ved en rekke inhalasjonsinnretninger eller nasale innretninger som er kjent innen faget for tilførsel av et terapeutisk middel ved inhalering. Innretninger som kan deponere aerosolpreparater i bihuler eller alveoler hos en pasient, omfatter inhalatorer for utmålte doser, nebulisatorer, tørrpulvergeneratorer, sprayinnretninger og liknende. Andre innretninger som er egnede for styring av pulmonar eller nasal tilførsel av antistoffer er også kjente innen faget. Alle slike innretninger kan benytte preparater som er egnede for tilførsel av antistoff i en aerosol. Slike aerosoler kan enten bestå av løsninger (både vandige og ikke-vandige) eller faste partikler. Inhalatorer for utmålte doser, for eksempel inhalatoren "Ventolin", benytter typisk en drivgass og krever aktivering under inhalering (se for eksempel WO 94/16970, WO 98/35888). Tørrpulverinhalatorer som "Turbuhaler" (Astra), "Rotahaler" (Glaxo), "Diskus" (Glaxo), "Spiros" (Dura),

innretninger markedsført av Inhale Therapeutics, og pulverinhalatoren "Spinhaler" (Fisons), benytter åndingsaktivering av et blandet pulver (US 4 668 218 Astra, EP 237507 Astra. WO 97/25086 Glaxo, WO 94/08552 Dura, US 5 458 135 Inhale, WO 94/06498 Fisons). Nebulisatorer som "AERx" Aradigm, nebulisatoren "Ultravent" (Mallinckrodt), og nebulisatoren "Acorn II" (Marquest Medical Products) (US 5 404 871 Aradigm, WO 97/22376), danner aerosoler fra løsninger, mens inhalatorer for utmålte doser, tørrpulverinhalatorer og så videre, danner aerosoler av små partikler. Disse spesifikke eksemplene på kommersielt tilgjengelige inhaleringsinnretninger, er ment å være representative for spesifikke innretninger som er egnete for utførelse av foreliggende oppfinnelse, og er ikke ment å begrense oppfinnelsens område. Et preparat som omfatter minst ett anti-IL-12-antistoff tilføres fortrinnsvis ved hjelp av en tørrpulverinhalator eller en sprayinnretning. Det finnes flere ønskelige egenskaper ved en inhaleringsinnretning for tilførsel av ett eller flere antistoffer ifølge foreliggende oppfinnelse. For eksempel er tilførselen via inhaleringsinnretningen med fordel pålitelig, reproducerbar og nøyaktig. Inhaleringsinnretningen kan om ønskelig, tilføre små, tørre partikler, for eksempel på mindre enn tilnærmet 10 μm , fortrinnsvis tilnærmet 1-5 μm , for god inhalerbarhet.

Tilførsel av IL-12-antistoffsammensetninger som en spray

En spray som omfatter et IL-12-antistoff-proteinpreparat kan fremstilles ved å presse en suspensjon eller løsning av minst ett anti-IL-12-antistoff gjennom en dyse under trykk. Dysens størrelse og konfigurasjon, det påførte trykk og gjennomstrømningshastigheten for væsken, kan velges slik at det oppnås den ønskete tilførsel og partikkelstørrelse. En elektrospy spray kan for eksempel dannes med et elektrisk felt i forbindelse med tilførsel via et kapilær eller en dyse. Partikler som inneholder minst ett anti-IL-12-antistoffprotein, tilført med en sprayinnretning, har fortrinnsvis en partikkelstørrelse som er mindre enn tilnærmet 10 μm , fortrinnsvis i området fra tilnærmet 1 μm til tilnærmet 5 μm , og mest foretrukket fra tilnærmet 2 μm til tilnærmet 3 μm .

Utforminger av sammensetninger av ett eller flere anti-IL-12-antistoffproteiner som er egnete for anvendelse med en sprayinnretning, omfatter typisk antistoffprotein i en vandig løsning i en konsentrasjon på mellom 0,1 mg og tilnærmet 100 mg av ett eller flere anti-IL-12-antistoffproteiner pr. ml løsning eller mg/g, eller ethvert område eller enhver verdi deri, for eksempel, men ikke begrenset til, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 eller 100 mg/ml eller mg/g. Utformingen kan omfatte midler som eksipienser, buffere, isotonisitetmidler,

konserveringsmidler, overflateaktive midler og, fortrinnsvis, sink. Preparatet kan også omfatte en eksipiens eller et middel for stabilisering av antistoffproteinet, for eksempel en buffer, et reduksjonsmiddel, et massegivende protein eller et karbohydrat.

Massegivende proteiner som er anvendbare for utforming av antistoffproteinpreparater
 5 omfatter albumin, protamin og liknende. Typiske karbohydrater som er anvendbare for utforming av antistoffproteiner omfatter sukrose, mannitol, laktose, trehalose, glukose eller liknende. Antistoffproteinpreparatet kan også omfatte et overflateaktivt middel som kan redusere eller forhindre overflateindusert aggregering av antistoffproteinet under atomisering av løsningen for dannelse av en aerosol. Forskjellige konvensjonelle
 10 overflateaktive midler kan anvendes, for eksempel polyoksyetylen-fettsyreestere og alkoholer og polyoksyetylsorbitol-fettsyreestere. Mengden vil generelt ligge mellom 0,001 og 14% (vekt/vekt) av preparatet. Spesielt foretrukne overflateaktive midler for foreliggende oppfinnelses formål er polyoksyetylsorbitan-monooleat, polysorbat 80, polysorbat 20 eller liknende. Ytterligere midler som er kjente innen faget for utforming
 15 av et protein, for eksempel IL-12-antistoffet eller spesifiserte deler eller varianter derav, kan også inngå i preparatet.

Tilførsel av IL-12-antistoffpreparater med en nebulisator

IL-12-antistoffprotein kan tilføres ved hjelp av en nebulisator, for eksempel en jet-
 20 nebulisator eller en ultralyd-nebulisator. I en jet-nebulisator benyttes typisk en komprimert luftkilde for dannelse av en luftstrøm med høy hastighet gjennom en åpning. Når gassen utvider seg bak dysen, dannes et område med lavt trykk, som trekker en løsning av antistoffprotein gjennom et kapilærrør tilkoblet et væskereservoar. Væskestrømmen fra kapilæret oppbrytes til ustabile filamenter og smådråper når
 25 løsningen forlater kapilæret, slik at aerosolen dannes. Et bredt utvalg av konfigurasjoner, gjennomstrømningshastigheter og ledeplatetyper kan benyttes for oppnåelse av den ønskete ytelse fra en gitt jet-nebulisator. I en ultralyd-nebulisator anvendes elektrisk energi med høy frekvens for dannelse av mekanisk vibrasjonsenergi, typisk ved anvendelse en piezoelektrisk omsetter. Denne energi overføres til
 30 antistoffproteinsammensetningen, enten direkte eller via en koblingsvæske, slik at det dannes en aerosol som omfatter antistoffproteinet. Partikler av antistoffprotein som tilføres ved hjelp av en nebulisator har fortrinnsvis en partikkelstørrelse på mindre enn tilnærmet 10 μm , fortrinnsvis i området fra tilnærmet 1 μm til tilnærmet 5 μm , og mest foretrukket fra tilnærmet 2 μm til tilnærmet 3 μm .

35

Utforminger av minst ett anti-IL-12-antistoff som er egnet for anvendelse med en nebulisator, enten en jet-nebulisator eller en ultralyd-nebulisator, omfatter typisk en

konsentrasjon på fra tilnærmet 0,1 mg til tilnærmet 100 mg av minst ett anti-IL-12-antistoffprotein pr. ml løsning. Preparatet kan omfatte midler som eksipienser, buffere, isotoniseringsmidler, konserveringsmidler, overflateaktive midler og, fortrinnsvis, sink. Preparatet kan også omfatte en eksipiens eller et middel for stabilisering av anti-IL-12-antistoffprotein eller -proteinene, for eksempel en buffer, et reduksjonsmiddel, et massegivende protein eller et karbohydrat. Massegivende proteiner som er anvendbare for utforming av preparater som inneholder minst ett anti-IL-12-antistoffprotein, omfatter albumin, protamin eller liknende. Typiske karbohydrater som er anvendbare for utforming av ett eller flere anti-IL-12-antistoffer, omfatter sukrose, mannitol, laktose, trehalose, glukose eller liknende. Preparater med minst ett anti-IL-12-antistoff kan også omfatte et overflateaktivt middel som kan redusere eller forhindre overflateindusert aggregering av anti-IL-12-antistoffet eller -antistoffene grunnet atomisering av løsningen ved dannelse av en aerosol. Forskjellige konvensjonelle overflateaktive midler kan benyttes, for eksempel polyoksyetylen-fettsyreestere og -alkoholer og polyoksyetylen-sorbital-fettsyreestere. Mengden vil generelt ligge mellom 0,001 og 4% (vekt/vekt) av preparatet. Spesielt foretrukne overflateaktive midler for foreliggende oppfinnelses formål er polyoksyetylen-sorbitanmonooleat, polysorbat 80, polysorbat 20 eller liknende. Ytterligere midler som er kjente innen faget for utforming av et protein, for eksempel et antistoffprotein, kan også inngå i preparatet.

20

Tilførsel av IL-12-antistoffsammensetninger ved hjelp av en inhalator for utmålte doser

I en inhalator for utmålte doser (MDI) inngår et drivmiddel, minst ett anti-IL-12-antistoff og eventuelle eksipienser eller andre tilsetningsstoffer i en beholder som en blanding som omfatter en flytende, komprimert gass. Aktiverting av måleventilen frigjør blandingen som en aerosol som fortrinnsvis inneholder partikler i et størrelsesområde på mindre enn tilnærmet 10 μm , fortrinnsvis fra tilnærmet 1 μm til tilnærmet 5 μm , og mer foretrukket fra tilnærmet 2 μm til tilnærmet 3 μm . Den ønskete aerosolpartikkelstørrelse kan oppnås ved benyttelse av en utforming av antistoffproteinene som er dannet ved forskjellige fremgangsmåter som er kjente blant fagfolk, innbefattet jet-maling, sprøytetørking, kondensering ved det kritiske punkt eller liknende. Foretrukne inhalatorer for utmålte doser omfatter inhalatorene fremstilt av 3M eller Glaxo og som benytter et hydrofluorkarbon som drivmiddel.

Preparater inneholdende minst ett anti-IL-12-antistoff for anvendelse med en inhalator for utmålte doser, vil generelt omfatte et finfordelt pulver som inneholder minst ett anti-IL-12-antistoff som en suspensjon i et ikke-vandig medium, for eksempel suspendert i

et drivmiddel ved hjelp av et overflateaktivt middel. Drivmiddelet kan være ethvert konvensjonelt materiale som benyttes for dette formål, for eksempel et klorfluorkarbon, et hydroklorfluorkarbon, et hydrofluorkarbon eller et hydrokarbon, innbefattet triklorfluormetan, diklordifluormetan, diklortetrafluoretanol og 1,1,1,2-tetrafluoretan, HFA-134a (hydrofluoralkan-134a), HFA-227 (hydrofluoralkan-227), eller liknende. Drivmiddelet er fortrinnsvis et hydrofluorkarbon. Det overflateaktive middel kan være valgt slik at det stabiliserer anti-IL-12-antistoffet eller -antistoffene som en suspensjon i drivmiddelet, beskytter det aktive middel mot kjemisk degradering og liknende. Egnete overflateaktive midler omfatter sorbitantrioleat, soyalecitin, oljesyre eller liknende. I noen tilfeller foretrekkes aerosoler av løsninger hvor det benyttes løsemidler som etanol. Ytterligere midler som er kjente innen faget for utforming av et protein, for eksempel et antistoff, kan også inngå i preparatet.

En gjennomsnittsfagperson vil innse at fremgangsmåten kan oppnås ved pulmonar tilførsel av sammensetninger som inneholder minst ett anti-IL-12-antistoff, ved hjelp av innretninger som ikke beskrives heri.

Orale preparater og oral tilførsel

Preparater for oral tilførsel bygger på samtidig tilførsel av adjuvanter (for eksempel resorcinoler og ikke-ioniske detergenter som polyoksyetylen-oleyleter og n-heksadecylpolyetyleneter) for på kunstig vis å forhøye tarmveggenes permeabilitet, så vel som samtidig tilførsel av enzyminhibitorer (for eksempel pancreatrypsininhibitorer, diisopropylfluorfosfat (DFF) og trasylol) for å inhibere enzymatisk degradering. Den aktive forbindelse i den faste doseringsform for oral tilførsel kan være sammenblandet minst ett tilsetningsstoff, innbefattet sukrose, laktose, cellulose, mannitol, trehalose, raffinose, maltitol, dekstran, stivelse, agar, alginater, chitiner, chitosaner, pektiner, trakantgummi, gummi arabikum, gelatin, kollagen, kasein, albumin, syntetiske eller halvsyntetiske polymerer og glycerid. Disse doseringsformene kan også inneholde andre typer tilsetningsstoffer, for eksempel et inaktivt fortynningsmiddel, et smøremiddel som magnesiumstearat, paraben, et konserveringsmiddel som sorbinsyre, askorbinsyre, alfa-tokoferol, en antioksidant som cystein, et diintegrasjonsmiddel, et bindemiddel, et tykningsmiddel, et bufringsmiddel, et søtemiddel, et smaksmiddel, en parfyme og så videre.

Tabletter og piller kan videre prosesseres til preparater med enteriske belegg. De flytende preparater for oral tilførsel omfatter emulsjoner, siruper, eliksirer, suspensjoner og løsninger som er tillatte for medisinsk bruk. Disse preparatene kan inneholde

inaktive fortynningsmidler som vanligvis anvendes innen feltet, for eksempel vann. Liposomer har også blitt beskrevet som medikamenttilførselssystemer for insulin og heparin (U.S. patentskrift nr. 4 239 754). Mer nylig har mikrokuler av kunstige polymerer av blandete aminosyrer (proteinoider) blitt anvendt for tilførsel av

5 farmasøytiske midler (U.S. patentskrift nr. 4 925 673). Videre er bærerforbindelsene som beskrives i U.S. patentskrift numrene 5 879 681 og 5 871 753, som anvendes for tilførsel av biologisk aktive midler oralt, kjente innen faget.

Mukosale preparater og mukosal tilførsel

- 10 For absorpsjon gjennom slimhinner omfatter sammensetninger og fremgangsmåter for tilførsel av ett eller flere anti-IL-12-antistoffer en emulsjon som omfatter et stort antall partikler av submikrometerstørrelse, et mukoadhesivt makromolekyl, et bioaktivt peptid og en vandig, kontinuerlig fase, som fremmer absorpsjon gjennom slimhinnene ved at det oppnås mukoadhesjon av emulsjonspartiklene (U.S. patentskrift nr. 5 514 670).
- 15 Slimhinne overflater som er egnete for tilførsel av emulsjonene kan omfatte korneal, konjunktival, buccal, sublingual, nasal, vaginal og pulmonar tilførsel, tilførsel via magen, intestinal tilførsel og rektal tilførsel. Preparater for vaginal eller rektal tilførsel, for eksempel stikkpiller, kan som eksipienser for eksempel inneholde polyalkylenglykoler, vaselin, kakaosmør og liknende. Preparater for intranasal tilførsel
- 20 kan være faste og som eksipienser for eksempel inneholde laktose, eller de kan være løsninger i vann eller olje, som nesedråper. For buccal tilførsel omfatter eksipiensene sukkere, kalsiumstearat, magnesiumstearat, stivelse som på forhånd er behandlet med gelatin og liknende (U.S. patentskrift nr. 5 849 695).

Transdermale preparater og transdermal tilførsel

- 25 For transdermal tilførsel innkapsles ett eller flere anti-IL-12-antistoffer i en tilførsels innretning, for eksempel liposomer eller polymere nanopartikler, mikropartikler, mikrokapsler eller mikrokuler (under ett betegnet mikropartikler dersom ikke annet er angitt). En rekke egnete innretninger er kjente, innbefattet mikropartikler, fremstilt av
- 30 syntetiske polymerer som polyhydroksysyrer, for eksempel polymelkesyre, polyglykolsyre og kopolymerer av disse, polyortoestere, polyanhydrider og polyfosfasener, og naturlige polymerer som kollagen, polyaminosyrer, albumin og andre proteiner, alginat og andre polysakkarider og kombinasjoner av disse (U.S. patentskrift nr. 5 814 599).

35

Forlenget tilførsel og preparater for forlenget tilførsel

Det kan noen ganger være ønskelig å tilføre forbindelsene ifølge foreliggende

oppfinnelse til pasienten over lengre tidsrom, for eksempel over tidsrom på fra en uke til ett år, som en enkelt tilførsel. Forskjellige doseringsformer for langsom frigivelse, deponering eller implantering kan benyttes. En doseringsform kan for eksempel inneholde et farmasøytisk aksepterbart, ikke-toksisk salt av forbindelsene som har lav

5 løselighetsgrad i kroppsvæsker, for eksempel (a) et syreaddisjonssalt med en polybasisk syre, for eksempel fosforsyre, svovelsyre, sitronsyre, vinsyre, tanninsyre, pamoinisyre, alginsyre, polyglutaminsyre, naftalen-mono- eller disulfonsyrer, polygalakturonsyre og liknende (b) et salt med et polyvalent metallkation, for eksempel sink, kalsium, bismut, barium, magnesium, aluminium, kobber, kobolt, nikkel, kadmium og liknende, eller

10 med et organisk kation dannet fra for eksempel N,N'-dibenzyl-etylendiamin eller etylendiamin; eller (c) kombinasjoner av (a) og (b), for eksempel et sinktannatsalt. I tillegg kan forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse, eller fortrinnsvis et relativt uløselig salt (for eksempel saltene som nettopp er beskrevet), utformes i en gel, for eksempel en aluminium monostearatgel med for eksempel sesamolje, egnet for

15 injeksjon. Spesielt foretrukne salter er sinksalter, sinktannatsalter, pamoatsalter og liknende. En annen type injiserbart deponeringspreparat for langsom frigivelse vil inneholde forbindelsen eller saltet dispergert for innkapsling i en langsomt, degraderbar, ikke-toksisk, ikke-antigen polymer, for eksempel en polymelkesyre/polyglykol-syrepolymer, for eksempel som beskrevet i U.S. patentskrift nr. 3 773 919.

20 Forbindelsene, eller fortrinnsvis relativt uløselige salter som dem beskrevet ovenfor, kan også utformes i silikongummipartikler med kolesterolmatriks, fortrinnsvis for anvendelse i dyr. Ytterligere preparater for langsom frigivelse, deponering eller implantering, for eksempel liposomer i gass- eller væskeform, er kjente fra litteraturen (U.S. patentskrift nr. 5 770 222 og "Sustained and Controlled Release Drug Delivery

25 Systems", J. R. Robinson, red., Marcel Dekker, Inc., N. Y., 1978).

Side 55 i originalen mangler her.

Vektoren pC4 anvendes for ekspresjon av IL-12-antistoff. Plasmid pC4 er et derivat av

30 plasmidet pSV2-dhfr (ATCC aksjesjonsnr. 37146). Plasmidet inneholder DHFR-genet fra mus under kontroll av den tidlige SV40-promoter. Kinahamster-ovarieceller eller andre celler som mangler dihydrofolataktivitet og som transfekteres med disse plasmider, kan selekteres ved å dyrke cellene i et selektivt medium (for eksempel alfa minus MEM, Life Technologies, Gaithersburg, MD) tilsatt det kjemoterapeutiske

35 middel metotrexat. Amplifisering av DHFR-gener i celler som er resistente overfor metotrexat (MTX) er godt dokumentert (se for eksempel F. W. Alt, et al., J. Biol. Chem. 253:1357-1370 (1978); J. L. Hamlin og C. Ma, Biochem. et Biophys. Acta 1097:107-

- 143 (1990); og M. J. Page og M. A. Sydenham, *Biotechnology* 9:64-68 (1991)). Celler dyrket i økende konsentrasjoner av MTX utvikler medikamentresistens ved overproduksjon av målenzymet, DHFR, som en følge av amplifisering av DHFR-genet. Dersom et annet gen er koblet til DHFR-genet, vil dette vanligvis amplifiseres sammen med DHFR-genet og overuttrykkes. Det er kjent innen faget at denne tilnærming kan benyttes for utvikling av cellelinjer som inneholder mer enn 1000 kopier av det eller de amplifiserte genene. Når metotrexat deretter fjernes, erholdes cellelinjer som inneholder det amplifiserte gen integrert i ett eller flere kromosomer i vertscellen.
- 10 For ekspresjon av genet av interesse inneholder plasmid pC4 den kraftige promoter fra den lange enderepetisjon (LTR) fra Rous Sarcomvirus (Cullen et al., *Molec. Cell. Biol.* 5:438-447 (1985)) pluss et fragment isolert fra enhanceren i det umiddelbart tidlige gen fra humant cytomegalovirus (CMV) (Boshart et al., *Cell* 41:521-530 (1985)). Nedstrøms for promoteren ligger kutteseter for restriksjonsenzymene BamHI, XbaI og Asp718, som tillater integrasjon av genene. Bak disse kloningssetene inneholder plasmidet 3'-intronet og polyadenyleringssetet fra preproinsulingenet hos rotte. Andre høyeffektive promotere kan også anvendes for ekspresjonen, for eksempel den humane beta-aktin promoteren, den tidlige eller sene promoter fra SV40 eller de lange enderepetisjonene fra andre retrovirus, for eksempel HIV og HTLV. Clontech's Tet-Off- og Tet-On-genekspresjonssystemer og tilsvarende systemer kan anvendes for ekspresjon av IL-12 på en regulert måte i pattedyrceller (M. Gossen og H. Bujard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551 (1992)). For polyadenylering av mRNA kan andre signaler, for eksempel fra det humane veksthormon eller globingener, også anvendes. Stabile cellelinjer som bærer et gen av interesse integrert i kromosomene, kan også selekteres ved kotransfeksjon med en seleksjonsmarkør, for eksempel gpt, G418 eller hygromycin. Det er en fordel å anvende mer enn en seleksjonsmarkør i begynnelsen, for eksempel G418 pluss metotrexat.

Plasmid pC4 kuttet med restriksjonsenzymer og det fosforyleres ved anvendelse av fosfatase fra kalvetarm ved fremgangsmåter som er kjente innen faget. Vektoren isoleres så fra en 1% agarosegel.

DNA-sekvensen som koder for det fullstendige IL-12-antistoff, anvendes for eksempel som beskrevet i SEKV. ID. numrene: sett in MAB AA SEQ ID 1 og sett inn MAB AA SEQ ID NO 2, som tilsvarer tungkjedens og lett kjedens variable område fra et IL-12-antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse, ifølge kjente fremgangsmåtettrinn. En isolert nukleinsyre som koder for et egnet humant, konstant område (for eksempel tungkjede-

og lettkjedeområder) anvendes også i denne konstruksjon (for eksempel som de foreligger i vektor p1351.

Det isolerte DNA som koder for variabelt og konstant område og den defosforylerte vektor ligeres så sammen med T4-DNA-ligase. E. coli HB101- eller XL-1 Blue-celler transformeres så, og det påvises bakterier som inneholder fragmentet innsatt i plasmid pC4 ved anvendelse av for eksempel restriksjonsenzymanalyse.

Kinamasterovarie (CHO)-celler som mangler et aktivt DHFR-gen, anvendes for transfeksjon. 5 µg av ekspresjonsplasmidet pC4 kotransfekteres med 0,5 µg av plasmid pSV2-neo ved anvendelse av lipofektin. Plasmid pSV2-neo inneholder en dominant seleksjonsmarkør, neo-genet fra Tn5, som koder for et enzym som gir resistens overfor en gruppe antibiotika som omfatter G418. Cellene utsåes i alfa minus-MEM tilsatt 1 µg/ml G418. Etter to dager trypsinbehandles cellene og utsåes i hybridomkloningsplater (Greiner, Tyskland) i alfa minus-MEM tilsatt 10, 25 eller 50 ng/ml metotrexat pluss 1 µg/ml G418. Etter tilnærmet 10-14 dager trypsinbehandles enkeltklonene og utsåes i 6-brønners petriskåler eller 10 ml flasker ved anvendelse av forskjellige konsentrasjoner av metotrexat (50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM). Klonene som vokser ved de høyeste metotrexatkonsentrasjonene, overføres så til nye 6-brønners plater inneholdende enda høyere metotrexatkonsentrasjoner (1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM). Den samme fremgangsmåte gjentas inntil det erholdes kloner som vokser i en konsentrasjon på 100-200 mM. Ekspresjonen av det ønskete genprodukt analyseres, for eksempel ved SDS-PAGE og Western-blotting eller ved revers fase-HPLC-analyse.

Eksempel 2: Frembringelse av humane, monoklonale IgG-antistoffer som reagerer med humant IL-12 med høy affinitet ved anvendelse av transgene mus

Oppsummering

Det har blitt benyttet transgene mus som inneholder humane tungkjede- og lettkjede immunglobuliner for dannelse av fullt ut humane, monoklonale antistoffer med høy affinitet, som kan anvendes terapeutisk for inhibering av virkningen av IL-12 for behandling av en eller flere IL-12-formidlete sykdommer. (CBA/J x C57/BL6/J) F₂-hybridmus som inneholder humane transgener for variabelt og konstant område for både tungkjede og lettkjede, immuniseres med humant rekombinant IL-12 (Taylor et al., Intl. Immunol. 6:579-591 (1993); Lonberg et al., Nature 368:856-859 (1994); Neuberger, M., Nature Biotech. 14:826 (1996); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14:845-851 (1996)). Flere fusjoner ga ett eller flere sett med fullt ut humane monoklonale IgG-

antistoffer som reagerer med humant IL-12. De fullt ut humane IL-12-antistoffene karakteriseres videre. Alle er IgG1. Slike antistoffer finnes å ha affinitetskonstanter i område mellom 1×10^9 og 9×10^{12} . Den uventet høye affinitet av disse fullt ut humane monoklonale antistoffene gjør dem til egnede kandidater for terapeutisk anvendelse ved

5 IL-12-forbundne sykdommer, sykdomstilstander eller forstyrrelser.

Forkortelser

- BSA - bovint serumalbumin
- CO₂ - karbondioksid
- 10 DMSO - dimetylsulfoksid
- EIA - enzymimmunanalyse
- FBS - føtalt bovint serum
- H₂O₂ - hydrogenperoksidase
- HRP - pepperrot-peroksidase
- 15 ID - interadermal
- Ig - immunglobulin
- IL-12 - interleukin-12
- IP - intraperitoneal
- IV - intravenøs
- 20 Mab - monoklonalt antistoff
- OD - optisk tetthet
- OPD - o-fenylendiamin-dihydroklorid
- PEG - polyetylen glykol
- PSA - penicillin, streptomycin, amphotericin
- 25 RT - romtemperatur
- SQ - subkutan
- vol/vol (v/v) - volum pr. volum
- vekt/vol (w/v) - vekt pr. volum

30 Materialer og fremgangsmåter

Dyr

- Transgene dyr som kan uttrykke humane antistoffer er kjente inne faget, og er kommersielt tilgjengelige, (for eksempel fra GenPharm International, San Jose, CA;
- 35 Abgenix, Freemont, CA., og andre) og uttrykker humane immunglobuliner, men ikke muse-IgM eller Ig. Slike transgene mus inneholder for eksempel transgener med human sekvens som gjennomgår *V(D)J*-kobling, tungkjedeklassebyting og somatisk mutasjon

slik at det dannes et repertoar av immunglobuliner med human sekvens (Lonberg et al., Nature 368:856-859 (1994)). Lettkjedetransgenet kan for eksempel være delvis avledet fra en klon i et kunstig gjærkromosom som omfatter nesten halvparten av det humane V-området i kimceller. I tillegg kan tungkjedetransgenet kode for både human μ og human λ (Fishwild et al., Nature Biotechnology 14:845-851 (1996)) og/eller tre konstante områder. Mus avledet fra egnete genotopiske linjer kan anvendes i immuniserings- og fusjonsfremgangsmåtene for frembringelse av fullt ut humane monoklonale antistoffer mot IL-12.

10 Immunisering

Ett eller flere immuniseringsskjemaer kan anvendes for frembringelse av humane anti-IL-12-hybridomer. De første fusjonene kan utføres ifølge den påfølgende eksemplariske immuniseringsfremgangsmåte, men andre tilsvarende kjente fremgangsmåter kan anvendes. Flere 14-20 uker gamle hunnmus og/eller kirurgisk kastrerte transgene hannmus immuniseres IP og/eller ID med 1-1000 μg rekombinant, humant IL-12, emulgert med et likt volum TITERMAX eller komplett Freund's adjuvans, i et sluttvolum på 100-400 μl (for eksempel 200). Hver mus kan i tillegg gis 1-10 μg i 100 μl fysiologisk saltvann i hvert av to subkutane seter. Musene kan så immuniseres 1-7, 5-12, 10-18, 17-25 og/eller 21-34 dager senere IP (1-400 μg) og SQ (1-400 μg x 2) med IL-12 emulgert med et likt volum TITERMAX eller ufullstendig Freund's adjuvans. Blod kan tappes 12-25 og 25-40 dager senere ved retroorbital punksjon uten antikoagulasjonsmiddel. Blodet får så koagulere ved romtemperatur i en time, og serum oppsamles og titreres ved anvendelse en IL-12 EIA-analyse ifølge kjente fremgangsmåter. Fusjoner utføres dersom gjentatte injeksjoner ikke gjør at titeret øker. På dette tidspunkt kan musene gis en avsluttende, intravenøs forsterkerinjeksjon med 1-400 μg IL-12 fortynnet i 100 μl fysiologisk saltvann. Tre dager senere kan musene avlives ved nakkeforskyvning, og milten tas ut aseptisk og neddyppes i 10 ml kaldt fosfatbufret saltvann (PBS) tilsatt 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin og 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ amfotericin B (PSA). Splenocytene høstes ved steril perfusjon av milten med PSA-PBS. Cellene vaskes en gang i kald PSA-PBS, telles ved anvendelse av Trypanblå-eksklusjon og resuspenderes i RPMI 1640-medium tilsatt 25 mM Hepes.

Cellefusjon

Fusjonen kan utføres ved et forhold på 1:1 til 1:10 mellom musemyelomceller og levedyktige miltceller ifølge kjente fremgangsmåter, for eksempel som kjent innen faget. Som et ikke-begrensende eksempel kan miltceller og myelomceller nedsentrifugeres sammen. De nedsentrifugerte cellene kan så langsomt resuspenderes

over et tidsrom på 30 sekunder i 1 ml 50% (vekt/vol) PEG/PBS-løsning (PEG med molekylvekt 1450, Sigma) ved 37 °C. Fusjonen kan så stanses ved langsom tilsetning av 10,5 ml RPMI 1640-medium tilsatt 25 mM Hepes (37 °C) over et tidsrom på 1 minutt. De fusjonerte cellene nedsentrifugeres i 5 minutter ved 500-1500 rpm. Cellene

5 resuspenderes så i HAT-medium (RPMI 1640-medium tilsatt 25 mM Hepes, 10% føtal kloner I serum (Hyclone), 1 mM natrium-pyruvat, 4 mM L-glutamin, 10 µg/ml gentamicin, 2,5% Origen dyrkingstilsetning (Fisher), 10% 653-kondisjonert RPMI 1640/Hepes-medium, 50 µM 2-merkaptoetanol. 100 µM hypoxantin, 0,4 µM aminopterin og 16 µM tymidin, og utsåes så med 200 µl/brønn i femten 96-brønners

10 vevdyrkingsplater med flat bunn. Platene plasseres så i en fuktgjort 37 °C-inkubator inneholdende 5% CO₂ og 95% luft i 7-10 dager.

Påvisning av humane anti-IL-12-IgG-antistoffer i museserum

EIA i fastfase kan anvendes for analyse av museserum for humane IgG-antistoffer som

15 er spesifikke for humant IL-12. Kort beskrevet kan plater belegges med IL-12 ved 2 µg/ml i PBS over natten. Etter vask med 0,15 M saltvann tilsatt 0,02% (vol/vol) Tween 20, kan brønnene blokkeres med 1% (vekt/vol) BSA i PBS, 200 µl/brønn i 1 time ved romtemperatur. Platene anvendes umiddelbart eller nedfryses ved -20 °C for fremtidig bruk. Fortynninger av museserum inkuberes på de IL-12-belagte platene med 50

20 µl/brønn ved romtemperatur i 1 time. Platene vaskes så og analyseres med 50 µl/brønn HRP-merket antihumant IgG, Fc-spesifikt antistoff fra geit, fortynnet 1:30000 i 1% BSA-PBS, i 1 time ved romtemperatur. Platene vaskes igjen og 100 µl/brønn av sitrat-fosfatsubstratløsning (0,1 M sitronsyre og 0,2 M natriumfosfat, 0,01% H₂O₂ og 1 mg/ml OPD) tilsettes i 15 minutter ved romtemperatur. Stoppløsning

25 (4N svovelsyre) tilsettes så med 25 µl/brønn, og optisk tetthet avleses ved 490 nm ved hjelp av et automatisk platespektrofotometer.

Påvisning av fullstendig humane immunglobuliner i hybridomsupernatanter

Vekstpositive hybridomer som utskiller fullt ut humane immunglobuliner, kan påvises

30 ved anvendelse av en egnet EIA. Kort beskrevet kan 96-brønners "pop-out"-plater belegges med 10 µg/ml anti-humant IgG Fc fra geit i natriumkarbonatbuffer over natten ved 4 °C. Platene vaskes og blokkeres med 1% BSA-PBS i 1 time ved 37 °C, og anvendes umiddelbart eller nedfryses ved -20 °C. Ufortynnete hybridomsupernatanter inkuberes på platene i 1 time ved 37 °C. Platene vaskes og analyseres med HRP-merket

35 anti-human kappa fra geit, fortynnet 1:10000 i 1% BSA-PBS, i 1 time ved 37 °C. Platene inkuberes så med substratløsning som beskrevet ovenfor.

Påvisning av reaktiviteten til fullt ut humant anti-IL-12

Hybridomer som ovenfor kan samtidig analyseres for reaktivitet overfor IL-12 ved anvendelse av en egnet RIA eller en annen analyse. For eksempel inkuberes supernatanter på plater belagt med anti-human IgG Fc fra geit, som ovenfor, vaskes og
 5 analyseres med radioaktivt merket IL-12 med en egnet mengde radioaktivitet pr. brønn i 1 time ved romtemperatur. Brønnene vaskes to ganger med PBS, og bundet radioaktivt merket IL-12 kvantifiseres ved anvendelse av en egnet teller.

Hybridomer som utskiller humant anti-IL-12-IgG1 kan ekspanderes i cellekultur og
 10 seriesubklones ved grensefortynning. De resulterende klonale populasjoner kan ekspanderes og frysekonserveres i frysemedium (95% FBS, 5% DMSO) og lagres i flytende nitrogen.

Isotypebestemmelse

15 Bestemmelse av antistoffenes isotype kan oppnås ved anvendelse av en EIA i et format som tilsvarer det anvendt for analyse av immunserum fra mus for spesifikke titere. IL-12 kan belegges på 96-brønners plater som beskrevet ovenfor, og rensset antistoff ved 2 µg/ml kan inkuberes på platen i 1 time ved romtemperatur. Platen vaskes og analyseres med HRP-merket anti-human IgG₁ fra geit eller HRP-merket anti-human IgG₃ fra geit,
 20 fortynnet 1:4000 i 1% BSA-PBS, i 1 time ved romtemperatur. Platen vaskes igjen og inkuberes med substratløsning som beskrevet ovenfor.

Bindingskinetikk for humane anti-humant IL-12-antistoffer med humant IL-12

Antistoffenes bindingsegenskaper kan anslås på egnet vis, for eksempel ved anvendelse
 25 av en IL-12-innfangings-EIA og BIAcore-teknologi. Varierende konsentrasjoner av rensset, humant IL-12-antistoff kan analyseres for binding til EIA-plater belagt med 2 µg/ml IL-12 i analyser som beskrevet ovenfor. Optisk tetthet kan så presenteres som halvlogaritmiske, grafiske fremstillinger som viser relativ bindingseffektivitet.

30 Kvantitative bindingskonstanter kan for eksempel erholdes som følger, eller ved enhver annen kjent, egnet fremgangsmåte. En BIAcore CM-5 (karboksymetyl)-brikke plasseres i en BIAcore 2000-enhet. HBS-buffer (0,01 M HEPES, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% v/v P20-detergent, pH 7,4) får strømme over en gjennomstrømningscelle på brikken med 5 µl/minutt inntil en stabil grunnlinje oppnås. En løsning (100 µl) av 15
 35 mg EDC (N-etyl-N'-(3-dimetyl-aminopropyl)-karbodiimid-hydroklorid) i 200 µl vann tilsettes til 100 µl av en løsning av 2,3 mg NHS (N-hydroksysuksinimid) i 200 µl. Førte (40) µl av den resulterende løsning injiseres på brikken. Seks µl av en løsning av

humant IL-12 (15 µg/ml i 10 mM natriumacetat, pH 4,8) injiseres på brikken, noe som fører til en økning på tilnærmet 500 RU. Bufferen endres til TBS/Ca./Mg/BSA-analysebuffer (20 mM Tris, 0,15 M natriumklorid, 2mM kalsiumklorid, 2 mM magnesiumacetat, 0,5% Triton X-100, 25 µg/ml BSA, pH 7,4) og får strømme over brikken over natten for ekvillibrering av denne og for hydrolyse eller blokkering av eventuelle ikke-reagerte suksinimidestere.

Antistoffer løses i analysebufferen ved 33,33, 16,67, 8,33 og 4,17 nM.

Gjennomstrømningshastigheten justeres til 30 µl/minutt og instrumenttemperaturen til 25 °C. To gjennomstrømningsceller anvendes for kinetikkanalysen, en i hvilken IL-12 er immobilisert (prøve) og en andre, ikke-derivatisert gjennomstrømningscelle (blindprøve). 120 µl av hver antistoffkonsentrasjon injiseres over gjennomstrømningscellene ved 30 µl/minutt (assosiasjonsfase), fulgt av 360 minutter med uavbrutt buffergjennomstrømning (dissosiasjonsfase). Brikkens overflate regenereres (interleukin-12/antistoffkompleks dissosieres) ved to på hverandre følgende injeksjoner, hver på 30 µl, av 2 M guanidintiocyanat.

Analysen av resultatene utføres ved anvendelse av BIA evaluering 3.0 eller CLAMP 2.0, som kjent inne faget. For hver antistoffkonsentrasjon subtraheres blindprøvesensogrammet fra prøvesensogrammet. En global tilpasning utføres for dissosiasjon (k_d , sek^{-1}) og assosiasjon (k_a , $\text{mol}^{-1} \text{sek}^{-1}$) og dissosiasjonskonstanten (k_D , mol) beregnes (k_d/k_a). Dersom antistoffets affinitet er tilstrekkelig høy til at RU for innfanget antistoff er >100, analyseres flere fortynninger av antistoffet.

Resultater og diskusjon

Dannelse av monoklonale anti-humant IL-12-antistoffer

Flere fusjoner utføres, og hver fusjon utsåes i 15 plater (1440 brønner/fusjon) som gir flere dusin antistoffer som er spesifikke for humant IL-12. Av disse finnes noen å bestå av en kombinasjon av humane IG-kjeder og IG-kjeder fra mus. De gjenværende hybridomer utskiller anti-IL-12-antistoffer som kun består av humane tungkjeder og lettkjeder. Av de humane hybridomene forventes alle å være IgG1.

Bindingskinetikk for humane anti-humant IL-12-antistoffer

ELISA-analyse bekrefter at rensset antistoff fra de fleste eller alle disse hybridomer binder IL-12 på en konsentrasjonsavhengig måte. Figurene 1-2 viser resultatene for disse antistoffenes relative bindingseffektivitet. I dette tilfellet måles antistoffets aviditet

for dets tilhørende antigen (epitop). Det bør bemerkes at binding av IL-12 direkte til EIA-platen kan føre til denaturering av proteinet, slik at de tilsynelatende bindingsaffiniteter ikke gjenspeiler binding til ikke-denaturert protein. Femti prosent binding finnes over et konsentrasjonsområde.

5

Kvantitative bindingskonstanter erholdes ved anvendelse av BIAcore-analyse av de humane antistoffer og viser at flere av de monoklonale, humane antistoffene har svært høy affinitet, med k_D i området fra 1×10^{-9} til 7×10^{-12} .

10 **Konklusjoner**

Flere fusjoner utføres ved benyttelse av splenocytter fra hybride mus som inneholder humane transgener for variabelt og konstant område, immunisert med humant IL-12. Et sett av flere fullstendig humane, IL-12-reaktive monoklonale IgG-antistoffer av isotype IgG1 dannes. De fullstendig humane anti-IL-12-antistoffer karakteriseres videre. Flere
15 av de frembrakte antistoffer har affinitetskonstanter mellom 1×10^9 og 9×10 . Den uventet høye affinitet av disse fullt ut humane monoklonale antistoffer gjør dem egnete for terapeutisk anvendelse ved IL-12-avhengige sykdommer, sykdomstilstander eller beslektete tilstander.

20 **Eksempel 3: C340 er et nøytraliserende humant monoklonalt antistoff**

Bioaktiviteten av IL-12 ble vist å nøytraliseres av C340 i en rekke IL-12-avhengige aktivitetsanalyser. Siden IL-12 fremmer IFN GAMMA-produksjon i NK-celler og T-lymfocytter, ble virkningen av C340-antistoff på oppregulering av IFN GAMMA-mRNA og virkningen av C340 på dannelsen av IFN GAMMA-protein undersøkt
25 (Trinchieri, G., Current Opinion in Immunology, 9:17-23 (1997), Morris, S. C., et al., Journal of Immunology, 152: 1047-1056 (1994)). Evnen til C340 til å nøytralisere IL-12-drevet induksjon av lymfokinaktivert drepercelleaktivert (LAK)-celle aktivitet, ble også undersøkt i disse studiene (Kutza, J. og Murasko, D. M., Mechanisms of Ageing and Development, 90:209-222 (1996), Stern, A. S., et al., Proceedings of the National
30 Academy of Sciences of the U.S.A., 87:6808-6812 (1990)). Til sist ble virkningen av C340 og IL-12-formidlet oppregulering av CD95-ekspresjon på overflaten av T-celler og NK-celler analysert (Medvedev, A. E. et al., Cytokine, 9:394-404 (1997)).

Inhibering av transkripsjon av IFN gamma-mRNA

35 For å fastslå hvorvidt C340 inhiberer IL-12 pluss IL-2-indusert IFN GAMMA-gentranskripsjon i humane PBL, ble en revers transkripsjon-PCR-analyse utført. Spesifikke primere for β -aktin (en kontroll av mRNA-integritet og innhold) og IFN

GAMMA ble anvendt for amplifisering av cDNA erholdt fra stimulerde, humane PBL. Figur 3 viser at C340 nedregulerer IFN GAMMA-mRNA i IL-12/IL-2-aktiverte (2 timer) PBMC.

5 **Inhibering av ultracellulært IFN GAMMA, målt ved "flow"-cytometri**

Som en respons på forskjellige signaler og som mål på aktivering, kan T-celler og NK-celler induseres til å utskille cytokiner. Nærmere bestemt starter PBL behandlet med IL-2 og IL-12 en omfattende syntese av IFN GAMMA i løpet av 4-8 timer etter stimuleringen. Denne produksjonen kan påvises i cytoplasma hos Brefeldin-A-behandlede PBL ved "flow"-cytometri. Figur 4 viser en 60% reduksjon av IFN GAMMA-produksjonen i slike kulturer ved tilsetning av C340 sammen med IL-12 i 5 timer.

Inhibering av IL-12-indusert utskillelse av IFN GAMMA

15 Figur 5 viser tydelig at to forskjellige produksjoner av C340 inhiberte utskilling av IFN GAMMA fra lymfocytter fra perifert blod på en doseavhengig måte. 400 picogram IL-12 ble blandet med forskjellige mengder C340 og så tilsatt til IL-2-stimulerte kulturer av PBL. Når IFN GAMMA ble målt ved EIA etter 18-24 timers inkubering, ble markant reduserte mengder IFN GAMMA påvist med så lite som 1 µg/ml antistoff C340.

20

Inhibering av IL-12-indusert LAK-cellecytotoksitet

Raji-celler, en IL-12-sensitiv cellelinje avledet fra Burkitts lymfom, er en NK-celleresistent, LAK-cellesensitiv cellelinje. Raji-celler ble dyrket i triplikat i 4 timer med LAK-celler som var aktivert med 400 pg/ml IL-12 og 10 U/ml IL-2 i nærvær eller
25 fravær av det humane, monoklonale antistoff C340 (5000 ng/ml eller 50ng/ml). figur 6 viser resultatene fra tre normale, friske donorer. IL-12 + IL-2-aktivering av effektorcellene førte til øket cytotoxisk aktivitet, sammenliknet med celler aktivert med IL-2 alene. Antistoff C340 inhiberte denne IL-12-avhengige virkning. Inhibisjonens omfang var forbundet med antistoffkonsentrasjonen, hvor den høyeste analyserte
30 konsentrasjon reduserte cytotoxisiteten til bakgrunnsnivå.

Inhibering av CD95 oppregulering

Rapporter har beskrevet IL-12-indusert oppregulering av CD95 på overflaten av svært rene CD56⁺ PBL. Som det kan sees av figur 7A og 7B, viste en "flow"-cytometrisk
35 analyse av fordelingen at CD95-ekspresjonen var signifikant oppregulert på CD3⁺ T-celler og CD56⁺ NK-celler etter behandling med IL-12 pluss IL-2 i 72 timer. Samtidig behandling med anti-IL-12-antistoff inhiberte CD95-ekspresjonen både i CD3⁺ - og

CD56⁺-populasjoner. CD3⁺-celler ble inhibert med ~50% (figur 7A), mens CD56⁺-celler ble inhibert med ~85% (figur 7B), som vist ved en redusert MFI-indeks (prosent høyere enn ikke-stimulert kontroll).

5 **Eksempel 4: Genkloning og -karakterisering**

Genomiske DNA-fragmenter som inneholder enten C340-tungkjedegenet eller C340-lettkjedegenet, ble klonet og renset. Genomisk DNA renset fra C340- hybridomceller ble partielt kuttet med restriksjonsenzymet Sau3A og størrelsesselektet ved fraksjonering ved sentrifugering gjennom en 10-40% sukrosegradient. DNA-fragmenter i størrelsesområdet 215-23 kb ble klonet inn i bakteriofagvektoren EMBL3, [kommersielt tilgjengelig?] og pakket i bakteriofagpartikler. Flere pakkereaksjoner førte til et bibliotek på 1 million bakteriofagkloner. Tilnærmet 600000 kloner fra biblioteket ble analysert ved plakkhybridisering og anvendelse av ³²P-merkete genomiske DNA-fragmenter som inneholdt enten sekvenser for konstant område fra tungkjeden i humant IgG1 eller sekvenser for konstant område fra human kappa-lettkjede som probe. 13 tungkjedekloner og 9 lettkjedekloner ble påvist. Av disse ble 3 tungkjedekloner og 4 lettkjedekloner renset ytterligere to runder med analyse. En av tungkjedeklonene og to av lettkjedeklonene ble vist å inneholde den 5' og 3' ende for de kodende sekvenser ved PCR-analyse av bakteriofag-DNA. DNA-innskuddet i tungkjede (HC)-klon H4 var på 16 kb og omfattet 3,6 kb 5'-flankerende og minst 2 kb 3'-flankerende sekvens. DNA-innskuddet i lettkjede (LC)-klon LC1 var på 15 kb og omfattet 4,4 kb 5'-flankerende og 6,0 kb 3'-flankerende sekvens. De fullstendige innskudd ble fjernet fra bakteriofagvektoren som Sall-fragmenter og klonet mellom XhoI-setet og Sall-setet i plasmidekspresjonsvektoren p1351, som tilførte et gpt-seleksjonsmarkørgen. Siden det forelå et internt Sall-sete i sekvensen som kodet for tungkjedens variable område, måtte to Sall-fragmenter overføres fra bakteriofag H4 til ekspresjonsvektor p1351. De resulterende tungkjede- og lettkjede-ekspresjonsplasmider ble betegnet henholdsvis p1560 og p1558. Orienteringen av tungkjedegenet og lettkjedegenet i disse to plasmider relativt til p1351-vektorsekvensen, ble bestemt ved anvendelse av restriksjonsenzymanalyse, henholdsvis PCR. I begge tilfeller var orienteringen slik at Ab-genfragmentets 5' ende lå proksimalt til gpt-genets 3' ende. Begge tråder av det kodende område i de klonete gener ble sekvensert. Sekvensen til plasmid p1560 og plasmid p1558 gis i figurene 11A-11K, henholdsvis 13A-13J.

35 **Eksempel 5: Fremstilling av rekombinante cellelinjer**

Tungkjede plasmid p1560 ble linearisert ved kutting med restriksjonsenzymet PvuI, og lettkjedeplasmidet p1558 ble linearisert ved anvendelse av restriksjonsenzymet Sall.

p3X63Ag8.653 (653)- og Sp2/0-Ag14 (Sp2/0)-celler ble hver for seg transfektert med de sammenblandete lineariserte plasmider ved elektroporering, og celler ble dyrket og transfektanter selektert ved anvendelse av mykofenolsyre som beskrevet (Knight et al., Molecular Immunology 30:1443 (1993)). Cellesupernatanter fra

5 mykofenolsyreresistente kolonier ble analysert tilnærmet to uker senere for humant IgG (dvs. rekombinant C340 (rC340)). For dette ble cellesupernatantene inkubert på 96-brønners ELISA-plater som var belagt med geiteantistoffer, spesifikke for Fc-delen av humant IgG. Humant IgG som ble bundet til den belagte plate, ble påvist ved

10 anvendelse av anti-humant IgG (tungkjede + lettkjede)-antistoff fra geit, konjugert til alkalisk fosfatase og substrater for alkalisk fosfatase som beskrevet (Knight et al., Molecular Immunology 30:1443 (1993)). Celler fra klonene med høyest produksjon ble overført til 24-brønners dyrkingsskåler i standard medium og ekspandert (IMDM, 5% FBS, 2 mM glutamin, mykofenolsyreseleksjonsblanding). Mengden dannet antistoff

15 (dvs. utskilt i mediet hos ferdige kulturer), ble grundig kvantifisert ved ELISA og anvendelse av rensset C340 mAb som standard. Utvalgte kloner ble så ekspandert i T75-flasker, og dannelsen av humant IgG fra disse klonene ble kvantifisert ved ELISA. Basert på disse verdier ble seks uavhengige 653-transfektanter og tre uavhengige SP2/0-transfektanter subklonet (ved utsåing av gjennomsnittlig 1 celle/brønn i 96-brønners plater), og mengden antistoff dannet fra subklonene ble bestemt ved å analysere

20 (ELISA) supernatanter fra de enkelte subklonkoloniene. Tre subkloner, 653-transfektant 19-20 (C379B) og SP2/0-transfektantene 84-81 (C381A og 22-56 (C389A), ble utvalgt for videre analyse.

Analyse av rC340-antigenbinding

25 Før subkloning av utvalgte cellelinjer som beskrevet ovenfor, ble cellesupernatanter fra tre utgangslinjer (653-transfektantene klon 2 og klon 18 og SP2/0-transfektant klon 1) anvendt for analyse av de antigenbindende egenskaper til rC340. Konsentrasjonen av rC340 i de tre supernatantprøvene ble først bestemt ved ELISA. Titreringsmengder av supernatantprøvene eller rensset C340 som positiv kontroll ble så inkubert i 96-brønners

30 plater belagt med 2 µg/ml humant IL-12. Bundet mAb ble påvist med alkalisk fosfatasekonjugert anti-humant IgG (tungkjede + lettkjede)-antistoff fra geit og egnete substrater for alkalisk fosfatase. Som vist i figur 8 ble rC340 spesifikt bundet til humant IL-12 på en måte som ikke kunne skilles fra binding av det opprinnelige C340 mAb.

Karakterisering av utvalgte cellelinjer

35 Vekstkurveanalyser ble utført på C379B, C381A og C389A ved å innokkulere T75-flasker med en utgangscelletetthet på 2×10^5 celler/ml i standard medium eller SFM-5

serumfritt medium, og så måle celletall og rC340-konsentrasjon daglig inntil kulturene var ferdig utvokste. Resultatene fra kulturer i standard medium er vist i figurene 9A-9C. Det maksimale produksjonsnivå av C379B, C381A og C389A var 135 µg/ml, 150 µg/ml, henholdsvis 110 µg/ml. Forsøk på å tilpasse C379b-celler til SFM-5-medium var ikke vellykkete. C381A-celler dannet samme mengde rC340 i SFM-5-medium som i standard medium, mens C389A-celler kun dannet halvparten så mye rC340 i SFM-5-medium som i standard medium.

Stabiliteten av rC340 mAb-produksjonen over tid for de tre subklonene, ble anslått ved å dyrke celler i 24-brønners plater med standard medium eller standard medium uten mykofenolsyreseleksjon i varierende tidsrom. Cellelinjene C379B og C381A ble observert å stabilt danne rC340 i nærvær eller fravær av seleksjon over et tidsrom på 30 dager (den maksimale tid som ble analysert) henholdsvis 75 dager. Cellelinje C389A var ustabil og dannet etter 43 dager i kultur kun 20% av antistoffmengden som ble dannet ved undersøkelsens begynnelse.

Det vil være klart at oppfinnelsen kan utføres på annen måte enn hva som er beskrevet i den foregående beskrivelse og eksemplene.

En rekke modifikasjoner og varianter av foreliggende oppfinnelse er mulige i lys av beskrivelsen ovenfor, og ligger derfor innenfor omfanget av de vedlagte krav.

P a t e n t k r a v

1.
Nukleinsyre som koder for minst ett mammalsk anti-IL-12 antistoff med et tungkjede-variabelt område som omfatter SEQ ID NO:7 og ett lettkjede-variabelt område som omfatter SEQ ID NO:8.
2.
Prokaryotisk eller eukaryotisk vertscelle, omfattende nukleinsyren ifølge krav 1.
3.
Mammalsk anti-IL-12 antistoff, omfattende et tungkjede-variabelt område som omfatter SEQ ID NO:7 og et lettkjede-variabelt område som omfatter SEQ ID NO:8.
4.
Nukleinsyre ifølge krav 1, vertscelle ifølge krav 2 eller antistoff ifølge krav 3, hvor antistoffet er humant.
5.
Nukleinsyre ifølge krav 1, vertscelle ifølge krav 2 eller antistoff ifølge krav 3 eller krav 4, hvorved antistoffet har en affinitetskonstant mellom 1×10^9 og 7×10^{12} .
6.
Sammensetning, omfattende (a) et antistoff ifølge ett av kravene 3-5 og (b) en farmasøytisk akseptabel bærer eller et fortynningsmiddel.
7.
Antistoff ifølge et av kravene 3-5 eller sammensetning ifølge krav 6, for anvendelse ved diagnose eller behandling.
8.
Antistoff ifølge et av kravene 3-5 eller sammensetning ifølge krav 6, for anvendelse ved behandling av psoriasis.
9.
Antistoff ifølge et av kravene 3-5 eller sammensetning ifølge krav 6, for anvendelse ved behandling av psoriatisk artritt, sarkidose eller morbus Crohn patologi.

CEN 248

1

SEQUENCE LISTING

<110> Shealy, David, Knight, David, Scallon, Bernie; Giles-Komar, Jill; Peritt, David

<120> IL-12 ANTIBODIES, COMPOSITIONS, METHODS AND USES

<130> CEN248

<160> 15

<170> PatentIn Ver 2.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Thr Tyr Trp Leu Gly
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ile Met Ser Pro Val Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Pro Arg Pro Gly Gln Gly Tyr Phe Asp Phe
1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

CEN 248

2

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6

Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 7
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 7

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

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

Trp Leu Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Met Ser Pro Val Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

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

Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Arg Pro Gly Gln Gly Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8

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 Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

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

CEN 248

3

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 Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 9

<211> 503

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu
1 5 10 15

His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln Lys
20 25 30

Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile Asp
35 40 45

His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys Leu
50 55 60

Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr
65 70 75 80

Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe
85 90 95

Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr
100 105 110

Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys
115 120 125

Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu
130 135 140

Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser Ser
145 150 155 160

Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile Leu
165 170 175

Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met Ser
180 185 190

Tyr Leu Asn Ala Ser Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val Val
195 200 205

Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu Thr
210 215 220

Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln Ser
225 230 235 240

CEN 248

4

245								250				255			
Phe	Gly	Asp	Ala	Gly	Gln	Tyr	Thr	Cys	His	Lys	Gly	Gly	Glu	Val	Leu
			250				265						270		
Ser	His	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	His	Lys	Lys	Glu	Asp	Gly	Ile	Trp	Ser
			275				280						285		
Thr	Asp	Ile	Leu	Lys	Asp	Gln	Lys	Glu	Pro	Lys	Asn	Lys	Thr	Phe	Leu
			290				295						300		
Arg	Cys	Glu	Ala	Lys	Asn	Tyr	Ser	Gly	Arg	Phe	Thr	Cys	Trp	Trp	Leu
			305							315			320		
Thr	Thr	Ile	Ser	Thr	Asp	Leu	Thr	Phe	Ser	Val	Lys	Ser	Ser	Arg	Gly
				325				330						335	
Ser	Ser	Asp	Pro	Gln	Gly	Val	Thr	Cys	Gly	Ala	Ala	Thr	Leu	Ser	Ala
			340				345						350		
Glu	Arg	Val	Arg	Gly	Asp	Asn	Lys	Glu	Tyr	Glu	Tyr	Ser	Val	Glu	Cys
			355				360						365		
Gln	Glu	Asp	Ser	Ala	Cys	Pro	Ala	Ala	Glu	Glu	Ser	Leu	Pro	Ile	Glu
			370				375						380		
Val	Met	Val	Asp	Ala	Val	His	Lys	Leu	Lys	Tyr	Glu	Asn	Tyr	Thr	Ser
			385				390						395		
Ser	Phe	Phe	Ile	Arg	Asp	Ile	Ile	Lys	Pro	Asp	Pro	Pro	Lys	Asn	Leu
			405				410						415		
Gln	Leu	Lys	Pro	Leu	Lys	Asn	Ser	Arg	Gln	Val	Glu	Val	Ser	Trp	Glu
			420				425						430		
Tyr	Pro	Asp	Thr	Trp	Ser	Thr	Pro	His	Ser	Tyr	Phe	Ser	Leu	Thr	Phe
			435				440						445		
Cys	Val	Gln	Val	Gln	Gly	Lys	Ser	Lys	Arg	Glu	Lys	Lys	Asp	Arg	Val
			450				455						460		
Phe	Thr	Asp	Lys	Thr	Ser	Ala	Thr	Val	Ile	Cys	Arg	Lys	Asn	Ala	Ser
			465				470						475		
Ile	Ser	Val	Arg	Ala	Gln	Asp	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Ser	Trp	Ser	Glu
			485				490						495		
Trp	Ala	Ser	Val	Pro	Cys	Ser									
			500												

<210> 10
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 10
agataata tgcac

15

$\langle 210 \rangle$	11
$\langle 211 \rangle$	51
$\langle 212 \rangle$	DNA

CEN 248

5

<213> Homo sapiens
 <400> 11
 gttatatcat ttgatggaag caataaatac tacgtagact cegtgaaggg c 51

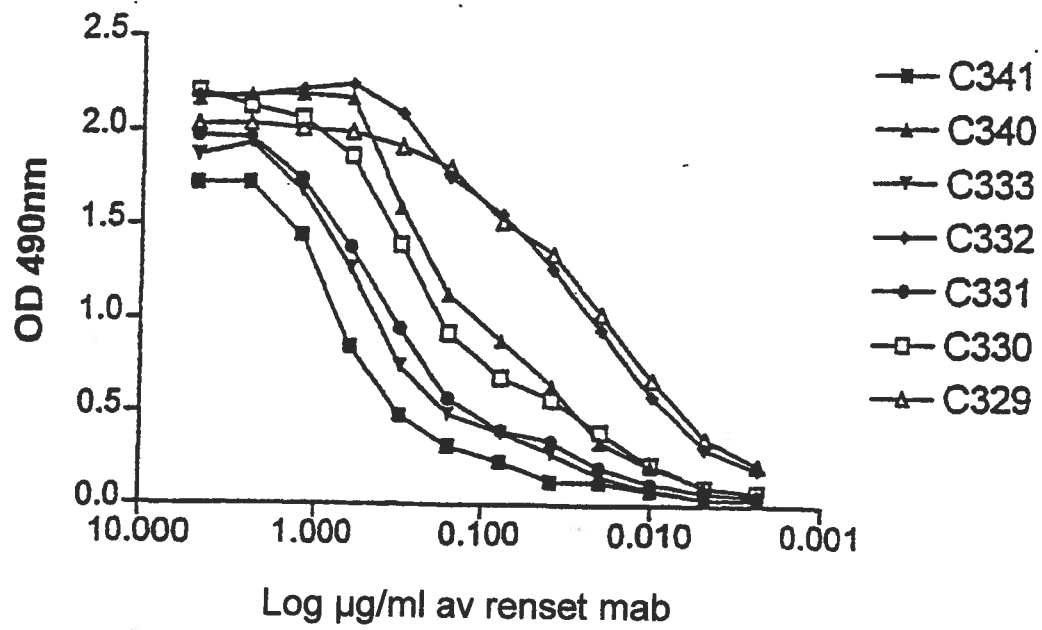
<210> 12
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 gaggcccggg gatcgtatgc tttgatatc 30

<210> 13
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cc 33

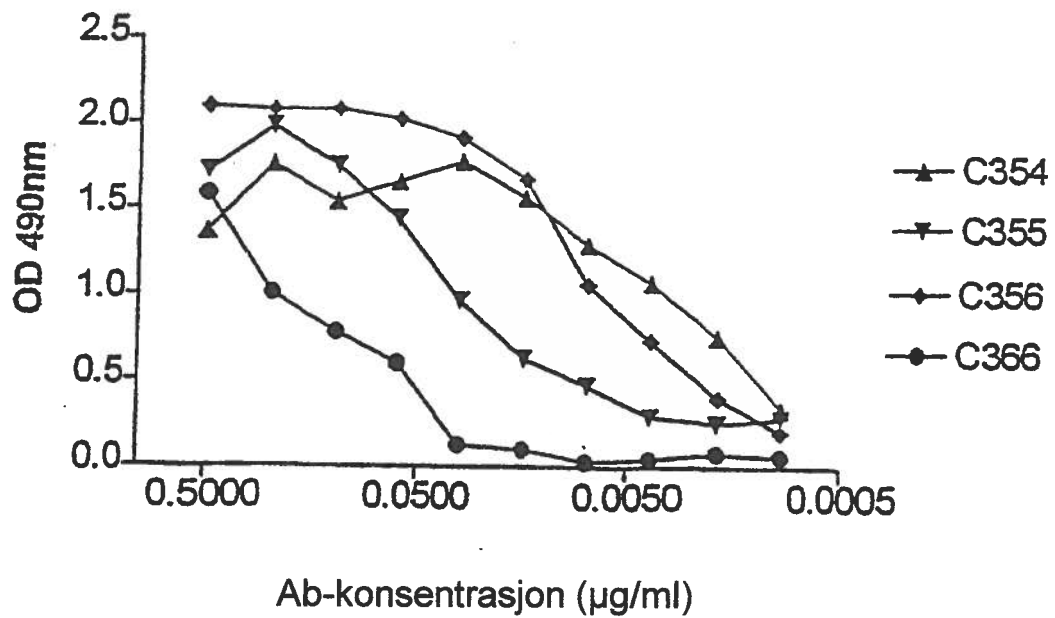
<210> 14
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 gatgcatcca acagggcc 18

<210> 15
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 cagcagcgta gcaactggcc t 21

1/10

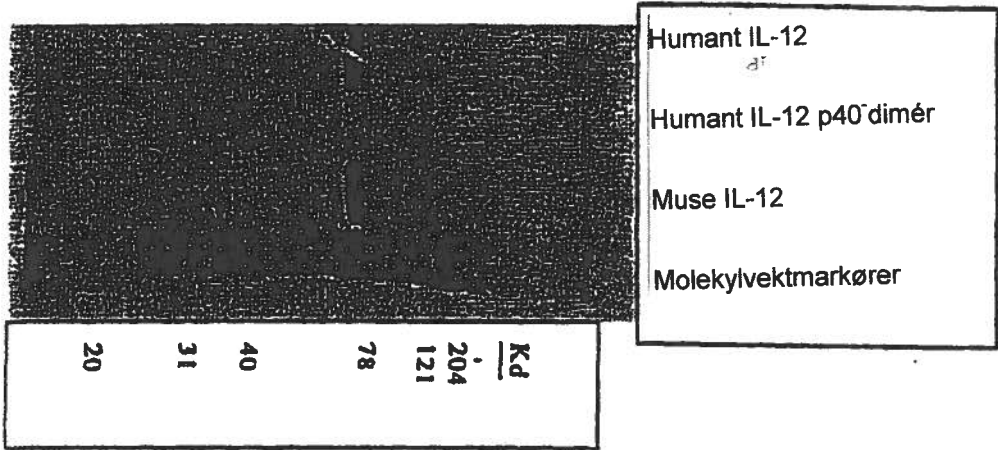


FIGUR 1A

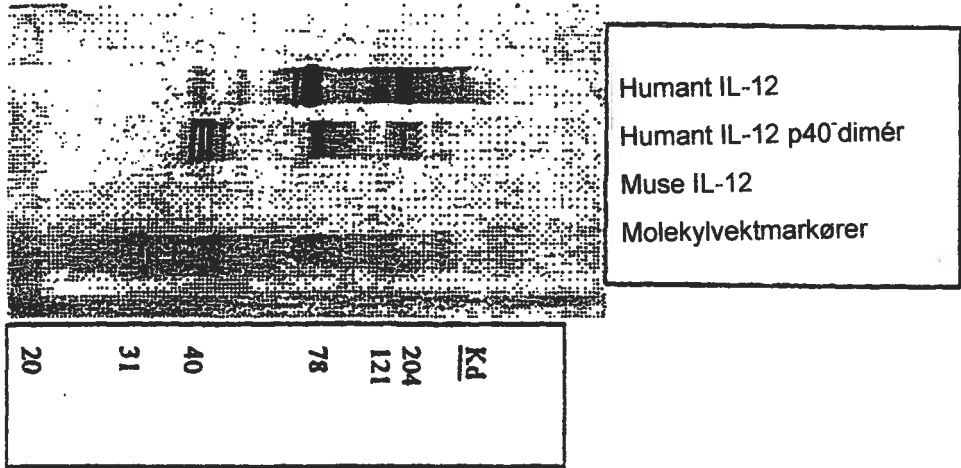


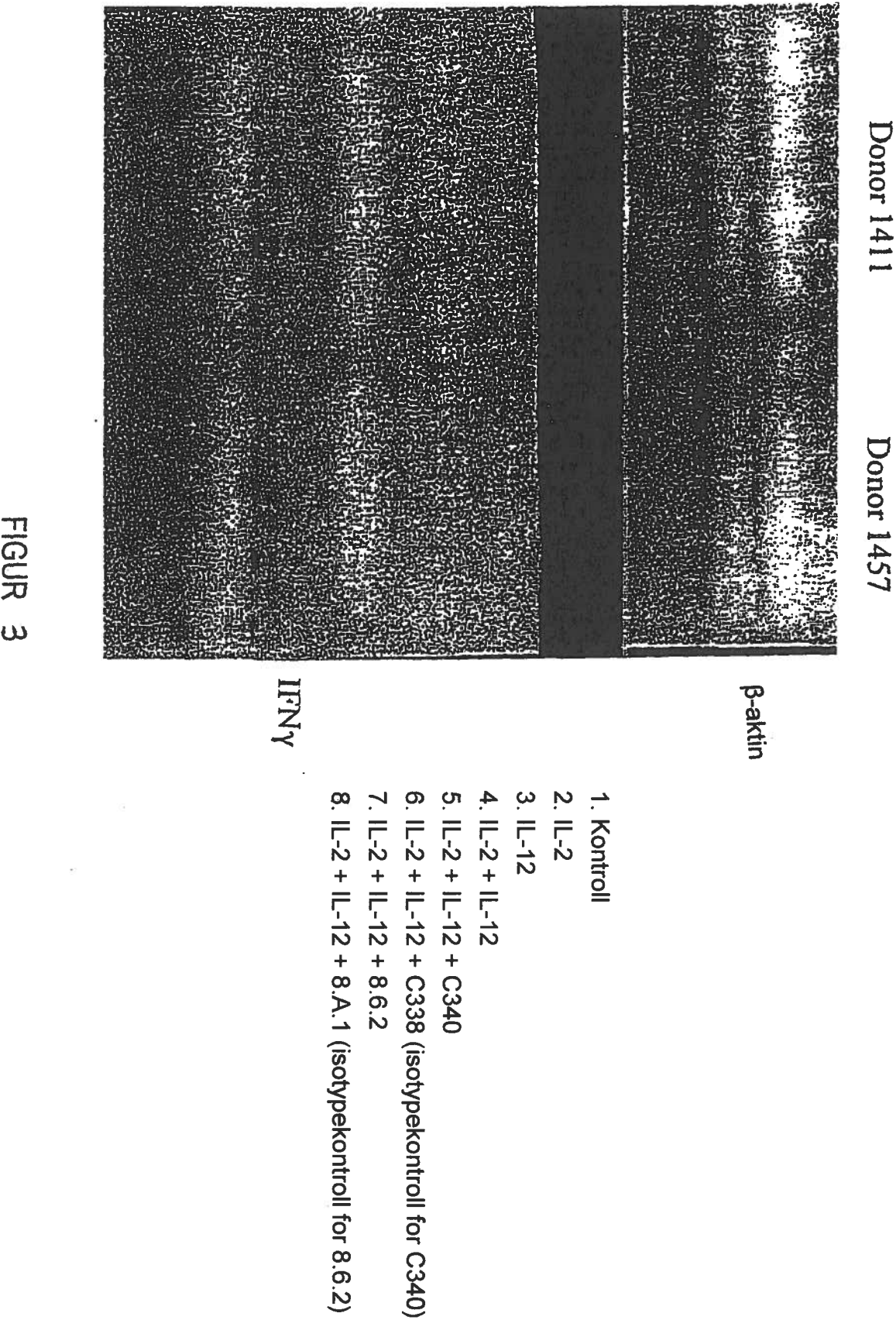
FIGUR 1B

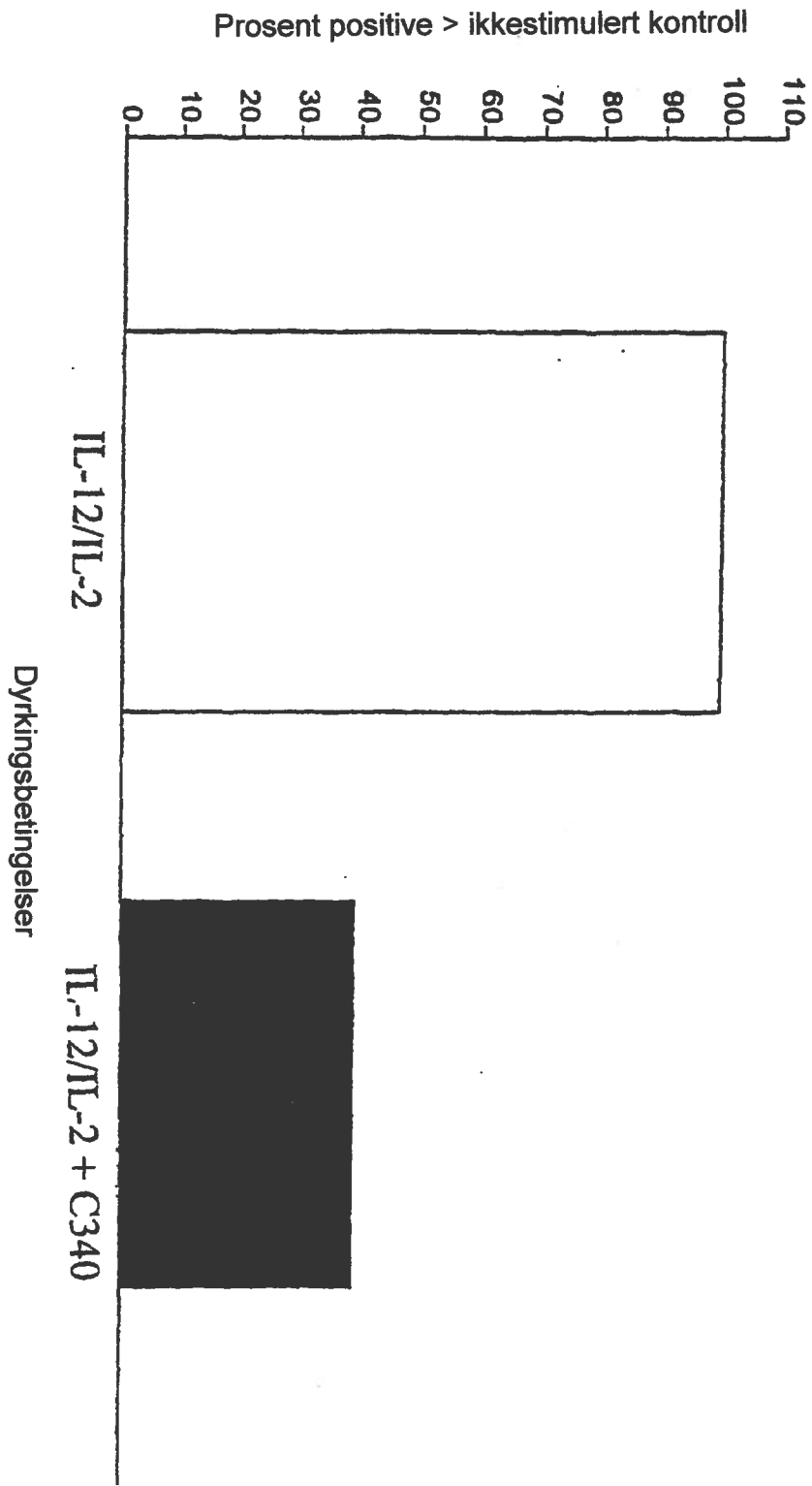
FIGUR 2A.



FIGUR 2B

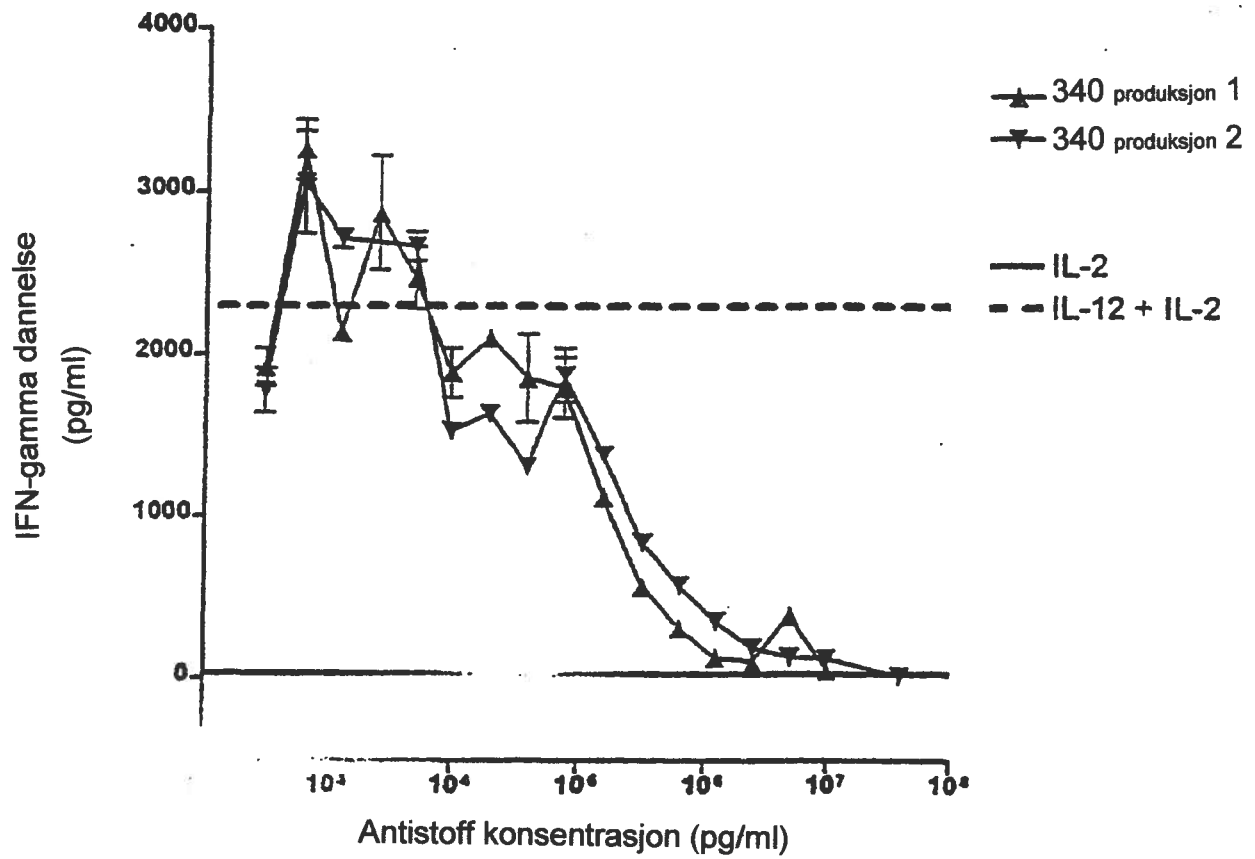






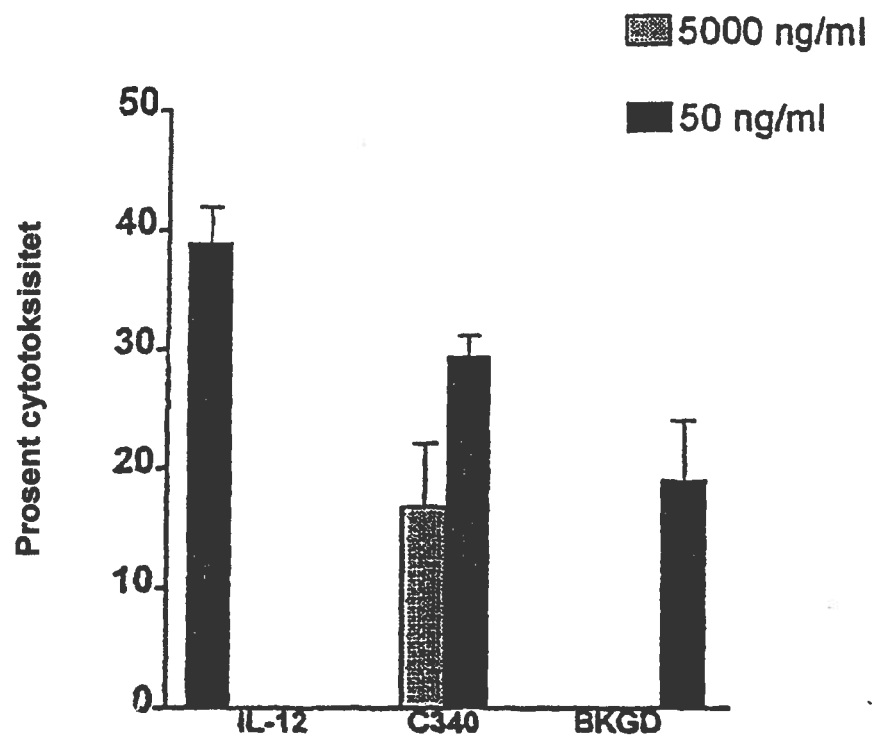
FIGUR 4

5/10



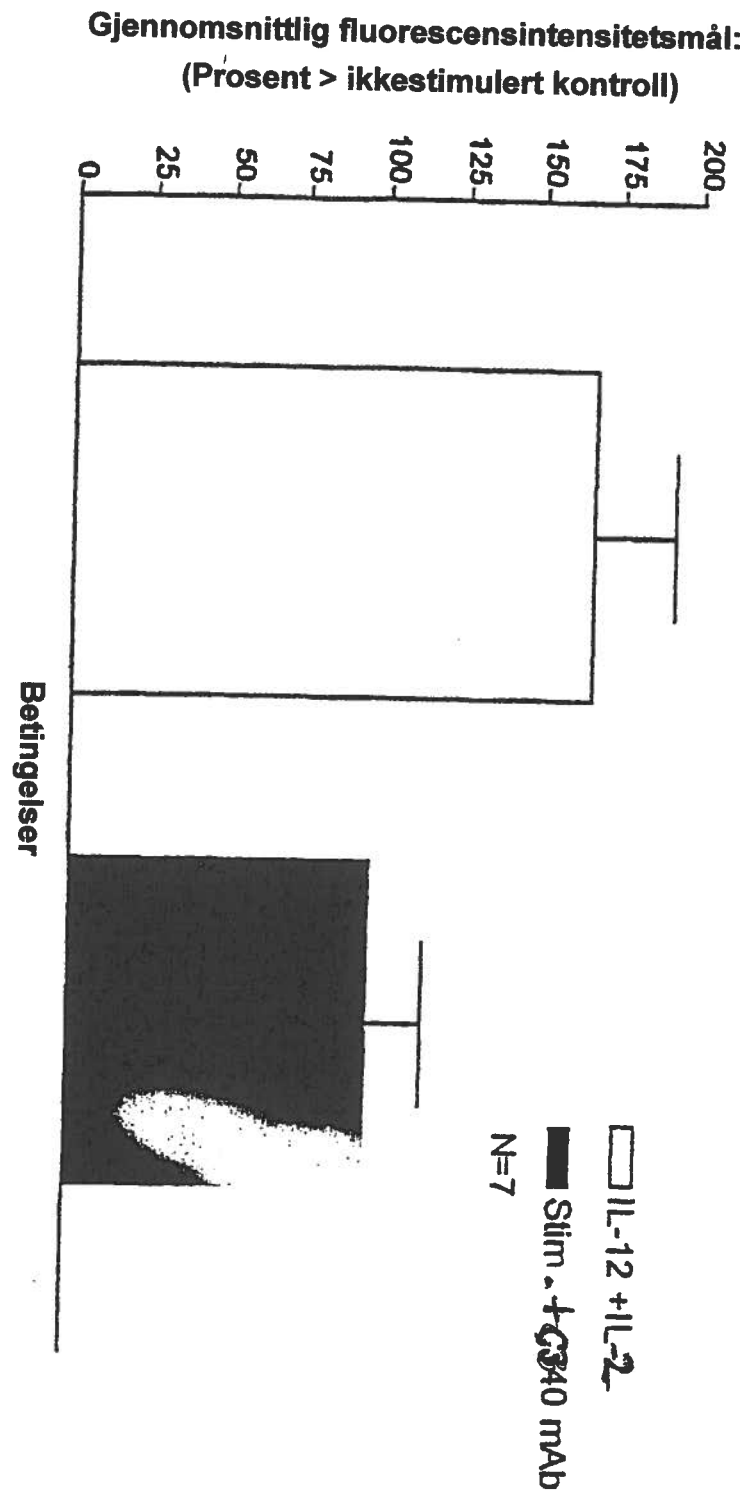
FIGUR 5

6/10



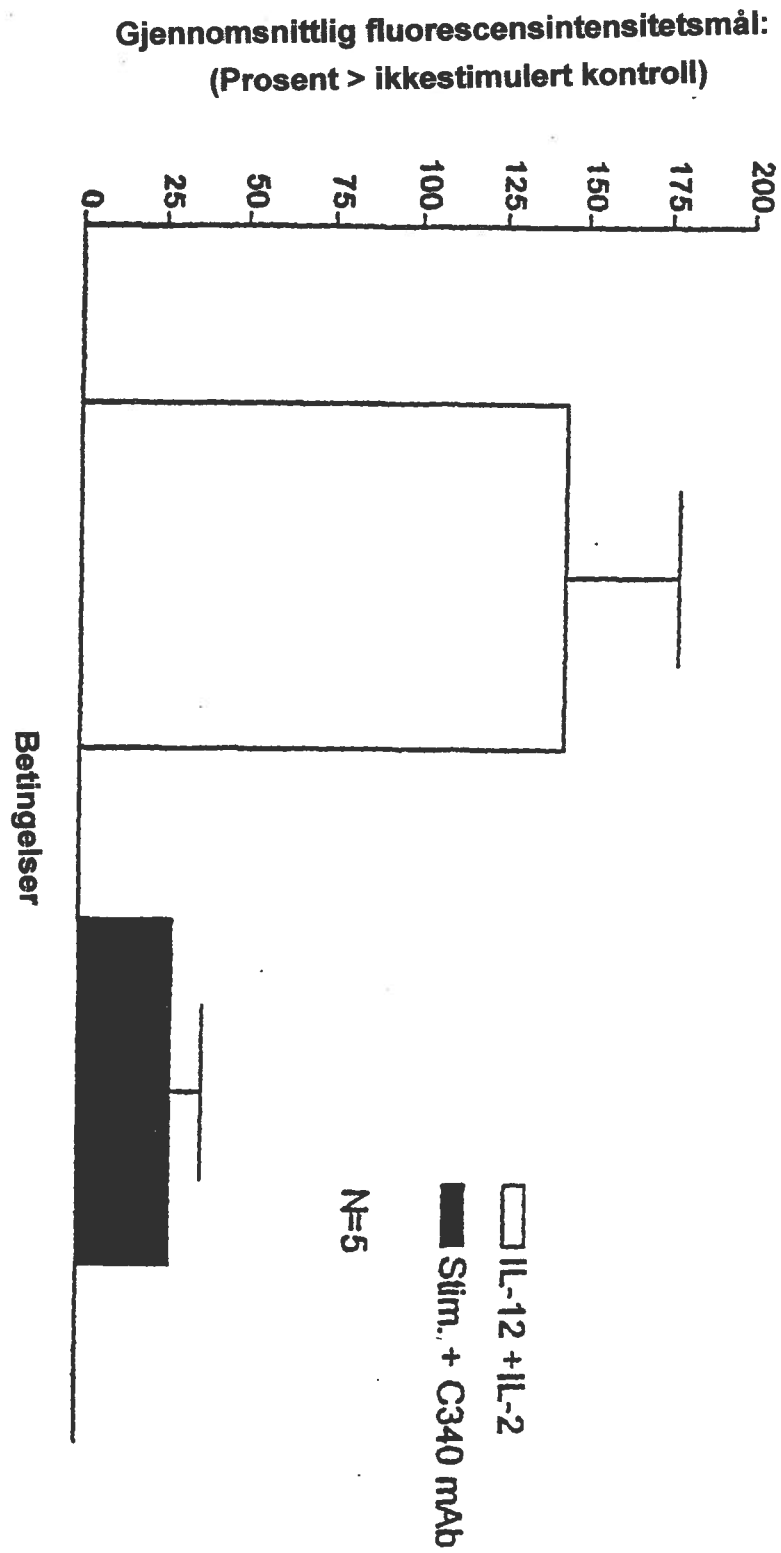
FIGUR 6

7/10

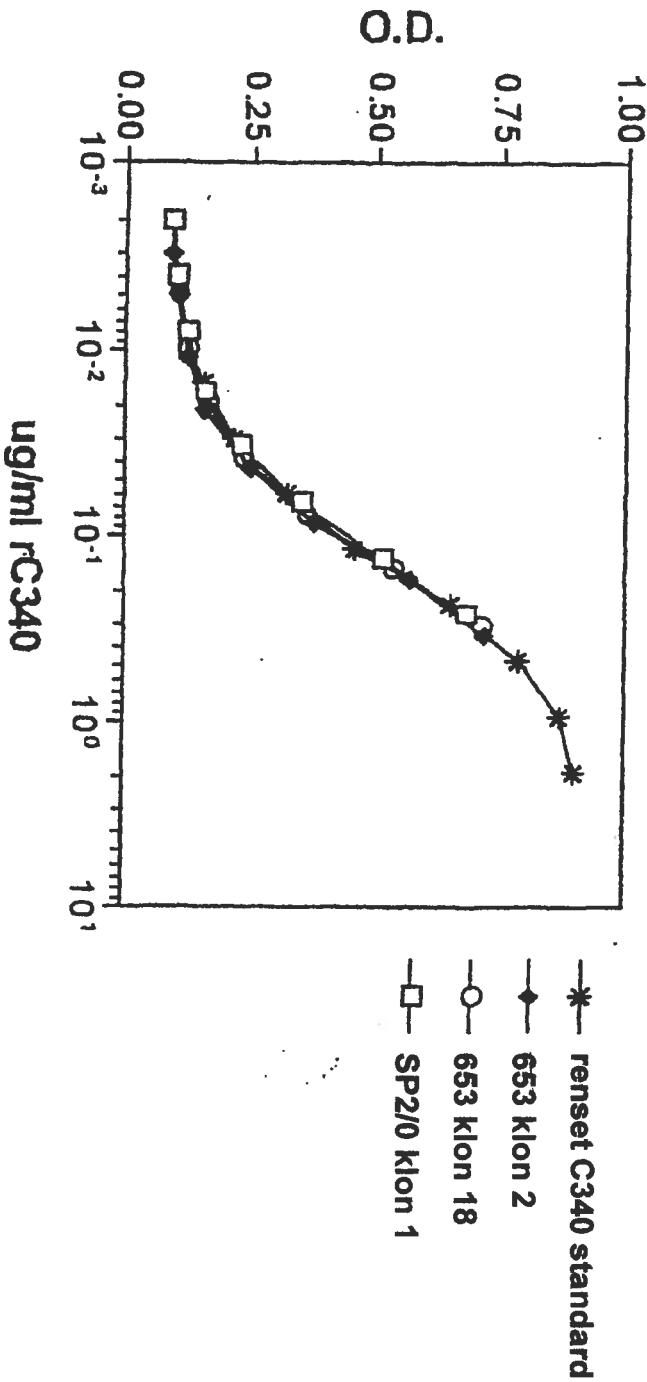


FIGUR 7A

8/10

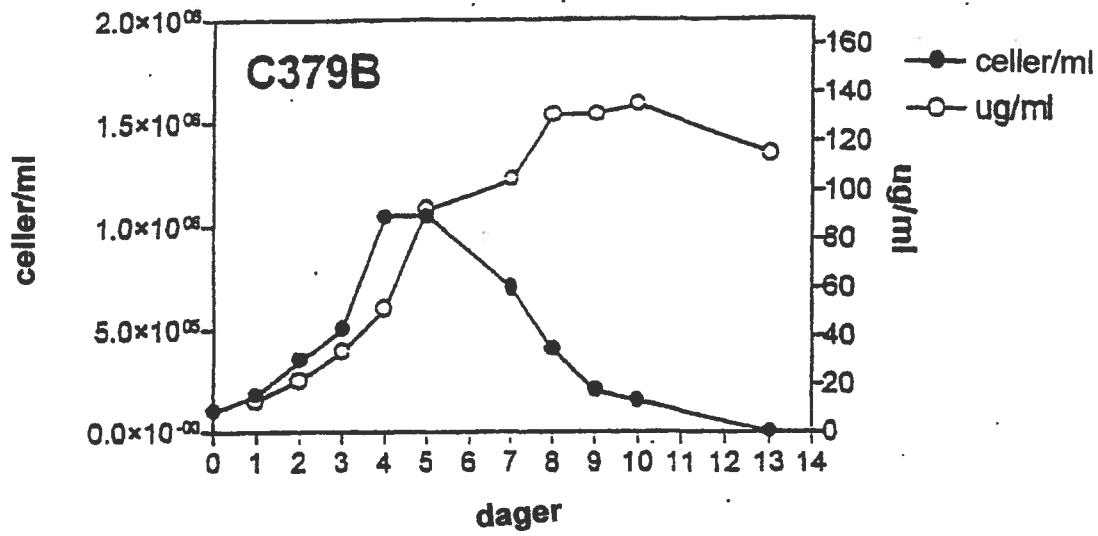


FIGUR 7B

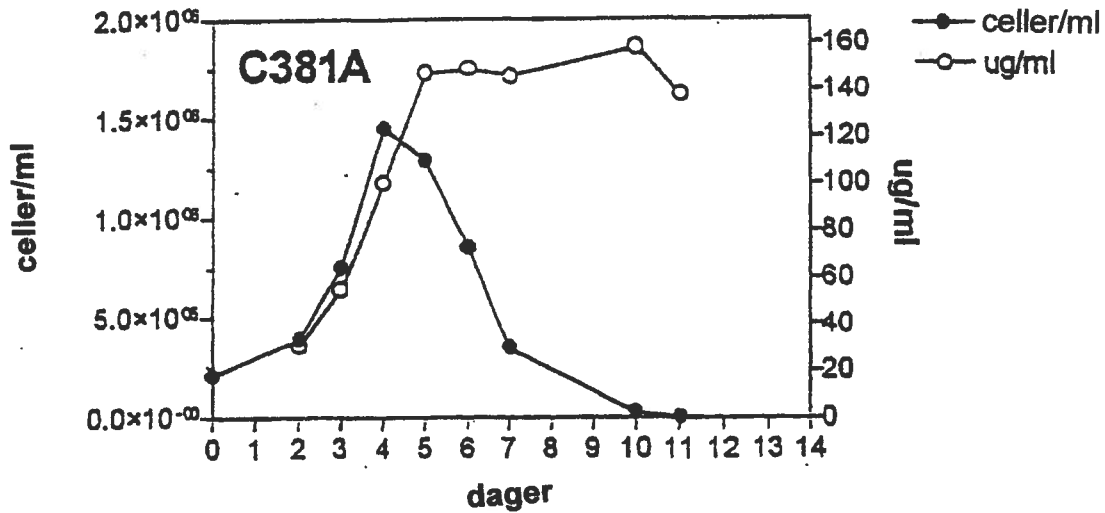


FIGUR 8

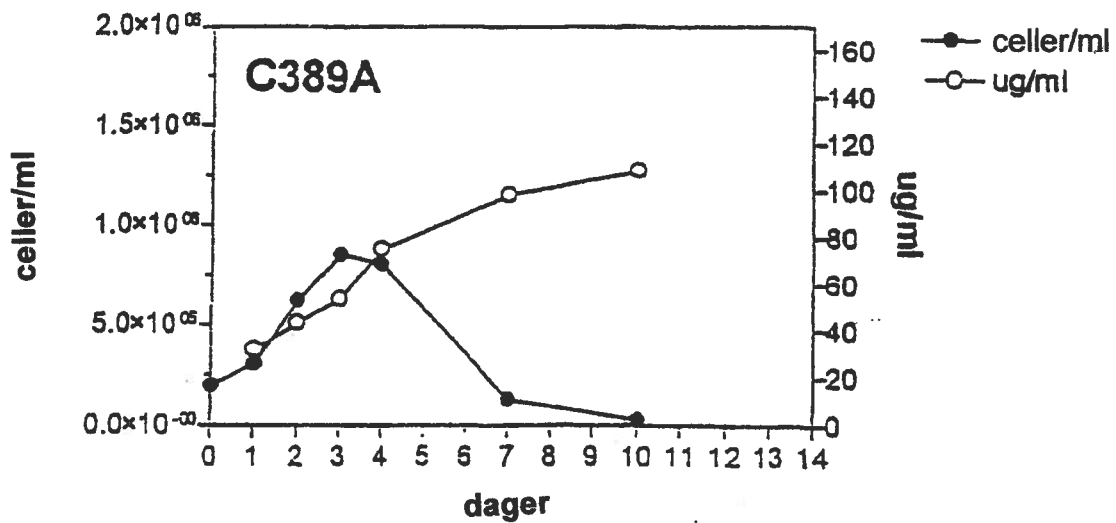
10/10



FIGUR 9A



FIGUR 9B



FIGUR 9C