



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **340827**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.
C07K 16/24 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20082905	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2006.12.05 PCT/US2006/061586
(22)	Inng.dag	2008.06.26	(85)	Videreføringsdag	2008.06.26
(24)	Løpedag	2006.12.05	(30)	Prioritet	2005.12.13, US, 60/749,953 2006.05.19, US, 60/801,948
(41)	Alm.tilgj	2008.09.03			
(45)	Meddelt	2017.06.26			
(73)	Innehaver	Eli Lilly and Co, Lilly Corporate Center, US-IN46285 INDIANAPOLIS, USA			
(72)	Oppfinner	Kingman Ng, 10745 Putnam Place, US-IN46032 CARMEL, USA			
		Barrett W Allan, 542 San Dieguito Drive, US-CA92024 ENCINITAS, USA			
		Chi-Kin Chow, 7348 Windsor Lakes Drive, US-IN46237 INDIANAPOLIS, USA			
		Lihua Huang, 3565 Corsham Circle, US-IN46032 CARMEL, USA			
		Ling Liu, 3393 Kilkenny Circle, US-IN46032 CARMEL, USA			
		Jirong Lu, 13793 Stone Drive, US-IN46032 CARMEL, USA			
		Jonathan Wendell Tetreault, 3232 Devereaux Drive, US-IN46228 INDIANAPOLIS, USA			
		Andrew Gordon Werner, 1550 Northbrook Drive, US-IN46260 INDIANAPOLIS, USA			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Anti-IL-17-antistoffer
(56)	Anførte publikasjoner	GIAVEDONI LD. Simultaneous detection of multiple cytokines and chemokines from nonhuman primates using luminex technology. J Immunol Methods. 2005, vol. 301, no. 1-2, side 89-101. MOSELEY TA. et al. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. Cytokine Growth Factor Rev. 2003, vol. 14, no. 12, side 155-174. Review. WO 2004106377 A HOFSTETTER HH. et al. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. Cell Immunol. 2005, vol. 237, no. 2, side 123-130.
(57)	Sammendrag	

Anti-IL-17 antistoffer bli identifisert som er karakterisert som å ha en høy affinitet og langsom avhastighet for humant IL-17. Antistoffene i oppfinnelsen kan være kimære, humaniserte eller fullstendig humane antistoffer, immunkonjugater av antistoffene eller antigenbindende fragmenter av dem. Antistoffene i oppfinnelsen er nyttige spesielt for å behandle autoimmune, inflammatoriske, celleproliferative og utviklingslidelser.

- Den foreliggende oppfinnelsen er innenfor feltet medisin, spesielt innenfor feltet monoklonale antistoffer mot human IL-17. Oppfinnelsen vedrører nøytraliserende anti-IL-17-monoklonale antistoffer som binder seg med høy affinitet til en IL-17 ikke-lineær eller konformasjonell antigenepitop som omfatter aminosyrene DGNVDYH (SEK ID nr. 276). Antistoffene ifølge oppfinnelsen kan være kimære, humaniserte eller humane antistoffer, immunkonjugater av antistoffene eller de antigenbindende fragmentene av dem og er nyttige som et medikament for behandlingen av autoimmune, inflammatoriske, celleproliferative og utviklingslidelser.
- IL-17-familien av cytokiner inkluderer på det nåværende tidspunkt IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E og IL-17F. Alle IL-17-familiemedlemmene har fire veldig konserverte cysteinrester som er involvert i dannelsen av interkjededisulfidbroer og har to eller flere cysteinrester som kan være involvert i interkjededisulfidbroer. Medlemmer av IL-17-familien har ingen sekvenslikhet til noen andre kjente cytokiner. En viral homolog av IL-17A ble imidlertid funnet i åpen leseramme 13 hos herpesvirus saimiri (Z. Yao, et al., *Immunity*, 3:811,1995) og har 72% aminosyrerestidentitet med human IL-17A. Flere funksjoner er blitt rapportert for IL-17-familiemedlemmene som hovedsakelig involverer regulering av immunresponsen.
- Interleukin 17 (IL-17, også referert til som IL-17A) er et 20-30 kD homodimert glykoprotein som produseres hovedsakelig av aktiverte CD4⁺ T-celler og fungerer som et proinflammatorisk cytokin. Når et bestemt IL-17-familiemedlem refereres som kun "IL-17", så forstås det at familiemedlemmet det refereres til er IL-17A. IL-17 utskilles av aktiverte T-celler på steder med inflammasjon som ikke er i den systemiske sirkulasjonen. IL-17 binder til en type I transmembranreseptor som kalles IL-17R som hovedsakelig er et stort allestedsværende uttrykt protein som ikke viser signifikant sekvenslikhet til andre kjente cytokinreseptorer. IL-17 har flere biologiske egenskaper, inkludert å oppregulere adhesjonsmolekyler og å indusere produksjonen av flere inflammatoriske cytokiner og kjemokiner fra forskjellige celletyper inkludert synoviocytter, kondroiter, fibroblaster, endotelceller, epitelceller, keratinocytter og makrofager. IL-17 induserer også rekrutteringen av neutrofiler til et inflammatorisk sted gjennom induksjon av kjemokinfrigjøring, og stimulerer produksjon av prostaglandiner og metallproteinaser, og hemmer proteoglykansyntese. Videre så spiller IL-17 en viktig rolle i modningen av hematopoietiske stamceller. Det har vært vist at IL-17 har signalleringsroller i forskjellige organer og vev inkludert lunge, artikulær brusk, ben, hjerne, hematopoietiske celler,

nyre, hud og tarm. For en oversikt over IL-17-bioaktivitet, se f.eks. Kolls og Linden, *Immunity* 21:467-476, 2004, eller Fossiez et al., *Int. Rev. Immunol.* 16:541,1998.

Økede nivåer av IL-17 (dvs. IL-17A) er blitt assosiert med flere tilstander, sykdommer eller lidelser som inkluderer luftveisinflammasjon, reumatoid artritt ("RA"), osteoartritt, benerosjon, intraperitoneal abscess og adhesjoner, inflammatorisk bowellidelse ("IBD"), avsetning av allograft, psoriasis, visse typer cancer, angiogenese, aterosklerose og multippel sklerose ("MS") (for en oversikt, se Witkowski et al., *Cell. Mol. Life Sci.* 61:567-579, 2004). Både IL-17 og IL-17R er oppregulert i synovialt vev til RA-pasienter. Å blokkere en IL-17-bioaktivitet ved å binde et IL-17-spesifikt antistoff eller løselig reseptor til IL-17 reduserer inflammasjon og benerosjon i forskjellige dyreartrittmodeller. (Se f.eks. Lubberts et al., *Arthritis & Rheumatism*, 50:650-659, 2004). Videre har IL-17 IL-1 β -uavhengige effekter på kollagenmatriksnedbrytning og inflammasjon og leddskade, mens IL-17 har synergi med TNF- α i å oppformere inflammasjon.

Gitt dets lokaliserte distribusjon ved inflammasjonsstedet, så synes det dermed som om IL-17 er et nytt mål for behandlingen av RA og andre inflammatoriske eller autoimmune sykdommer med en potensielt høyere trygghetsprofil enn medikamenter som målretter den systemiske sirkulasjonen av pro-inflammatoriske cytokiner slik som TNF- α . Nåværende FDA-godkjente bioprodukter (ENBREL®, REMICADE® og HUMIRA® antistoffer) som binder seg til og nøytraliserer TNF- α har vist effektivitet å redusere tegn og symptomer på RA og i å forsinke progresjon av sykdommen i en undergruppe med RA-pasienter. Ikke alle RA-pasienter responderer imidlertid likt til hemming av en TNF- α -bioaktivitet med disse bioprodukter. I tillegg er IL-17 mRNA økt i multippel skleroselesjoner og i mononukleære celler i blodet og cerebrospinal væske hos MS-pasienter, spesielt under klinisk forværring. Følgelig er det et behov for sammensetninger som antagoniserer eller nøytraliserer aktiviteten til IL-17 for å behandle lidelser, sykdommer eller tilstander hvor tilstedeværelsen av IL-17-bioaktivitet forårsaker eller bidrar til en uønsket patologisk effekt eller hvor en nedsatt IL-17-bioaktivitet bidrar til en ønsket terapeutisk effektiv, inkludert inflammatoriske lidelser, celleproliferative og utviklingslidelser og autoimmune lidelser slik som RA og MS og IBD.

Det er et behov for et nøytraliserende anti-IL-17-antistoff som spesifikt binder IL-17 av human opprinnelse så vel som IL til et ikke-humant pattedyr og dermed tillater at antistoffet anvendes i prekliniske og kliniske in vivo studier. Videre er det et behov for et IL-17-spesifikt antistoff som binder IL-17 med en høy affinitet og så/eller har en lang-

som avhastighet og tillater dermed at den effektive terapeutiske dosen minimaliseres og resulterer i sjeldnere dosering med et slikt antistoff sammenlignet med et antistoff som binder IL-17 med en lavere affinitet (f.eks. en høyere K_D) og/eller har en raskere avhastighet. Et høyt affinitets-IL-17-spesifikt antistoff er også ønskelig i at det kan tillate at antistoffet administreres til en pasient subkutant istedenfor intravenøst. Det er også et behov for et IL-17-spesifikt antistoff med en lav IC_{50} -verdi i en IL-17-bioaktivitetsanalyse for å generere et terapeutisk anti-IL-17-antistoff med en minimum effektiv terapeutisk dose. Det er også ønskelig å tilveiebringe et antistoff som er spesifikt for IL-17 hvor en immunrespons mot antistoffet som fremkalles av en pasient som mottar antistoffet reduseres til et minimum. Den foreliggende oppfinnelsen tilfredsstiller disse behovene og tilveiebringer relaterte fordeler. Antistoffer ifølge oppfinnelsen er kimære, humaniserte eller fullestendig humane anti-IL-17-monoklonale antistoffer og antigenbindende deler av dem, som binder en ikke-lineær epitop som omfatter IL-17-aminosyrene DGNVDYH (SEK ID nr. 276) og som antagoniserer eller nøytraliserer minst en in vitro eller in vivo biologisk aktivitet som er assosiert med IL-17 eller en del av det.

I en utførelsesform har antistoffene ifølge oppfinnelsen en IC_{50} som er mindre enn eller lik ca. 1 nM, 900 pM, 800 pM, 700 pM, 600 pM, 560 pM eller 500 pM i en in vitro IL-8-reporteranalyse som beskrevet f.eks. i eksempel 6A her eller mindre enn eller lik 560 pM i en in vitro GRO α -reporteranalyse som beskrevet f.eks. i eksempel 6B her.

I en annen utførelsesform, blir antistoffene ifølge oppfinnelsen karakterisert ved en sterk bindingsaffinitet (K_D) for humant IL-17, dvs. mindre enn ca. 7 pM, 6,5 pM, 6,0 pM, 5,5 pM, 5,0 pM, 4,5 pM eller 4,0 pM. Alternativt, blir antistoffene ifølge oppfinnelsen karakterisert ved en K_D for humant IL-17 som ikke er større enn ca. 7 pM, 6,5 pM, 6,0 pM, 5,5 pM, 5,0 pM, 4,5 pM eller helst ikke større enn ca. 4,0 pM. Helt blir antistoffene ifølge oppfinnelsen videre karakterisert med en K_{av} -hastighet fra humant IL-17 som er mindre enn $2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.

I en annen utførelsesform, blir anti-IL-17-antistoff ifølge oppfinnelsen karakterisert ved spesifikt å binde humant IL-17 så vel som cynomolg ape IL-17 mens det ikke binder muse- eller rotte-IL-17 ved nivåer større enn bakgrunn. I tillegg, binder et anti-IL-17-antistoff ifølge oppfinnelsen humant IL-17 (dvs. IL-17A), men ikke humant IL-17B, C, D, E eller F.

I en utførelsesform, omfatter et anti-IL-17 monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen en lettkjede variabel region ("LCVR") polypeptid som omfatter 3 CDR-sekvenser som er tilstede sammen i en Fab opplistet i tabell 3 her under og som er tilstede i antistoffet ifølge oppfinnelsen i den samme CDR-posisjonen som i Fab'en som er opplistet i tabell

5 3. Helst omfatter et anti-IL-17 monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen et LCVR-polypeptid med en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEK ID nr. 178-243.

10 Ifølge et første aspekt av oppfinnelsen frembringes et humanisert anti-IL-17 monoklonalt antistoff, der antistoffet omfatter:

- a) et peptid med SEQ ID NO: 131 ved CDRL1,
- b) et peptid med SEQ ID NO: 167 ved CDRL2,
- c) et peptid med SEQ ID NO: 168 ved CDRL3,
- 15 d) et peptid med SEQ ID NO: 26 ved CDRH1,
- e) et peptid med SEQ ID NO: 30 ved CDRH2, og
- f) et peptid med SEQ ID NO: 52 ved CDRH3.

20 Fortrinnsvis omfatter det humaniserte anti-IL-17 monoklonale antistoff ifølge oppfinnelsen et LCVR med SEQ ID NO: 241 og et HCVR med SEQ ID NO: 118.

Fortrinnsvis omfatter det humaniserte anti-IL-17 monoklonale antistoff ifølge oppfinnelsen er et fullengdeantistoff, et vesentlige intakt antistoff, et Fab-fragment, et F(ab')₂-fragment eller et enkeltkjede Fv-fragment.

25 Fortrinnsvis omfatter antistoffet ifølge oppfinnelsen en tungkjede konstantregion valgt fra gruppen IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA, IgE, IgM and IgD.

30 Ifølge et andre aspekt av oppfinnelsen frembringes en sammensetning som omfatter antistoffet ifølge oppfinnelsen hvor nevnte sammensetning videre omfatter en farmasøytisk akseptabel bærer.

Ifølge et tredje aspekt av oppfinnelsen frembringes et antistoff ifølge oppfinnelsen for anvendelse som et medikament.

Fortrinnsvis anvendes antistoffet ifølge oppfinneslen til behandlingen av en eller flere tilstander valgt fra gruppen som består av reumatoid artritt, inflammatorisk tarm-lidelse, psoriasis og multippel sklerose.

I en annen utførelsesform, omfatter et anti-IL-17 monoklonalt antistoff ifølge oppfinnel-
 5 sen et tungkjedevariabel region ("HCVR") polypeptid 3 CDR'er som er tilstede sam-
 men i en Fab opplistet i tabell 2 her under og som er tilstede i antistoffet ifølge oppfin-
 nelsen i den samme CDR-posisjonen som i Fab'en opplistet i tabell 2. Helst omfatter et
 anti-IL-17 monoklonalt antistoff av oppfinnelsen et HCVR-polypeptid med en aminosy-
 resekvens valgt fra gruppen som består av SEK ID nr. 56-121.

10

I en annen utførelsesform, omfatter et anti-IL-17 monoklonalt antistoff ifølge oppfinnel-
 sen et LCVR-polypeptid som omfatter 3 CDR'er som er tilstede sammen i en Fab opp-
 listet i tabell 3 og som er tilstede i antistoffet ifølge oppfinnelsen i den samme CDR-
 posisjonen som i Fab'en opplistet i tabell 3 og som videre omfatter et HCVR-polypeptid
 15 som omfatter 3 CDR'er som er tilstede sammen i en Fab opplistet i tabell 2 og som er
 tilstede i antistoffet ifølge oppfinnelsen i den samme CDR-posisjonen som i Fab'en
 opplistet i tabell 2. Helst eksisterer de 6 CDR'ene til et antistoff ifølge oppfinnelsen
 eller funksjonelle fragment av dem, sammen i en Fab opplistet i tabell 1 her under og er
 tilstede i antistoffet ifølge oppfinnelsen i den samme CDR-posisjonen som i Fab'en
 20 opplistet i tabell 1.

I en foretrukket utførelsesform, omfatter et anti-IL-17 monoklonalt antistoff ifølge opp-
 finnelsen (i) et LCVR-polypeptid med en aminosyresekvens valgt fra gruppen som be-
 står av SEK ID nr. 178-243 og (ii) et HCVR-polypeptid med en aminosyresekvens valgt
 25 fra gruppen som består av SEK ID nr. 56-121. I en mer foretrukket utførelsesform, om-
 fatter et antistoff ifølge oppfinnelsen et LCVR-polypeptid med aminosyresekvens valgt
 fra gruppen som består av SEK ID nr. 178-243 som videre omfatter HCVR-polypeptidet
 valgt fra gruppen som består av SEK ID nr. 56-121 som er tilstede i en Fab opplistet i
 tabell 1 som omfatter det bestemt LCVR tilstede i antistoffet.

30

I en annen utførelsesform, er et monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen et som kan
 konkurrere for binding til humant IL-17, eller en del av humant IL-17, med et konkurre-
 rende antistoff hvor det konkurrerende antistoffet omfatter to polypeptider med amino-
 syresekvensene SEK ID nr. 241 og 118.

35

I en annen utførelsesform, omfatter en LCVR til et anti-IL-17 monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen 1, 2 eller 3 peptider, helst 3 peptider, valgt fra gruppen som består av peptider med en sekvens som vist i (a) SEK ID nr. 122-149; (b) SEK ID nr. 150-167, og (c) SEK ID nr. 168-177 (dvs. et peptid fra (a), et peptid fra (b) og et peptid fra (c) for et antistoff som omfatter 3 nevnte peptider). Et peptid med sekvensen vist i SEK ID nr. 122-149, når det er tilstede i et antistoff ifølge oppfinnelsen, er et CDRL1. Et peptid med sekvensen vist i SEK ID nr. 150-167, når det er tilstede i et antistoff ifølge oppfinnelsen, er CDRL2. Et peptid med sekvensen vist i SEK ID nr. 150-167, når det er tilstede i et antistoff ifølge oppfinnelsen, er ved CDRL3.

10

I en annen utførelsesform, omfatter en HCVR til et anti-IL-17 monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen 1, 2 eller 3 peptider, helst 3 peptider, valgt fra gruppen som består av peptider med en sekvens som vist i (a) SEK ID nr. 11-28; (b) SEK ID nr. 29-32 og (c) SEK ID nr. 33-55 og 261 (dvs. et peptid fra (a), et peptid fra (b) og et peptid fra (c) for et antistoff som omfatter 3 nevnte peptider). Et peptid med sekvensen vist i SEK ID nr. 11-28, når det er tilstede i nevnte antistoff, er ved CDRH1. Et peptid med sekvensen vist i SEK ID nr. 29-32, når det er tilstede i nevnte antistoff, er ved CDRH2. Et peptid med sekvensen vist i SEK ID nr. 33-55 og 261, når det er tilstede i nevnte antistoff, er ved CDRH3.

20

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer videre et anti-IL-17 monoklonalt antistoff som omfatter seks peptider valgt fra gruppen som består av peptider med en sekvens som vist i (a) SEK ID nr. 122-149; (b) SEK ID nr. 150-167, (c) SEK ID nr. 168-177, (d) SEK ID nr. 11-28, (e) SEK ID nr. 29-32 og (f) SEK ID nr. 33-55 og 261 (dvs. et peptid fra hver av (a-f)); helst sameksisterer de seks peptidene i en Fab opplistet i tabell 1 her. Et peptid med sekvensen vist i SEK ID nr. 122-149, når det er tilstede i et antistoff ifølge oppfinnelsen, er ved CDRL1. Et peptid med sekvensen vist i SEK ID nr. 150-167, når det er tilstede i et antistoff ifølge oppfinnelsen, er ved CDRL2. Et peptid med sekvensen vist i SEK ID nr. 150-167, når det er tilstede i et antistoff ifølge oppfinnelsen, er ved CDRL3. Et peptid med sekvensen vist i SEK ID nr. 11-28, når det er tilstede i nevnte antistoff, er ved CDRH1. Et peptid med sekvensen vist i SEK ID nr. 29-32, når det er tilstede i nevnte antistoff, er ved CDRH2. Et peptid med sekvensen vist i SEK ID nr. 33-55 og 261, når det er tilstede i nevnte antistoff, er ved CDRH3.

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer videre et anti-IL-17 monoklonalt antistoff som omfatter de seks peptidene med sekvensene som vist i SEK ID nr. 247, 248, 249,

35

244, 245 og 246. Peptidet med sekvensen vist i SEK ID nr. 247 er ved CDRL1. Peptidet med sekvensen vist i SEK ID nr. 248 er ved CDRL2. Peptidet med sekvensen vist i SEK ID nr. 249 er ved CDRL3. Peptidet med sekvensen vist i SEK ID nr. 244 er ved CDRH1. Peptidet med sekvensen vist i SEK ID nr. 245 er ved CDRH2. Peptidet med sekvensen vist i SEK ID nr. 246 er ved CDRH3.

Et anti-IL-17 monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen kan omfatte eller bestå av et intakt antistoff (dvs. fullengde), et vesentlig intakt antistoff eller en antigenbindende del av det, f.eks. et Fab-fragment, et F(ab')₂-fragment eller et enkeltkjede Fv-fragment. Videre kan et antistoff ifølge oppfinnelsen være merket med en detekterbar merking, immobilisert på en fast fase og/eller konjugert med en heterolog forbindelse, f.eks. et enzym, toksin eller polyetylglykolmolekyl.

Det beskrives også en fremgangsmåte for å lage et anti-IL-17 monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen som omfatter å opprettholde en vertscelle (dvs. vertscelle som er blitt transformert, transdusert eller infisert med en vektor (eller vektorer) som uttrykker et antistoff ifølge oppfinnelsen) under betingelser som er passende for uttrykk av et monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen, hvorved slikt antistoff blir uttrykt. Fremgangsmåten kan videre omfatte trinnet med å isolere det monoklonale antistoffet ifølge oppfinnelsen fra cellen eller helst fra dyrkningsmediet som cellen dyrkes i.

Diagnostiske anvendelser for monoklonale antistoffer ifølge oppfinnelsen blir overveid. I en diagnostisk bruk, tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å bestemme nivået av IL-17-protein i en prøve som omfatter å eksponere en prøve som skal testes for et anti-IL-17 antistoff ifølge oppfinnelsen under bindingsbetingelser og å bestemme spesifikk binding av antistoffet til prøven. Et anti-IL-17 antistoff ifølge oppfinnelsen kan anvendes for å bestemme nivåene av IL-17 i testprøver ved å sammenligne testprøveverdier med en standardkurve generert ved å binde nevnte antistoff til prøver med kjente mengder av IL-17. Oppfinnelsen tilveiebringer videre et kitt som omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen og helst instruksjoner for å anvende antistoffet for å detektere IL-17-protein i en prøve.

Oppfinnelsen tilveiebringer en sammensetning, helst en farmasøytisk sammensetning som omfatter et anti-IL-17 monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen. Den farmasøytiske sammensetningen ifølge oppfinnelsen kan videre omfatte en farmasøytisk akseptabel bærer, bindemiddel og/eller fortynner. I nevnte farmasøytiske sammensetning, er det

anti-IL-17 monoklonale antistoffet ifølge oppfinnelsen den eneste aktive ingrediensen. Helst omfatter den farmasøytiske sammensetningen en homogen eller vesentlig homogen populasjon av et anti-IL-17 monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen. Sammensetningen for terapeutisk anvendelse er fysiologisk kompatibel, steril og kan lyofiliseres og
5 valgfritt leveres med en passende fortynner.

Det beskrives en fremgangsmåte for å hemme minst en IL-17 bioaktivitet i et dyr, helst et pattedyr, mer ønskelig et menneske, som trenger det som omfatter å administrere en terapeutisk effektiv mengde eller en IL-17 nøytraliserende mengde av et anti-IL-17 mo-
10 noklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen til nevnte dyr. Det beskrives også en fremgangsmåte for å behandle en sykdom eller lidelse som er forbedret ved å nøytralisere eller å antagonistere en IL-17 bioaktivitet, f.eks. hemming av signaltransduksjon som er et resultat fra bindingen fra IL-17 til dets reseptor, som kan omfatte å gi til en pasient (f.eks. et menneske) som trenger slik behandling eller forebygging en terapeutisk effek-
15 tiv mengde av en IL-17 nøytraliserende mengde av et monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen.

Oppfinnelsen omfatter et anti-IL-17 monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen for anvendelse i produksjonen av et medikament for å administreres til et pattedyr, helst et
20 menneske, for behandlingen av f.eks. en autoimmun lidelse eller inflammasjonslidelse eller celleprolifereringslidelse.

Oppfinnelsen vedrører videre en artikkel for produksjon som omfatter et pakkemateriale og et antistoff ifølge oppfinnelsen som finnes innen nevnte pakkemateriale, hvor
25 pakkematerialet omfatter et pakkeinnskudd som indikerer at antistoffet spesifikt nøytraliserer en IL-17-aktivitet eller reduserer nivået av funksjonelt IL-17 som er tilstede i systemet.

Det tilveiebringes videre isolerte nukleinsyremolekyler som koder for et antistoff ifølge
30 oppfinnelsen eller en lett kjede eller en tung kjede av det; en vektor (eller vektorer) som omfatter nevnte nukleinsyrer, valgfritt operativt koblet til kontrollsekvenser som gjenkjennes av en vertscelle transformert ved vektoren; en vertscelle som omfatter den vektor; en prosess for å produsere et antistoff ifølge oppfinnelsen som omfatter å dyrke vertscellen slik at nukleinsyren uttrykkes og valgtfritt å gjenvinne antistoffet fra vertscelledyrkningsmediet.
35

Oppfinnelsen tilveiebringer videre isolerte nukleinsyremolekyler som koder for cynomolg ape IL-17 (SEK ID nr. 243) eller kanin IL-17 (SEK ID nr. 251); IL-17-proteinet som kodes for av ape- eller kaninnukleinsyren (SEK ID nr. hhv. 10 og 9); vektorer som omfatter nevnte nukleinsyremolekyl; vertscelle som omfatter nevnte vektor og en prosess for å produsere cynomolg ape IL-17 eller kanin IL-17.

Fig. 1 viser aminosyresekvensoppstillingen til medlemmer av human IL-17-familien av proteiner (IL-17, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E og IL-17F).

Fig. 2 viser aminosyresekvensoppstillingen av IL-17 fra human, kanin, rotte, cynomolg ape og musearter.

Oppfinnelsen presenterer kimære, humaniserte eller fullstendig humane anti-IL-17 monoklonale antistoffer eller antigenbindende deler av dem, som er i stand til å nøytralisere eller antagonisere minst en IL-17-aktivitet in vitro og/eller in vivo. Helst, blir slike antistoffer ifølge oppfinnelsen videre karakterisert som å ha en IC_{50} som er mindre enn ca. 600 eller 560 pM i f.eks. en in vitro IL-8-reporteranalyse eller GRO α -reporteranalyse (se f.eks. eksempel 6) og/eller som helst har en sterk bindingsaffinitet med IL-17 på mindre enn 4 pM. Antistoffene ifølge oppfinnelsen karakteriseres videre ved at de spesifikt binder humant og cynomolg ape IL-17 (hhv. SEK ID nr. 1 og 10), men ikke muse- eller rotte-IL-17 (hhv. SEK ID nr. 7 og 8). Den antigene epitopen som de monoklonale antistoffene ifølge oppfinnelsen binder til er en ikke-lineær epitop av human (og ape) IL-17 og omfatter rester DGNVDYH (SEK ID nr. 276) til IL-17. Et antistoff ifølge oppfinnelsen kommer i kontakt med peptidet DGNVDYH (SEK ID nr. 276) når det er i sammenhengen med fullengde IL-17.

”Interleukin 17”, også referert til som ”IL-17” eller ”IL-17A” er et 20-30 kD glykosylert homodimert protein. Det humane IL-17-genet koder for et 155 aminosyreprotein som har en 19 aminosyresignalsekvens og et 136 aminosyremodent segment. Humant IL-17 viser aminosyresekvensidentitet på 62,5% og 58% til hhv. muse- og rotteaminosyre IL-17-sekvensene, som vist i fig. 2. Humant IL-17 viser aminosyresekvensidentitet på 97,4% til det cynomolg ape IL-17.

Et fullengdeantistoff som det eksisterer naturlig er et immunoglobulinmolekyl som er omfattet av fire peptidkjeder, to tunge (H) kjeder (ca. 50-70 kDa når det er fullengde) og to lette (L) kjeder (ca. 25 kDa når det er fullengde) som er bundet sammen med disulfidbindinger. Den aminoterminal delen til hver kjede inkluderer en variabel region på

ca. 100 til 110 eller flere aminosyrer som primært er ansvarlig for antigengjenkjenning. Den karboksyterminale delen av hver kjede definerer en konstant region som primært er ansvarlig for effektorfunksjon.

5 Lette kjeder klassifiserer som κ og λ og er karakterisert ved en bestemt konstant region. Hver lett kjede omfattes av en N-terminal lett kjedeveriabel region (her "LCVR") og en lett kjedekonstant region som er sammensatt av et domene, CL. Tunge kjeder er klassifisert som γ , μ , α , δ , eller ϵ , og definerer antistoffets isotype som hhv. IgG, IgM, IgA, IgD og IgE og flere av disse kan videre deles inn i underklasser (isotyper), f.eks. IgG₁,
10 IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ og IgA₂. Hver tung kjedetype er karakterisert ved en bestemt konstant region. Hver tung kjede er omfattet av en N-terminal tung kjedeveriabel region (her "HCVR") og en tung kjedekonstant region. Den tung kjedekonstante regionen er omfattet av tre domener (CH1, CH2 og CH3) for IgG, IgD og IgA; og fire domener (CH1, CH2, CH3 og CH4) for IgM og IgE.

15 HCVR- og LCVR-regionene kan videre underdeles i regioner for hypervariabilitet, kalt komplementaritetsbestemmende regioner ("CDR'er"), innsatt med regioner som er mer konserverte, kalt leserammeregioner ("FR"). Hver HCVR og LCVR er sammensatt av tre CDR'er og fire FR'er, arrangert fra den aminoterminalen enden til den karboksyterminale enden i følgende rekkefølge: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. For fullengdeantistoffene ifølge oppfinnelsen så omfatter de lette kjedene helst nedstrøms for FR4, et polypeptid med sekvensen vist i SEK ID nr. 277. For fullengdeantistoffer ifølge oppfinnelsen, så omfatter de tunge kjedene helst nedstrøms for FR4, et polypeptid med sekvensen vist i SEK ID nr. 278. Her blir de tre CDR'ene til den tunge kjeden referert til som "CDRH1, CDRH2 og CDRH3" og de tre CDR'ene til den lette kjeden refereres til som "CDRL1, CDRL2 og CDRL3". CDR'ene inneholder de fleste restene som
25 danner spesifikke interaksjoner med antigenet. Nummereringen og posisjoneringen til CDR-aminosyrerestene innen HCVR- og LCVR-regionene er i overensstemmelse med den velkjente Kabat-nummereringskonvensjonen.

30 Uttrykket "antistoff" med referanse til et anti-IL-17 monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen (eller enkelt "antistoff ifølge oppfinnelsen"), som anvendt, refererer til et monoklonalt antistoff. Et "monoklonalt antistoff" som anvendt her, refererer til et gnager-, helst muse-antistoff, et kimært antistoff, et humanisert antistoff eller et fullstendig human antistoff, med mindre annet er indikert her. Monoklonale antistoffer ifølge oppfinnelsen kan produseres ved å anvende f.eks. hybridomteknikker som er velkjente i fagfel-

tet, så vel som rekombinante teknologier, fagdisplayteknologier, syntetiske eller rekombinante teknologier eller kombinasjoner av slike teknologier som lett vites i fagfeltet. Uttrykket "monoklonalt antistoff" som anvendt her er ikke begrenset til antistoffer som er produsert gjennom hybridomateknologi. "Monoklonalt antistoff" refererer til et antistoff som er utledet fra en enkel kopi eller klon, inkludert f.eks. eukaryot, prokaryot eller fagklon, og ikke fremgangsmåten som det er produsert ved. Et "monoklonalt antistoff" kan være et intakt antistoff (som omfatter en fullstendig eller fullengde Fc-region), et vesentlig intakt antistoff eller en del eller fragment av et antistoff som omfatter en antigenbindende del, f.eks. et Fab-fragment, Fab'-fragment eller F(ab')₂-fragment av et museantistoff eller av et kimært, humanisert eller humant antistoff. "Fag"-fragmentet inneholder et variabel og konstant domene av den lette kjeden og et variabelt domene og det første konstante domenet (CH1) av den tunge kjeden. "F(ab')₂"-antistofffragmenter omfatter et par med Fab-fragmenter som generelt er kovalent koblet nær deres karboksyterminale enden ved hengselcysteiner mellom dem. Andre kjemiske koblinger av antistofffragmenter er også kjent i fagfeltet.

Den variable regionen til hvert lett-tung kjedepar danner et antigenbindende sete på antistoffet. Et intakt IgG-antistoff har dermed to bindings seter. Untatt for bifunksjonelle eller bispesifikke antistoffer, så er de to antigenbindende setene til antistoffet de samme. Som anvendt her, refererer "den antigenbindende delen" eller "den antigenbindende regionen" eller "det antigenbindende domenet" til at de kan brukes om hverandre for den del av et antistoffmolekyl som inneholder aminosyrerestene som interagerer med et antigen og som utviser på antistoffet dets spesifisitet og affinitet for antigenet. Denne antigen del inkluderer "leseramme"-aminosyrerester som er nødvendig for å opprettholde den passende konsentrasjonen av de antigenbindende restene. Helst er CDR'ene til den antigenbindende delen av antistoffene ifølge oppfinnelsen, fullstendig eller vesentlig av museopprinnelse, valgfritt med visse aminosyrerester forandret, f.eks. substituert med en forskjellig aminosyrerest, (se f.eks. tabell 2 og 3) for å optimalisere en bestemt egenskap av antistoffet, f.eks. K_D, k_{av}, IC₅₀. Helst her leserammeregionene til antistoffene ifølge oppfinnelsen av human opprinnelse eller vesentlig av human opprinnelse (minst 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% eller 99% av human opprinnelse). Foretrukne leserammeregioner av antistoffer ifølge oppfinnelsen har de følgende sekvensene: SEK ID nr. 262 (HCVR FR1), 263 (HCVR FR2), 264 (HCVR FR3), 265 (HCVR FR4), 266 (LCVR FR1), 267 (LCVR FR2), 268 (LCVR FR3), 269 (LCVR FR4) og følger Kabat-nummerering. I andre utførelsesformer kan den antigenbindende regionen til et IL-17-antistoff ifølge oppfinnelsen være utledet fra andre ikke-humane arter, in-

kludert men ikke begrenset til kanin, rotte eller hamster. Alternativt, kan den antigen-bindende regionen være utledet fra human sekvens.

Videre kan et "monoklonalt antistoff" som anvendt her, være et enkelt kjede Fv-fragment som kan produseres ved å koble DNA som koder for et LCVR og DNA som koder for HCVR med en linkersekvens. (Se Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, bind 113, Rosenberg and Moore red., Springer-Verlag, New York, s. 269-315, 1994). Det må forstås at uansett om fragmentene er spesifisert, så inkluderer uttrykket "antistoff" som anvendt her slike fragmenter så vel som enkeltkjedeformer. Så lenge som proteinet bevarer dets evne til spesifikt å fortrinnsvis binde dets mente mål (dsv. epitop eller antigen), så er det inkludert innen uttrykket "antistoff". Antistoffer kan være eller de trenger ikke være glykosylerte og faller enda innenfor grensene for oppfinnelsen.

En populasjon av "monoklonale antistoffer" refererer til en homogen eller vesentlig homogen antistoffpopulasjon (dvs. minst ca. 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, mer ønskelig minst ca. 97% eller 98% eller mest ønskelig minst 99% av antistoffene i populasjonen ville konkurrere i en ELISA-analyse for det samme antigenet eller epitopen eller mer ønskelig er antistoffene identiske i aminosyresekvens. Antistoffer kan være eller de trenger ikke være glykosylerte og fremdeles falle innenfor grensene for oppfinnelsen. Monoklonale antistoffer kan være homogene hvis de har identisk aminosyresekvens, selv om de kan skille seg i en posttranslasjonell modifikasjon, f.eks. glykosyleringsmønster.

Et "variant" antistoff, refererer her til et molekyl som skiller seg i aminosyresekvens fra en "foreldre" antistoffaminosyresekvens i kraft av tilsetning, sletting og/eller substitusjon av en eller flere aminosyrerester av foreldreantistoffsekvensen. I en foretrukket utførelsesform omfatter variantantistoffet minst en aminosyre (f.eks. fra 1 til ca. 10, og helst 2, 3, 4, 5, 6, 7 eller 8) tilsetning, sletting og/eller suppresjon i CDR-regionene til foreldreantistoffet. Identitet eller homologi med hensyn til variantantistoffsekvensen er definert her som prosenten av aminosyrerester i variantantistoffsekvensen som er identisk med foreldreantistoffrestene etter oppstilling av sekvensene og introduksjon av gap, hvis det er nødvendig, for å oppnå den maksimale prosentsekvensidentiteten. Variantantistoffet bevarer dets evne til å binde antigenet eller helst epitopen som foreldreantistoffet binder og helst har minst en egenskap eller bioaktivitet som er overlegen i forhold til foreldreantistoffet. For eksempel har variantantistoffet helst sterkere bindingsaffinitet,

saktere avhastighet, lavere IC_{50} eller forsterket evne til å hemme en antigenbioaktivitet enn foreldreantistoffet. Et variantantistoff med spesiell interesse her, er en som viser minst ca. 2 ganger, helst minst ca. 5 ganger, 10 ganger eller 20 ganger forsterking i en egenskap eller bioaktivitet sammenlignet med foreldreantistoffet.

5

”Foreldre”-antistoffet her er et som er kodet for av en aminosyresekvens anvendt for tillagingen av et variantantistoff. Foreldreantistoffet kan ha leserammesekvens med museopprinnelse, men helst er leserammesekvensen fullstendig eller vesentlig av human opprinnelse. Foreldreantistoffet kan være et muse-, kimært, humanisert eller human

10

Uttrykket ”binder spesifikt” som anvendt her, refererer til situasjonen hvor et medlem av et spesifikt bindingspar ikke signifikant binder molekyler forskjellig fra dets spesifikke bindingspartner eller partnere. Uttrykket kan også anvendes hvor f.eks. et antigenbindende domene til et antistoff ifølge oppfinnelsen er spesifikt for en bestemt epitop som bæres av en rekke antigener, i dette tilfellet vil det spesifikke antistoffet som bærer det antigenbindende domenet være i stand til å binde de forskjellige antigenene som bærer epitopen. Følgelig så binder et monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen spesifikt humant IL-17 (dvs. IL-17A) mens det ikke spesifikt binder humant IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F. Videre binder et monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen spesifikt humant IL-17 og cynomolg ape IL-17, men binder ikke spesifikt rotte IL-17 eller muse IL-17. Videre binder et monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen spesifikt en ikke-lineær eller konformasjonell human IL-17-epitop som omfatter aminosyrene DGNVDYH (SEK ID nr. 276), men binder ikke en human IL-17-epitop som ikke omfatter aminosyrene DGNVDYH (SEK ID nr. 276).

25

Uttrykket ”binder helst” som anvendt her, refererer til situasjonen hvor et antistoff binder et spesifikt antigen minst ca. 20% mer, helst minst 50%, 2 ganger, 20 ganger, 50 ganger, eller 100 ganger mer enn det det binder et forskjellig antigen som målt ved en teknikk tilgjengelig i fagfeltet, f.eks. konkurranse ELISA eller K_D -måling med en BIACORE eller KINEXA analyse. Et antistoff kan helst binde en epitop innen et antigen i forhold til en annen epitop innenfor det samme antigenet. Følgelig, binder et antistoff ifølge oppfinnelsen heller humant IL-17 enn kanin IL-17.

30

Uttrykket ”epitop” refererer til den del av et molekyl som er i stand til å gjenkjennes av og bindes av et antistoff i en eller flere antistoffets antigenbindende regioner. Epitoper

35

består ofte av en kjemisk aktiv overflategruppering av molekyler slik som aminosyrer eller sukkersidekjeder og har spesifikke tredimensjonale strukturelle karakteristika så vel som spesifikke ladningskarakteristika. Ved ”å hemme epitop” og/eller ”å nøytralisere epitop” er ment en epitop som når den i sammenhengen med det intakte antigenet molekylet og når den bindes av et antistoff som er spesifikt for epitopen, resulterer i tap eller reduksjon av en biologisk aktivitet av molekylet *in vivo* eller *in vitro* eller i en organisme som inneholder molekylet.

Uttrykket ”epitop”, som anvendt her, refererer videre til en del av et polypeptid som har antigen og/eller immunogen aktivitet i et dyr, helst et pattedyr, f.eks. en mus eller et menneske. Uttrykket ”antigen epitop”, som anvendt her, er definert som en del av et polypeptid som et antistoff kan binde seg spesifikt til som bestemt ved hjelp av enhver fremgangsmåte kjent i fagfeltet, f.eks. ved konvensjonelle immunanalyser. Antigene epitoper trenger ikke nødvendigvis være immunogene, men de kan være immunogene. En ”immunogen epitop” som anvendt her, er definert som en del av et polypeptid som fremkaller en antistoffrespons i et dyr, bestemt ved hjelp av enhver kjent fremgangsmåte i fagfeltet. En ”ikke-lineær epitop” eller ”konformasjonell epitop” omfatter ikke etterfølgende polypeptider (eller aminosyrer) innen det antigenet proteinet som et antistoff som er spesifikt for epitopet det binder til.

Frasene ”biologisk egenskap” eller ”biologisk karakteristika” eller uttrykkene ”aktivitet” eller ”bioaktivitet”, i referanse til et antistoff i den foreliggende oppfinnelsen blir anvendt om hverandre her og inkluderer, men er ikke begrenset til, epitop/antigenaffinitet og spesifisitet, evnen til å nøytralisere eller å antagonisere en aktivitet av IL-17 *in vivo* eller *in vitro*, IC₅₀, *in vivo* stabilitet av antistoffet og de immunogene egenskapene til antistoffet. Andre identifiserbare biologiske egenskaper eller karakteristika til et antistoff anerkjent i fagfeltet inkluderer f.eks. kryssreaktivitet (dvs. med ikke-humane homologer av det målrettede peptidet eller med andre proteiner og vev generelt), og evnen til å konservere høye uttrykksnivåer av protein i pattedyrceller. De tidligere nevnte egenskapene eller karakteristikaene kan observeres, måles eller bedømmes ved å anvende fagfeltanerkjente teknikker som inkluderer, men som ikke er begrenset til, ELISA, kompetitiv ELISA, BIACORE eller KINEXA overflateplasmonresonansanalyser, *in vitro* eller *in vivo* nøytraliseringsanalyser uten grense, reseptorbinding, cytokin- eller vekstfaktorproduksjon og/eller -sekresjon, signaltransduksjon og immunhistokjemi med vevsseksjoner fra forskjellige kilder, som inkluderer menneske, primat eller en hver annen kilde.

Uttrykket ”hemme” eller ”nøytralisere” som anvendt her med hensyn til en aktivitet av et antistoff ifølge oppfinnelsen, betyr evnen til vesentlig å antagonisere, hindre, fore- bygge, begrense, senke, ødelegge, eliminere, stoppe eller reversere f.eks. progresjon av
 5 alvorlighet av det som skal hemmes inkludert, men ikke begrenset til, en biologisk aktivitet (f.eks. en IL-17 aktivitet) eller egenskap, en sykdom eller en tilstand. Hemmingen eller nøytraliseringen av en IL-17-aktivitet som er et resultat fra å binde et antistoff ifølge oppfinnelsen med IL-17 er helst minst ca. 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% eller høyere.

10 Uttrykket ”isolert” når det anvendes i sammenheng med en nukleinsyre eller et protein (f.eks. et antistoff) refererer til et nukleinsyremolekyl eller et protein som er identifisert og separert fra minst en kontaminant som det ordinært er assosiert med i sin naturlige kilde. Helst er et ”isolert antistoff” et antistoff som er vesentlig fritt for andre antistoffer som har forskjellige antigene spesifisiteter (f.eks. farmasøytiske sammensetninger av
 15 oppfinnelsen som omfatter et isolert antistoff som spesifikt binder IL-17 og som er vesentlig fri for antistoff som spesifikt binder antigener forskjellig fra IL-17).

Uttrykkene ”Kabat-nummerering” og ”Kabat-merking” anvendes om hverandre her. Disse uttrykkene som er anerkjent i fagfeltet, refererer til et system for å nummerere
 20 aminosyrerester som er mer variable (dvs. hypervariable) enn andre aminosyrerester i de tunge og lette kjedevARIABLE regionene til et antistoff (Kabat et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-93 (1971); Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5. utgave, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication nr. 91-3242 (1991)).

25 Et polynukleotid er ”operativt koblet” til et annet polynukleotid når det er plassert i et funksjonelt forhold med det andre polynukleotidet. For eksempel er en promoter eller forsterker operativt koblet til en kodende sekvens hvis den påvirker transkripsjonen av sekvensen. Et peptid er ”operativt koblet” til et annet peptid når polynukleotidene som
 30 koder for dem er operativt koblet, helst så er de i den samme åpne leserammen.

Uttrykkene ”person”, ”individ” og ”pasient” anvendt om hverandre her, refererer til et pattedyr inkludert, men ikke begrenset til, muse, ape, menneske, pattedyrgårdsdyr, pattedyrsportsdyr og pattedyrkjæledyr; helst refererer uttrykket til mennesker. I visse utfø-
 35 relsesformer blir individet, helst et pattedyr, et menneske, videre karakterisert med en sykdom eller lidelse eller tilstand som ville ha fordel av en nedsatt bioaktivitet av IL-17.

Uttrykket "vektor" inkludere et nukleinsyremolekyl som er i stand til å transportere en annen nukleinsyre som det er koblet til, inkludert men ikke begrenset til, plasmider og virale vektorer. Visse vektorer er i stand til autonom replikasjon i en vertscelle som de er introdusert inn i, mens andre vektorer kan integreres inn i genomet til en vertscelle ved introduksjonen inn i vertscellen og dermed replikeres sammen med vertsgenomet. Videre er visse vektorer i stand til å styre uttrykk av gener som de er operativt koblet til. Slike vektorer refereres til her som "rekombinante uttrykksvektorer" (eller enkel "uttrykksvektorer") og eksemplarer på vektorer er velkjent i fagfeltet.

Som anvendt her, blir uttrykkene "celle", "vertscelle", "cellelinje" og "cellekultur" anvendt om hverandre og inkluderer en individuell celle eller cellekultur som er mottaker av et hvert isolert polypeptid ifølge oppfinnelsen eller enhver rekombinant vektor som omfatter en sekvens som koder for et HCVR, LCVR eller et monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen. Vertsceller inkluderer avkom av en enkel vertscelle og avkommet trenger ikke nødvendigvis være fullstendig identisk (i morfologi eller i total DNA-komplement) til den opprinnelige foreldrecellen p.g.a. naturlig, tilfeldig eller overlagt mutasjon og/eller forandring. En vertscelle inkluderer celler som er transformert, transdusert eller infisert med en rekombinant vektor eller et polynukleotid som uttrykker et monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen eller en lett kjede eller en tung kjede av det. En vertscelle som omfatter en rekombinant vektor ifølge oppfinnelsen, enten stabilt inkorporert inn i vertskromosomet eller ikke, kan også refereres som en "rekombinant vertscelle". Foretrukne vertsceller for anvendelse ifølge oppfinnelsen er CHO-celler (f.eks. ATCC CRL-9096), NS0-celler, SP2/0-celler, COS-celler (ATCC f.eks. CRL-1650, CRL-1651) og HeLa (ATCC CCL-2). Tilleggsvertsceller for anvendelse ifølge oppfinnelsen inkluderer planteceller, gjærceller, andre pattedyrceller og prokaryote celler.

Antistoffkarakterisering

Den foreliggende oppfinnelsen vedrører isolerte monoklonale antistoffer som spesifikt binder til humant IL-17 (dvs. IL-17A) med høy affinitet. Antistoffene ifølge oppfinnelsen er helst kimære, humaniserte eller humane antistoffer eller antigenbindende deler av dem. Videre, så nøytraliserer eller antagoniserer antistoffene ifølge oppfinnelsen minst en IL-17 biologisk aktivitet in vivo og/eller in vitro. Spesifikk binding av et anti-IL-17-monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen (som inkluderer antigenbindende deler av det) til IL-17 tillater nevnte antistoff anvendes som et terapeutika for IL-17-assosierte syk-

dommer og lidelser, dvs. tilstander, sykdommer eller lidelser som har fordel av å hemme en IL-17-biologisk aktivitet.

Den antigene IL-17-epitopen som antistoffene ifølge oppfinnelsen binder til er en ikke-lineær epitop som omfatter aminosyrene ADGNVDYHMN (SEK ID nr. 275), mer bestemt aminosyrene DGNVDYH (SEK ID nr. 276) i humant IL-17. Antistoffer som binder nevnte epitop, binder spesifikt og helst IL-17 og synomolg ape IL-17 sammenlignet med deres binding til muse IL-17 eller rotte IL-17. De monoklonale antistoffene ifølge oppfinnelsen binder humant IL-17 minst 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 eller 100 ganger sterkere (f.eks. med større affinitet eller større spesifisitet) enn de binder til muse-IL-17 eller rotte-IL-17; mer ønskelig minst 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 eller 600 ganger høyere enn de binder til muse-IL-17 eller rotte-IL-17 enda mer ønskelig forbinder de ikke muse-IL-17 og rotte-IL-17 ved nivåer som er større enn bakgrunnsnivåene som bestemmes, f.eks. ved ELISA-analyse, konkurranse-ELISA-analyse eller K_D -verdier i en BIACORE- eller KINEXA-analyse.

I en foretrukket utførelsesform, så tilveiebringer oppfinnelsen et anti-IL-17-monoklonalt antistoff som innehar en sterk bindingsaffinitet for human IL-17, dvs. binder humant IL-17 eller en del av det som omfatter DGNVDYH (SEK ID nr. 276) [dvs. antistoff kontakter DGNVDYH (SEK ID nr. 276) polypeptidet], med en bindingsaffinitet (K_D) for humant IL-17 som er mindre enn ca. 7 pM, 6,5 pM eller 6 pM, helst mindre enn ca. 5,5 pM, 5 pM eller 4,5 pM og mest ønskelig mindre enn ca. 4 pM. Alternativt, er antistoffene ifølge oppfinnelsen karakterisert ved en K_D for humant IL-17 som ikke er større enn ca. 7 pM, 6,5 pM eller 6 pM, ønskelig ikke større enn ca. 5,5 pM, 5 pM eller 4,5 pM og mest ønskelig ikke større enn 4 pM. Antistoffaffiniteter kan bestemmes som beskrevet i eksemplene her under eller andre fremgangsmåter som er tilgjengelige i fagfeltet. Helst binder anti-IL-17-antistoffene ifølge oppfinnelsen som innehar en sterk bindingsaffinitet som beskrevet over også en ikke-lineær humant IL-17-epitop som omfatter aminosyrer ADGNVDYHMN (SEK ID nr. 275), mer ønskelig aminosyrer DGNVDYH (SEK ID nr. 276), hvor antistoffer kontakter polypeptidet DGNVDYH (SEK ID nr. 276).

I en utførelsesform, har antistoffene ifølge oppfinnelsen en av-hastighet (k_{av}) for humant IL-17 som er mindre enn 5×10^{-5} , 4×10^{-5} , 3×10^{-5} eller $2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. I en foretrukket utførelsesform, har antistoffene ifølge oppfinnelsen som er karakterisert ved å inneha en sterk bindingsaffinitet for humant IL-17 som beskrevet over (K_D mindre enn ca. 7 pM eller 6 pM, helst mindre enn ca. 5 pM eller 4,5 pM og mest ønskelig mindre enn ca. 4

pM) også en av-hastighet (k_{av}) for humant IL-17 som er mindre enn 5×10^{-5} , 4×10^{-5} , 3×10^{-5} eller $2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ og til og med ønskelig også binder en ikke-lineær human IL-17-epitop som omfatter aminosyrene ADGNVDYHMN (SEK ID nr. 275), mer ønskelig aminosyrer DGNVDYH (SEK ID nr. 276) i humant IL-17.

5

I en annen utførelsesform har antistoffene ifølge oppfinnelsen en IC_{50} som er mindre enn 1 nM, 900 pM, 800 pM, 700 pM, 600 pM, 560 pM, 550 pM eller 500 pM i f.eks. en in vitro IL-8-reporteranalyse eller mindre enn ca. 560 pM i en $GRO\alpha$ -reporteranalyse (se eksempel 6). I en foretrukket utførelsesform, blir antistoffene ifølge oppfinnelsen karakterisert ved å inneha en sterk bindingsaffinitet for humant IL-17 som beskrevet over (K_D mindre enn ca. 7 pM eller 6 pM, helst mindre enn ca. 5 pM eller 4,5 pM og mer ønskelig mindre enn ca. 4 pM) og har også en IC_{50} som er mindre enn 1 nM, 900 pM, 800 pM, 700 pM, 650 pM, 600 pM, 560 pM, 500 pM eller 500 pM i f.eks. en in vitro IL-8-reporteranalyse eller mindre enn ca. 560 pM i en $GRO\alpha$ -reporteranalyse og enda mer ønskelig også har en av-hastighet (k_{av}) for humant IL-17 som er mindre enn 5×10^{-5} , 4×10^{-5} , 3×10^{-5} eller $2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ og enda mer ønskelig også binder en ikke-lineær human IL-17-epitop som omfatter aminosyrer GDNVDYH (SEK ID nr. 276) av humant IL-17 hvor antistoffet kontakter GDNVDYH (SEK ID nr. 276) polypeptidet.

Den mest foretrukne utførelsesformen av oppfinnelsen er et anti-IL-17-antistoff som omfatter en lett kjedeaminosyresekvens som består av SEK ID nr. 279 og en tung kjedeaminosyresekvens som består av SEK ID nr. 280. Helst omfatter dette antistoff to identiske lette kjeder og to identiske tunge kjeder. Helst blir den lette kjeden med aminosyresekvens som vist i SEK ID nr. 279 kodet for av en nukleinsyre som omfatter sekvensen vist i SEK ID nr. 281 (som inkluderer signalsekvens) eller SEK ID nr. 283 (uten signalsekvensen). Helst blir den tunge kjeden med aminosyresekvens som vist i SEK ID nr. 280 kodet for av en nukleinsyre som omfatter sekvensen vist i SEK ID nr. 282 (som inkluderer signalsekvensen) eller SEK ID nr. 284 (uten signalsekvensen).

Monoklonale antistoffer ("mAb'er") kan lages ved å anvende hybridomafremgangsmåten som er kjent i fagfeltet (se f.eks. Kohler et al., *Nature*, 256:495, 1975) eller de kan lages ved hjelp av rekombinante DNA-fremgangsmåter (f.eks. som i U.S. patent nr. 4,816,567). Generelt kan en hybridoma produseres ved å fusere en passende udødelig cellelinje (f.eks. en myelomacellelinje slik som SP2/0) med antistoffproduserende celler fra det immuniserte dyret. Den antistoffproduserende cellen, spesielt de fra milt eller lymfeknuter, skaffes tilveie fra dyr som er immunisert med antigenet av interesse. De

35

fuserte cellene (hybridomaene) kan isoleres ved å anvende selektive dyrkningsbetingelser og klones ved begrenset fortynning. Dyrkningsmedium hvor hybridomaceller dyrkes undersøkes for produksjon av monoklonale antistoffer direkte mot antigenet. Helst blir bindingsspesifisiteten til mAb'ene produsert av hybridomacellene bestemt ved immunpresipitering eller ved en in vitro bindingsanalyse slik som radioimmunanalyse eller ELISA. Celler som produserer antistoffer med de ønskede bindingsegenskapene kan selekteres med en passende analyse. Fremgangsmåter for slik isolering og screening er velkjente i fagfeltet.

Andre passende fremgangsmåter for å produsere eller å isolere antistoffer ifølge oppfinnelsen, som inkluderer humane eller artifiiselle antistoffer, kan anvendes inkludert f.eks. fremgangsmåter som selekterer et rekombinant antistoff (f.eks. enkelkjede Fv eller Fab) fra et bibliotek, eller som baserer seg på immunisering av transgene dyr (f.eks. mus) som er i stand til å produsere et repertoar av humane antistoffer (se f.eks. Jakobovits et al., *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551-2555, 1993; Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258, 1993; U.S. patent nr. 5,548,806 og 5,545,807).

Enkelkjedeantistoffer og kimære, humaniserte eller primatiserte (CDR-tilførte) antistoffer, så vel som kimære eller CDR-tilførte enkelkjedeantistoffer og lignende, som omfatter deler utledet fra forskjellige arter, er også omfattet av den foreliggende oppfinnelsen og uttrykket "antistoff". De forskjellige delene til disse antistoffer kan kobles sammen kjemisk ved konvensjonelle teknikker, syntetisk eller de kan lages som et sammenhengende protein ved å anvende genetiske konstruksjonsteknikker. For eksempel kan nukleinsyrer som koder for en kimær eller humanisert kjede uttrykkes slik at det produserer et sammenhengende protein. Se f.eks. U.S. patent nr. 4,816,56; europeisk patent nr. 125,02 B1; U.S. patent nr. 4,816,397; europeisk patent nr. 120,694 B1; WO 86/01533; europeisk patent nr. 194,276 B1; U.S. patent nr. 5,225,539; europeisk patent nr. 2398,400 B1 og U.S. patent nr. 5,585,089 og 5,698,762.

I tillegg kan funksjonelle fragmenter av antistoffer (dvs. antigenbindende fragmenter), som inkluderer fragmenter av kimære, humaniserte, primatiserte eller enkelkjedeantistoffer også produseres og faller innenfor omfanget av oppfinnelsen. Foretrukne funksjonelle fragmenter bevarer en antigenbindende funksjon av et korresponderende fullengdeantistoff. Bestemte foretrukne funksjonelle fragmenter bevarer evnen til å hemme en eller flere funksjoner eller bioaktivitetskarakteristika til et pattedyr modent IL-17, helst humant IL-17, slik som en bindingsaktivitet, en signalleringsaktivitet

og/eller stimulering eller hemming av en cellulær respons. I en utførelsesform, kan f.eks. et funksjonelt fragment hemme interaksjonen av modent IL-17 med dets reseptor og/eller så kan den hemme en eller flere reseptorstyrte funksjoner.

5 Antistoffdelene som er i stand til å binde humant IL-17 inkluderer, men er ikke begrenset til, Fv-, Fab-, Fab'- og F(ab')₂-fragmenter og omfattes av oppfinnelsen. Slike fragmenter kan produseres ved enzymatisk kløyving eller ved hjelp av rekombinante teknikker. For eksempel, kan papain- eller pepsinkløyving av et intakt antistoff genereres i hhv. Fab- eller F(ab')₂-fragmenter. Papainkløyving av antistoffer produserer to identiske an-
10 tigenbindende fragmenter, kalt "Fab"-fragmenter, hver med et enkelt antigenbindende sete. Fab-fragmentet inneholder også det konstante domenet til den lette kjeden og det første konstante domenet (CH1) til den tunge kjeden. Pepsinbehandling gir et F(ab')₂-fragment som har to antigenkombinerende seter og som fremdeles er i stand til å krysskoble antigen.

15 "Fv" er det minimale antistofffragmentet som inneholder et fullstendig antigengjenkjennings- og bindingssete. Denne regionen består av en dimer av et tungt og et lett kjedevariabelt domene i tett, ikke-kovalent assosiasjon. Det er i denne konfigurasjon at de tre CDR'ene av hvert variabelt domene interagerer for å definere et antigenbindende sete
20 på overflaten av V_H-V_L-dimeren. Kollektivt utgjør de seks CDR'ene antigenbindingsspesifisiteten til antistoffet. For å overvinne tendensen av ikke-kovalent koblede HCVR- og LCVR-domener i Fv har til å dissosiere når de uttrykkes samtidig i en vertscelle, så kan et enkeltkjede Fv-fragment (scFv) konstrueres hvor et fleksibelt og adekvat langt polypeptid kobler enten den C-terminale enden til HCVR til den N-terminale enden til
25 LCVR eller den C-terminale enden til LCVR til den N-terminale til HCVR. En vanlig anvendt linker er et 15-rest (Gly₄Ser)₃-peptid. For en oversikt over sFv, se Pluckthun i *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, bind 113, Rosenberg og Moore red., Springer-Verlag, New York, side 269-315 (1994). Antistoffer kan også produseres i en rekke avkortede former ved å anvende antistoffgener hvor et eller flere stoppkodon er
30 blitt introdusert oppstrøms for det naturlige stoppsetet. For eksempel kan et kimært gen som koder for en F(ab')₂-tungkjededel designes slik at det inkluderer DNA-sekvenser som koder for CH₁-domenet og hengselregionen til den tunge kjeden.

Seleksjon av antistofffragmenter fra biblioteker ved å anvende anrikningsteknologier slik
35 som fagdisplay (DJ. Matthews og JA. Wells, *Science*, 260:1113-7, 1993), ribosomdisplay (Hanes et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 95:14130-5, 1998), bakteriedisplay (P.

Samuelson et al., *Journal of Biotechnology* 96:129-54, 2002) eller gjærdisplay (M.C. Kieke et al., *Protein Engineering*, 10:1303-10, 1997) har vist seg å være vellykkede alternativer til klassiske hybridomateknikker (Oversikt: M. Little et al., *Immunology Today*, 21:364-70, 2000).

5

Variantantistoffer

Et musemonoklonalt antistoff eller et humant antistoff (produsert f.eks. i en transgen mus) laget mot IL-17 kan være et foreldreantistoff. Et foreldreantistoff kan videre for-
andres for å lage en kimær eller humanisert form av antistoff eller en annen variantform
10 av antistoffet ved å anvende fremgangsmåter som er tilgjengelige i fagfeltet, f.eks. PCR-
mutagenese. Slike kimære, humaniserte eller på annen måte variantantistoffer, kan tjene
som foreldreantistoffer for videre variasjon eller mutagenese. Foreldreantistoffer ifølge
oppfinnelsen kan være mutageniserte, f.eks. innen CDR-domenet eller domeneene (se
f.eks. tabell 2 og 3) for å lage variantantistoffer som kan screenes for tilstedeværelsen av
15 en egenskap av interesse, f.eks. bindingsaffinitet (lavere K_D), IC_{50} , spesifisitet, foretruk-
ket binding osv. Helst er egenskapen av interesse i variantantistoffet en forbedring i
forhold til egenskapen i foreldreantistoffet. Et aminosyresubstitusjonsvariantantistoff er
foretrukket og har fått minst 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 eller 10 aminosyrerester i foreldrean-
tistoffmolekylet fjernet og en forskjellig rest satt inn istedenfor. Stedet som har størst
20 interesse for substitusjonell mutagenese er en eller flere CDR-regioner, men FR-
forandringer overveies også. Konservative aminosyresubstitusjoner er foretrukket; selv
om for mer vesentlige forandringer, så kan ikke-konservative aminosyreforandringer
introduseres og de resulterende antistoffene screenes for egenskapen av interesse.

25 En passende måte å generere substitusjonsvarianter av et foreldreantistoff er affinitets-
modning ved å anvende fagdisplay. I korthet så blir et polynukleotidmolekyl som koder
for et foreldreantistoff mutert innen en eller flere CDR-regioner for å generere alle mu-
lige aminosyresubstitusjoner ved hver aminosyrerest hvor en substitusjon er ønsket. An-
tistoffvariantene som dermed genereres vises på en monovalent måte fra filamentøse
30 fagpartikler som fusjoner til gen III-produktet til M13 pakket innen hver partikkel. De
fagfremviste variantantistoffene blir så screenet for deres biologiske aktivitet (f.eks.
bindingsaffinitet, spesifisitet, IC_{50}). For å identifisere kandidat-CDR-regionsetter for
modifikasjon, så kan alaninscanningmutagener utføres for å identifisere CDR-
regionrester som bidrar signifikant til antigenbinding.

35

Alternativt, eller i tillegg, kan det være fordelaktig å analysere en krystallstruktur av antigenantistoffkomplekset for å identifisere kontaktpunkter mellom antistoffet og IL-17. Slike kontaktrester og naborester er kandidater for substitusjon i henhold til teknikkene som er utdypet her eller kjent i fagfeltet. Alternativt, eller i tillegg, kan tilfeldig mutagenese eller punktmutagenese utføres, på et eller flere polynukleotider som koder for minst en CDR. Mutagenesen kan utføres ved en eller flere posisjoner, enten mens CDR er operativt koblet til leserammeregionen innen den variable regionen eller mens CDR'en er uavhengig av annen variabel regionsekvens og deretter returneres det forandrede CDR til den variable regionen ved å anvende rekombinant DNA-teknologi. Med en gang slike variantantistoffer genereres, blir panelet med varianter utsatt for screening for en egenskap eller aktivitet av interesse og antistoffet med overlegne egenskaper i en eller flere relevante analyser kan selekteres for videre utvikling.

En hver cysteinrest som ikke er involvert i å opprettholde den passende konformasjonen til et anti-IL-17-antistoff ifølge oppfinnelsen kan substitueres, generelt med serin, for å forbedre den oksidative stabiliteten til molekylet og å forhindre avvikende krysskobling. Omvendt, kan cysteinbinding eller bindinger tilsettes til antistoffet for å forbedre dets stabilitet (spesielt der hvor antistoffet er et antistofffragment slik som et Fv-fragment). En annen type aminosyrevariant av antistoffet forandrer det opprinnelige glykosyleringsmønsteret til antistoffet. Ved å forandre menes å slette en eller flere karbohydratdelar som finnes i antistoffet og/eller å tilsette et eller flere glykosyleringssteder som ikke er tilstede i foreldreantistoffet. Glykosylering av antistoffene er vanligvis enten N-koblede eller O-koblede. N-koblede refererer til festingen av karbohydratdelen til sidekjeden i en asparaginrest. Tripeptidsekvensene asparagin-X-serin og asparagin-X-treonin, hvor X er en hver aminosyre untatt prolin, er gjenkjenningssekvensene for enzymatisk festing av karbohydratdelen til asparaginsidekjeden. Dermed danner tilstedeværelsen av enhver av disse tripeptidsekvenser i et polypeptid et potensielt glykosyleringssete. O-koblet glykosylering refererer til festingen av et av sukkerne N-aceylgalaktosamin, galaktose, eller xylose til en hydroksyaminosyre, mest vanlig serin eller treonin, selv om 5-hydroksyprolin eller 5-hydroksylysin også kan anvendes.

Tilsetning av glykosyleringssteder til antistoffet blir på en lett måte utført ved å forandre aminosyresekvensen slik at den inneholder en eller flere av de ovenfor beskrevne tripeptidsekvensene (for N-koblede glykosyleringssteder). Forandringen kan også gjøres ved tilsetningen av eller substitusjonen ved en eller flere serin- eller treoninrester til sekvensen i det opprinnelige antistoffet (for O-koblede glykosyleringssteder).

Sekvens

- Et foretrukket monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen omfatter en LCVR som omfatter et peptid med en sekvens valgt fra gruppen som består av SEK ID nr. 178-243
- 5 og/eller en HCVR som omfatter et peptid med en sekvens valgt fra gruppen som består av SEK ID nr. 56-121. I en foretrukket utførelsesform, omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen en LCVR som omfatter et peptid med en sekvens valgt fra gruppen som består av SEK ID nr. 178-243 og som videre omfatter en HCVR som omfatter et peptid med en sekvens valgt fra gruppen som består av SEK ID nr. 56-121, hvor HCVR og LCVR
- 10 tilstede i et antistoff ifølge oppfinnelsen eksisterer sammen i en Fab opplistet i tabell 1. For eksempel omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen som omfatter et LCVR-polypeptid med en aminosyresekvens i SEK ID nr. 178, helst videre et HCVR-polypeptid som omfatter en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEK ID nr. 56, 60, 68-93 og 95. Videre, omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen som omfatter et
- 15 LCVR-polypeptid med en aminosyresekvens i SEK ID nr. 241 helst videre et HCVR-polypeptid som omfatter en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEK ID nr. 118 og 106. En fagperson vil forstå at antistoffene ifølge oppfinnelsen ikke er begrenset til de spesifikke sekvensene til HCVR og LCVR som er opplistet i tabell 1 her, men også inkluderer varianter av disse sekvenser som, når de er tilstede i et anti-IL-17-
- 20 antistoff ifølge oppfinnelsen, bevarer eller forbedrer antigenbindingsevne og minst en annen funksjonell egenskap til foreldreantistoffet, f.eks. epitopspesifisitet, evnen til å konkurrere med foreldreantistoffet for binding til IL-17, IC_{50} og/eller K_D eller k_{av} -verdier for binding av humant IL-17.
- 25 Videre er et monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen et som kompetitivt blir hemmet fra å binde humant IL-17 (eller en del av det som omfatter DGNVDYH (SEK ID nr. 276)) ved et konkurrerende monoklonalt antistoff hvor det konkurrerende monoklonale antistoffet omfatter to polypeptider med aminosyresekvensene vist i SEK ID nr. 241 (LCVR) og 118 (HCVR). Slik konkurrerende hemming mellom antistoffer kan måles
- 30 ved analyser i fagfeltet, f.eks. en konkurranse-ELISA-analyse.

- Helst blir et antistoff ifølge oppfinnelsen som konkurrerer med det konkurrerende antistoffet definert over videre karakterisert ved spesifikt å binde humant IL-17 men ikke binde humant IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E eller IL-17F. I tillegg blir antistoffet
- 35 videre karakterisert ved spesifikt å binde humant IL-17 og synomolg ape IL-17 men ikke å binde rotte-IL-17 eller muse-IL-17 ved nivåer som er høyere enn bakgrunn.

Mer ønskelig, blir et antistoff ifølge oppfinnelsen som konkurrerer for binding til humant IL-17 med et konkurrerende antistoff som omfatter aminosyresekvensene vist i SEK ID nr. 241 og 118 videre karakterisert ved å binde en human IL-17 ikke-lineær epitop som omfatter aminosyrer DGNVDYH (SEK ID nr. 276). Enda mer ønskelig, blir et antistoff ifølge oppfinnelsen som konkurrerer for binding til humant IL-17 med et konkurrerende antistoff som omfatter aminosyresekvenser vist i SEK ID nr. 241 og 118 videre karakterisert ved å ha en K_D for humant IL-17 som er mindre enn ca. 7 pM, 6,5 pM eller 6 pM, helst mindre enn ca. 5,5 pM, 5 pM eller 4,5 pM og mer ønskelig mindre enn ca. 4 pM og/eller som er karakterisert ved en IC_{50} , helst i en in vitro IL-8-reporteranalyse som er mindre enn 700 pM, 650 pM, 600 pM, 560 pM, 550 pM eller 500 pM, eller ved en IC_{50} i en in vitro $GRO\alpha$ -reporteranalyse som er mindre enn ca. 560 pM, og/eller som har en avhastighet (k_{av}) for humant IL-17 som er mindre enn 5×10^{-5} , 4×10^{-5} , 3×10^{-5} eller $2 \times 10^{-5} s^{-1}$.

I en utførelsesform, har et anti-IL-17-antistoff ifølge oppfinnelsen en tung kjedevariabel region og en lett kjedevariabel region hvor den tung kjedevariable regionen omfatter CDR-regioner med de følgende aminosyresekvensene: CDRH1 (SEK ID nr. 244), CDRH2 (SEK ID nr. 245) og CDRH3 (SEK ID nr. 246), og/eller hvor den lette kjedevariable regionen omfatter CDR-regioner med de følgende aminosyresekvensene: CDRL1 (SEK ID nr. 247), CDRL2 (SEK ID nr. 248) og CDRL3 (SEK ID nr. 249). Helst eksisterer de seks CDR'ene til et antistoff ifølge oppfinnelsen sammen som i en Fab opplistet i tabell 1 her. Enda mer ønskelig, er de tung kjede-CDR'ene i sammenhengen med de følgende leserammesekvensene: FR1 med SEK ID nr. 262, FR2 med SEK ID nr. 263, FR3 med SEK ID nr. 264 og FR4 med SEK ID nr. 265 og de lett kjede-CDR'ene er i sammenhengen med de følgende leserammesekvensene: FR1 med SEK ID nr. 266, FR2 med SEK ID nr. 267, FR3 med SEK ID nr. 268 og FR4 med SEK ID nr. 269, hvor rekkefølgen fra den aminoterminalen enden er FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

Det blir videre overveid at et anti-IL-17-antistoff ifølge oppfinnelsen omfatter en HCVR som omfatter en CDRH1 som omfatter en sekvens valgt fra gruppen som består av SEK ID nr. 11-28 og/eller en CDRH2 som omfatter en sekvens valgt fra gruppen som består av SEK ID nr. 29-32 og/eller en CDRH3 som omfatter en sekvens valgt fra gruppen som består av SEK ID nr. 33-55 og 261. I en annen utførelsesform, omfatter et anti-IL-17-antistoff ifølge oppfinnelsen en LCVR som omfatter en CDRL1 som omfatter en

sekvens valgt fra gruppen som består av SEK ID nr. 122-149, og/eller en CDRL1 som omfatter en sekvens valgt fra gruppen som består av SEK ID nr. 150-167, og/eller en CDRL3 som omfatter en sekvens valgt fra gruppen som består av SEK ID nr. 168-177. I en foretrukket utførelsesform omfatter et anti-IL-17-antistoff ifølge oppfinnelsen en

5 HCVR som omfatter en CDRH1 som omfatter en sekvens valgt fra gruppen som består av SEK ID nr. 11-28 og/eller en CDRH2 som omfatter en sekvens valgt fra gruppen som består av SEK ID nr. 29-32, og/eller en CDRH3 som omfatter en sekvens valgt fra gruppen som består av SEK ID nr. 33-55 og 261, og som videre omfatter en LCVR som omfatter en CDRL1 som omfatter en sekvens valgt fra gruppen som består av SEK ID

10 nr. 122-149, og/eller en CDRL2 som omfatter en sekvens valgt fra gruppen som består av SEK ID nr. 150-167, og/eller en CDRL3 som omfatter en sekvens valgt fra gruppen som består av SEK ID nr. 168-177.

Sammensetningen som omfatter en CDR ifølge oppfinnelsen vil generelt være en anti-

15 stoff tung eller lett kjedesequens eller en vesentlig del av den, hvor CDR'en er lokalisert ved en lokalisasjon som er i overensstemmelse med Kabat-nummerering. De tre CDR-regionene for hver kjede, tung og lett, blir tilveiebragt i en leserammeregion som en etterfølgende sekvens representert ved den følgende formelen: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. De tung kjede og lett kjede FR1, FR2, FR3 og FR4 kombinerer slik at

20 de danner den fullstendige leserammeregionen til et antistoff når de arrangeres som en etterfølgende sekvens med CDR'ene i den rekkefølgen som blir nevnt. Helst er leserammeregionene til et antistoff ifølge oppfinnelsen av human opprinnelse eller vesentlig av human opprinnelse (dvs. mer enn ca. 80, 82, 85, 87, 90, 92, 95, 97%).

25 I et humanisert antistoff for terapeutisk anvendelse hos mennesker, så er leserammesequensen helst fullstendig eller vesentlig av human opprinnelse. Helst omfatter den lett kjedesequeregionen til et humanisert, humant eller kimært antistoff ifølge oppfinnelsen FR1 med SEK ID nr. 266, FR2 med SEK ID nr. 267, FR3 med SEK ID nr. 268 og FR4 med SEK ID nr. 269. Helst omfatter den tung kjede leserammeregionen til et

30 humanisert, humant eller kimært antistoff ifølge oppfinnelsen FR1 med SEK ID nr. 262, FR2 med SEK ID nr. 263, FR3 med SEK ID nr. 264 og FR4 med SEK ID nr. 265. For eksempel, så omfatter en foretrukket utførelsesform av LCVR av antistoff 126 ifølge oppfinnelsen, som beskrevet i tabellene 1, 2 og 3 her (polypeptider i rekkefølge fra N-terminal ende) FR1 med SEK ID nr. 266, CDR1 med SEK ID nr. 131, FR2 med SEK

35 ID nr. 267, CDR2 med SEK ID nr. 167, FR3 med SEK ID nr. 168, CDR3 med SEK ID nr. 168 og FR4 med SEK ID nr. 269. Hele LCVR-sekvensen, operativt koblet til en hu-

man κ -konstant region er som vist i SEK ID nr. 274. Videre omfatter en foretrukket utførelsesform av HCVR av antistoff 126 ifølge oppfinnelsen (i rekkefølge fra den N-terminale enden) FR1 med SEK ID nr. 262, CDR1 med SEK ID nr. 26, FR2 med SEK ID nr. 262, CDR2 med SEK ID nr. 30, FR3 med SEK ID nr. 264, CDR3 med SEK ID
 5 nr. 52 og FR4 med SEK ID nr. 265. Hele HCVR-sekvensen, operativt koblet til en human IgG₄ Fc-region er som vist i SEK ID nr. 273.

I en utførelsesform, blir et anti-IL-17-antistoff ifølge oppfinnelsen hvor hele eller en del av den variable regionen er begrenset av en bestemt sekvens som vist i SEK ID nr. her
 10 (se f.eks. tabellene 1-3) videre karakterisert ved å være et kimært, humanisert eller fullstendig humant antistoff eller antigenbindende del av det som antagoniserer eller nøytraliseres minst en human IL-17-aktivitet in vivo eller in vitro. Et IL-17-antistoff ifølge oppfinnelsen hvor hele eller en del av den variable regionen er begrenset av en bestemt sekvens som vist i SEK ID nr. her er videre karakterisert ved spesifikt å binde humant IL-
 15 17, men ikke å binde humant IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E eller IL-17F. I tillegg er antistoffet videre karakterisert ved spesifikt å binde humant IL-17 og synomolg ape IL-17, men ikke å binde rotte IL-17 eller muse IL-17 ved høyere nivåer enn bakgrunn.

Mer ønskelig, er et slikt antistoff videre karakterisert ved å binde en human IL-17 ikke-lineær epitop som omfatter aminosyrer DGNVDYH (SEK ID nr. 276) hvor antistoffet tar kontakt med polypeptidet med SEK ID nr. 276. Enda mer ønskelig er slikt antistoff videre karakterisert ved å ha en K_D for human IL-17 som er mindre enn ca. 7 pM, 6,5 pM eller 6 pM, helst mindre enn ca. 5,5 pM, 5 pM eller 4,5 pM og mer ønskelig mindre enn ca. 4 pM og/eller er karakterisert ved en IC_{50} , helst i en in vitro IL-8-reporteranalyse
 20 som er mindre enn 700 pM, 650 pM, 600 pM, 560 pM, 550 pM eller 500 pM, eller en IC_{50} i en in vitro GRO α -reporteranalyse som er mindre enn ca. 560 pM og/eller har en avhastighet (k_{av}) for humant IL-17 som er mindre enn 5×10^{-5} , 4×10^{-5} , 3×10^{-5} eller $2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.

30 Antistoffekspressjon

Den foreliggende oppfinnelsen vedrører også cellelinjer som uttrykker et anti-IL-17 monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen eller en del av det. Dannelse og isolering av cellelinjer som produserer et monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen kan utføres ved å anvende standard teknikker kjent i fagfeltet. Foretrukne cellelinjer inkluderer COS,
 35 CHO, SP2/0, NS0 og gjær (tilgjengelig fra offentlige oppbevaringssteder slik som ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA).

En rekke vertsekspresjonssystemer kan anvendes for å uttrykke et antistoff i den foreliggende oppfinnelsen inkludert prokaryote og eukaryote ekspresjonssystemer (slik som gjær, bakulovirus, plante, pattedyr og andre dyreceller, transgene dyr og hybridomaceller), så vel som fagdisplayekspresjonssystemer. Et eksempel på en passende bakteriell ekspresjonsvektor er pUC119 og en passende eukaryot ekspresjonsvektor er en modifisert pcDNA3.1-vektor med et svekket *dhfr*-seleksjonssystem. Andre antistoffekspresjonssystemer og også kjent i fagfeltet og blir overveid her.

Et antistoff ifølge oppfinnelsen kan lages ved rekombinant ekspresjon av immunglobulin lette og tunge kjedegener i en vertscelle. For å uttrykke et antistoff rekombinant, så blir en vertscelle transformert, transdusert, infisert eller lignende med en eller flere rekombinante ekspresjonsvektorer som bærer DNA-fragmenter som koder for de immunglobulin lette og/eller tunge kjedene til antistoffet slik at de lette og/eller tunge kjedene uttrykkes i vertscellen. Den tunge kjeden og den lette kjeden kan uttrykkes uavhengig av forskjellige promotere som de er operativt koblet til i en vektor, eller alternativt, så kan den tunge kjeden og den lette kjeden uttrykkes uavhengig fra forskjellige promotere som de er operativt koblet til i to vektorer - en som uttrykker den tunge kjeden og en som uttrykker den lette kjeden. Valgfritt kan den tunge kjeden og den lette kjeden uttrykkes i forskjellige vertsceller. Helst blir de rekombinante antistoffene utskilt inn i mediet som vertscellene dyrkes i og deretter blir antistoffene gjenvunnet eller rensset fra dette. Standard rekombinante DNA-metodologier blir anvendt for å skaffe tilveie antistoff tunge og lette kjedegener, inkorporere disse gener inn i rekombinante ekspresjonsvektorer og å introdusere vektorene inn i vertsceller. Slike standard rekombinante DNA-teknologier er f.eks. beskrevet i Sambrook, Fritsch og Maniatis (red.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, andre utgave, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Ausubel et al. (red.), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, 1989.

Et isolert DNA som koder for en HCVR-region kan omdannes til et fullengde tung kjedegen ved å operativt å koble det HCVR-kodende DNA'et til et annet DNA-molekyler som koder for tung kjedekonstante regioner (CH1, CH2 og CH3). Sekvensene til humane tung kjedekonstantregiongener er kjent i fagfeltet. Se f.eks. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, femte utgave, U.S. Department of Health and Human Services, NIH publikasjon nr. 91-3242 (1991). DNA-fragmenter som omfatter disse regioner kan skaffes tilveie f.eks. ved standard PCR-oppformering. Den tung kjedekonstante regionen kan være av en hver type (f.eks. IgG, IgA, IgE, IgM eller IgD), klas-

se (f.eks. IgG₁, IgG₂, IgG₃ og IgG₄) eller subklassekonstant region eller enhver allotypisk variant av dem som beskrevet i Kabat (*supra*). Alternativt, kan den antigenbindende delen være et Fab-fragment, et Fab'-fragment, F(ab')₂-fragment, Fd- eller enkelt kjede Fv-fragment (scFv). For et Fab-fragment tung kjedegen, kan det HCVR-kodende DNA'et være operativt koblet til et annet DNA-molekyl som kun koder for en tung kjede CH1-konstant region.

Et isolert DNA som koder for en LCVR-region kan omdannes til et fullengde lett kjedegen (så vel som til et Fab lett kjedegen) ved operativt koble det LCVR-kodende DNA'et til et annet DNA-molekyl som koder for en lett kjede konstantregion, CL. Sekvensene til humane lett kjede konstantregioner er kjent i fagfeltet. Se f.eks. Kabat, *supra*. DNA-fragmenter som omfatter disse regioner kan skaffes tilveie ved hjelp av standard PCR-opppormering. Den lett kjedekonstante regionen kan være en κ - eller λ -konstant region.

For å danne et scFv-gen, så blir HCVR- og LCVR-kodende DNA-fragmenter operativt koblet til et annet fragment som koder for en fleksibel linker, f.eks. som koder for aminosyresekvensen (Gly₄-Ser)₃, slik at HCVR- og LCVR-sekvensene kan uttrykkes som et sammenhengende enkeltkjedeprotein med LCVR- og HCVR-regioner koblet med den fleksible linker. Se f.eks. Bird et al., *Science*, 242:423-6, 1988; Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-83; 1988; McCafferty et al., *Nature* 348:552-4, 1990.

I en utførelsesform, tilveiebringer oppfinnelsen en vector, helst (men ikke begrenset til) et plasmid, en recombinant ekspresjonsvektor, en gjærekspresjonsvektor eller en retroviralekspresjonsvektor som omfatter et polynukleotid som koder for et anti-IL-17 monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen. Alternativt, omfatter en vektor ifølge oppfinnelsen et polynukleotid som koder for en LCVR og/eller et polynukleotid som koder for en HCVR ifølge oppfinnelsen. Når både en LCVR- og en HCVR-kodende sekvens er tilstede i den samme vektoren, kan de transkriberes uavhengig, hver fra en separat promoter som de er operativt koblet til. Hvis sekvensene som koder for LCVR og HCVR er tilstede i den samme vektoren og transkriberes fra en promoter som de begge er operativt koblet til, kan LCVR være 5' for HCVR eller så kan LCVR være 3' for HCVR, videre kan den LCVR- og den HCVR-kodende regionen i vektoren være separert med en linkersekvens av en hver størrelse eller innhold, helst er en slik linker, når den er tilstede, et polynukleotid som koder for et internt ribosominngangssted.

For uttrykke et antistoff ifølge oppfinnelsen, blir et DNA som koder for en delvis eller fullengde lett og/eller tung kjede, skaffet tilveie som beskrevet over, innsatt i en ekspresjonsvektor slik at genet er operativt koblet til transkripsjonelle og translasjonelle kontrollsekvenser. Ekspresjonsvektoren og ekspresjonskontrollsekvensene er valgt slik at de er kompatible med ekspresjonsvertscellen som anvendes. Antistoff lett kjedegenet og antistoff tung kjedegenet kan settes inn i separate vektorer, eller mer vanlig, så blir begge gener satt inn i den samme ekspresjonsvektoren. Antistoffgenene settes inn i ekspresjonsvektoren ved hjelp av standard fremgangsmåter. I tillegg kan den rekombinante ekspresjonsvektoren kode for et signalpeptid som fasiliterer utskillelse av den anti-IL-17 monoklonale antistoff lett og/eller tung kjede fra en vertscelle. Det anti-IL-17 monoklonale antistoff lette og/eller tunge kjedegenet kan klones inn i vektoren, slik at signalpeptidet er operativt koblet i leseramme til den aminoterminalen enden av antistoffkjedegenet. Signalpeptidet kan være et immunglobulinsignalpeptid eller et heterologt signalpeptid.

I tillegg til det antistoff tunge og/eller lett kjedegenet eller genene, så bærer en rekombinant ekspresjonsvektor ifølge oppfinnelsen regulatoriske sekvenser som kontrollerer uttrykket av antistoffkjedegenet eller genene i en vertscelle. Uttrykket "regulatorisk sekvens" er ment å inkludere promotere, forsterker og andre ekspresjonskontrollelementer (f.eks. polyadenyleringssignaler), etter som det er nødvendig, som kontrollerer transkripsjonen eller translasjonen av antistoffkjedegenet eller genene. Designen av ekspresjonsvektoren som inkluderer seleksjonen av regulatoriske sekvenser kan være avhengig av slike faktorer som valget av vertscellen som skal transformeres, nivået av uttrykket av proteinet som er ønsket. Foretrukne regulatoriske sekvenser for pattedyrvertscelleekspresjon inkluderer virale elementer som styrer høye nivåer av proteinekspresjon i pattedyrceller, slik som promotere og/eller forsterker utledet fra cytomegalovirus (CMV), Simian virus 40 (SV40), adenovirus (f.eks. adenovirushovedsene promoteren (AdMLP)) og polyomavirus.

I tillegg til de antistoff tunge og/eller lette kjedegenene og regulatoriske sekvenser, så kan de rekombinante ekspresjonsvektorene ifølge oppfinnelsen bære tilleggssekvenser slik som sekvenser som regulerer repetering av vektoren i vertsceller (f.eks. startsted for replikasjon) og en eller flere selekterbare markørgener. Det selekterbare markørgenet fasiliterer seleksjon av vertsceller som vektoren er blitt introdusert inn i. For eksempel, så er det vanlig at det selekterbare markørgenet gir resistens mot medikamenter, slik som G418, hygromycin eller metotreksat, på en vertscelle som vektoren er blitt introdu-

sert inn i. Foretrukne selekterbare markørgener inkluderer dihydrofolatreduktase (*dhfr*) -genet (for anvendelse i *dhfr*-minus vertsceller med metotreksatseleksjon/oppformering), *neo*-genet (for G418-seleksjon) og glutaminsyntetase (GS) i en GS-negativ cellelinje (slik som NS0) for seleksjon/amplifikasjon.

5

For ekspresjon av de lette og/eller tunge kjedene, blir ekspresjonsvektoren eller vektor-ene som koder for de tunge og/eller lette kjedene introdusert inn i vertsceller ved hjelp av standardteknikker som f.eks. elektroporering, kalsiumfosfatpresipitering, DEAE-dekstrantransfeksjon, transduksjon, infeksjon og lignende. Selv om det er teoretisk mulig å uttrykke antistoffene ifølge oppfinnelsen i enten prokaryote eller eukaryote vertsceller, er eukaryote celler foretrukket, og mest foretrukket er pattedyrvertsceller fordi slike celler mest sannsynlig sammenstiller og utskiller et ordentlig foldet og immunologisk aktivt antistoff. Foretrukne pattedyrvertsceller for å uttrykke de rekombinante antistoffene ifølge oppfinnelsen inkluderer kinesiske hamsterovarie (CHO-celler) [som inkluderer *dhfr* minus CHO-celler, beskrevet i Urlaub og Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-20, 1980, anvendt med en DHFR-selekterbar markør, f.eks. som beskrevet i Kaufman og Sharp, *J. Mol. Biol.* 159:601-21, 1982] NS0-mylomaceller, COS-celler og SP2/0-celler. Når rekombinante ekspresjonsvektorer som koder for antistoffgener blir introdusert inn i pattedyrvertsceller, så blir antistoffene produsert ved å dyrke vertscellene i en tidsperiode som er tilstrekkelig for å tillate uttrykk av antistoffet i vertscellene eller mer ønskelig, utskilling av antistoffet inn i dyrkningsmediet som vertscellene dyrkes i under passende betingelser som er kjent i fagfeltet. Antistoffer kan gjenvinnes fra vertscellen og/eller dyrkningsmediet ved å anvende standard rensefremgangsmåter.

25

Vertsceller kan også anvendes for å produsere deler eller fragmenter av intakte antistoffer, f.eks. Fab-fragmenter eller scFv-molekyler ved hjelp av teknikker som er konvensjonelle. Det vil forstås av en fagperson at variasjoner på den ovenfor nevnte prosedyren er innenfor omfanget av den foreliggende oppfinnelsen. For eksempel kan det være ønskelig å transfektere en vertscelle med DNA som koder for enten den lette kjeden eller den tunge kjeden til et antistoff i denne oppfinnelse. Rekombinant DNA-teknologi kan også anvendes for å fjerne noe eller hele DNA'et som koder for enten den ene eller begge av de tunge og lette kjedene som ikke er nødvendig for binding til IL-17. Molekylene uttrykt for slike avkortede DNA-molekyler er også omfattet av antistoffene ifølge oppfinnelsen.

35

Oppfinnelsen tilveiebringer en vertscelle som omfatter et nukleinsyremolekyl i den foreliggende oppfinnelsen. Helst omfatter en vertscelle ifølge oppfinnelsen en eller flere vektorer eller konstruksjoner som omfatter et nukleinsyremolekyl i den foreliggende oppfinnelsen. Vertscellen ifølge oppfinnelsen er en celle som vektor ifølge oppfinnelsen er blitt introdusert inn i, nevnte vektor omfatter et polynukleotid som koder for en LCVR av et antistoff ifølge oppfinnelsen og/eller et polynukleotid som koder for en HCVR ifølge oppfinnelsen. Oppfinnelsen tilveiebringer også en vertscelle som to vektorer ifølge oppfinnelsen er blitt introdusert inn i; en som omfatter et polynukleotid som koder for et LCVR i et antistoff ifølge oppfinnelsen og en som omfatter et polynukleotid som koder for et HCVR som er tilstede i et antistoff ifølge oppfinnelsen og hver operativt koblet til en promotersekvens. Vertscelletypene inkluderer pattedyr, bakterielle, plante- og gjærceller. Helst er vertscellen en CHO-celle, en COS-celle, en SP2/0-celle, en NS0-celle, en gjærcele eller et derivat eller avkom av enhver foretrukket celletype.

I et foretrukket system for rekombinant uttrykk av et antistoff ifølge oppfinnelsen, så blir en rekombinant ekspresjonsvektor som koder for både antistoff tung kjede og antistoff lett kjede introdusert inn i *dhfr*-minus CHO-celler ved f.eks. kalsiumfosfatstyrt transfeksjon. Innen den rekombinante ekspresjonsvektoren er de antistoff tunge og lette kjedegenene hver operativt koblet til forsterker/promoterregulatoriske elementer (f.eks. utledet fra SV40, CMV, adenovirus og lignende, slik som en CMV-forsterker/AdMLP-promoterregulatorisk element eller en SV40-forsterker/AdMLP-promoterregulatorisk element) for å drive høye nivåer av transkripsjon av genene. Den rekombinante ekspresjonsvektoren bærer også et *dhfr*-gen som tillater seleksjon av CHO-celler som er blitt transfektert med vektoren ved å anvende metotreksatseleksjon/oppformering. De selekterte transformante vertscellene dyrkes for å tillate uttrykk av de antistoff tunge og lette kjedene og intakt antistoff gjenvinnes fra dyrkningsmediet. Standard molekylære biologiske teknikker anvendes for å lage den rekombinante ekspresjonsvektoren, å transfektere vertscellene, selektere for transformanter, dyrke vertscellene og gjenvinne antistoffet fra dyrkningsmediet. Antistoffer, eller antigenbindende deler av dem, ifølge oppfinnelsen kan uttrykkes i det dyr (f.eks. en mus) som er transgen for humane immunglobuliner (se f.eks. Taylor et al., *Nucleic Acids Res.* 20:6287-95, 1992).

Når de er uttrykt, så kan de intakte antistoffene, deres dimerer, individuelle lette og tunge kjeder eller andre immunglobulinformer i den foreliggende oppfinnelsen renses i henhold til standard prosedyrer i fagfeltet, inkludert ammoniumsulfatpresipitering, ionutbytting, affinitet, revers fase, hydrofob interaksjonskolonnekromatografi, gelelek-

troforese og lignende. Vesentlig rene immunglobuliner på minst ca. 90%, 92%, 94% eller 96% homogenitet er foretrukket, og 98 til 99% eller mer homogenitet er mest foretrukket for farmasøytiske anvendelser. Når de er rensset, delvis eller til homogenitet som ønsket, så kan peptidene deretter anvendes terapeutisk eller profylaktisk som styrt her.

5

Kimært antistoff

Som anvendt her, inkluderer uttrykket "kimært antistoff" monovalente, divalente eller polyvalente immunglobuliner. Et monovalent kimært antistoff er en dimer som er dannet av en kimær tung kjede assosiert gjennom disulfidbroer med en kimær lett kjede. Et
10 divalent kimært antistoff er et tetramer dannet av to tungkjede-lettkjededimerer som er assosiert gjennom minst en disulfidbro.

En kimær tung kjede av et antistoff omfatter en antigenbindende region utledet fra den tunge kjeden til et ikke-humant antistoff som er spesifikt for IL-17 som er operativt
15 koblet til minst en del av en human eller vesentlig human (eller arter forskjellig fra det som den antigenbindende regionen ble utledet fra), tung kjedekonstant region slik som CH1 eller CH2, eller helst en fullengde tung kjedekonstant region. En kimær lett kjede til et antistoff for anvendelse i mennesker, omfatter en antigenbindende region utledet fullstendig eller vesentlig fra den lette kjeden til et ikke-humant antistoff som er spesi-
20 fikt for IL-17, operativt koblet til minst en del av en human eller vesentlig human (eller arter forskjellig fra det som den antigenbindende regionen ble utledet fra) lett kjedekonstant region (CL) eller helst en fullengde lett kjedekonstant region. Antistoffer, fragmenter eller derivater som har kimære tunge kjeder og lette kjeder med samme eller forskjellig variabel regionbindingsspesifisitet kan også lages ved passende assosiering
25 av de individuelle polypeptidkjedene i henhold til kjente fremgangsmåter.

Med denne tilnærningsmåten, blir verter som uttrykker kimære tunge kjeder separat dyrket fra verter som uttrykker kimære lette kjeder og immunglobulinkjedene blir separat gjenvunnet og deretter assosiert. Alternativt, kan vertene dyrkes sammen og kjedene
30 for lov til å assosiere spontant i dyrket medie, etterfulgt av gjenkjenning av det sammenstilte immunglobulinet eller fragmentet. Fremgangsmåter for å produsere kimære antistoffer er kjent i fagfeltet (se f.eks. U.S. patent nr. 6,284,471; 5,807,715; 4,816,567 og 4,816,397).

35 Humaniserte antistoffer

Helst så vil et antistoff ifølge oppfinnelsen som skal anvendes for terapeutiske formål ha sekvensen til leserammen og konstantregion (til graden det eksisterer i antistoffet) som er utledet fra pattedyret hvor det ville bli anvendt som et terapeutisk middel for å redusere muligheten for at pattedyret ville fremkalle en immunrespons mot det terapeutiske antistoffet. Humaniserte antistoffer er av spesiell interesse, fordi de betraktes som å
 5 være verdifulle for terapeutisk bruk og unngå den humane anti-muse antistoffresponsen som ofte observeres med gnagerantistoffer. I humaniserte antistoffer så er effektordelen av antistoffet i tillegg av human opprinnelse så det kan interagere bedre med de andre delene til det humane immunsystemet (f.eks. ødelegge målcellene mer effektivt ved
 10 komplementavhengig cytotoksitet eller antistoffavhengig cellulær cytotoksitet). Injisererte humaniserte antistoffer kan også ha en halveringstid som er mer lik den til naturlig forekommende humane antistoffer enn f.eks. museantistoffer og derved tillate at mindre og sjeldnere doser gis. Uttrykket "humanisert antistoff" som anvendt her refererer til et antistoff som omfatter deler av antistoffer med forskjellig opprinnelse, hvor minst en del
 15 er av human opprinnelse. For eksempel, så kan det humaniserte antistoffet omfatte deler utledet fra et antistoff med ikke-human opprinnelse med den nødvendige spesifisiteten, slik som en mus og fra et antistoff med human opprinnelse, koblet sammen kjemisk ved konvensjonelle teknikker (f.eks. syntetisk) eller laget som et sammenhengende polypeptid ved å anvende genetiske konstruksjonsteknikker.

20 Helst har et "humanisert antistoff" CDR'er som kommer fra (eller vesentlig kommer fra) et ikke-humant antistoff (helst et musemonoklonalt antistoff) mens leseramme og konstant region i den grad den er tilstede (eller en signifikant eller vesentlig del av den, dvs. minst ca. 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% eller 99%) kodes for av nukleinsyresekvensinformasjon som finner sted i den humane germline-
 25 immunglobulinregionen (se f.eks. the International ImMunoGeneTics Database) eller i rekombinante eller muterte former av dem enten antistoffer produseres i human celle eller ikke.

30 CDR'ene til et humanisert antistoff kan forandres eller optimaliseres fra CDR'ene til et ikke-humant foreldreantistoff som de kommer fra for å generere ønskede egenskaper, f.eks. spesifisitet, affinitet og/eller foretrukket binding. Forandrede eller optimaliserte CDR'er kan ha aminosyresubstitusjoner, tilsetninger og/eller slettinger sammenlignet med et mer foreldre-CDR, helst ca. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 eller 10 totalt innen de seks
 35 CDR-domenene. For eksempel, så er aminosyreposisjonene til CDR'ene som er understreket og i uthevet trykk i tabellene 2 og 3 posisjoner som er blitt forandret fra

CDR'ene vist i Fab 1 i tabellene 2 og 3. Alternativt kan museantistoff 2321 være et foreldreantistoff for sammenligning av CDR'er til et antistoff ifølge oppfinnelsen.

Humaniserte former av ikke-humane (f.eks. muse) antistoffer inkluderer et intakt antistoff, et vesentlig intakt antistoff, en del av et antistoff som omfatter et antigenbindende sete eller en del av et antistoff som omfatter et Fab-fragment, et Fab'-fragment, et F(ab')₂, eller et enkeltkjede Fv-fragment. Humaniserte antistoffer inneholder minst minimal sekvens utledet fra ikke-humant immunglobulin. Humaniserte antistoffer kan også omfatte rester som ikke finnes verken i mottakerantistoffet eller i de importerte CDR- eller leserammesekvensene. Generelt, vil det humaniserte antistoffet omfatte vesentlig hele av minst en, eller vanligvis to variable domener, hvor alle eller vesentlig alle aminosyrene i CDR-regionene korresponderer til de hos et ikke-humant immunglobulin og alle eller vesentlig alle aminosyrene i FR-regionene er de fra en human immunglobulinkonsensussekvens. Det humaniserte antistoffet omfatter også valgfritt minst en del av en immunglobulin konstant region (Fc), vanligvis den fra et humant immunglobulin [Jones et al., *Nature*, 321:522-525, 1986; Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329, 1988; og Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596, 1992].

Humaniserte antistoffer kan utsettes for *in vitro* mutagenese ved å anvende fremgangsmåter som rutinemessig anvendes i fagfeltet (eller, når et dyr som er transgent for humane IgG-sekvenser anvendes, *in vivo* somatisk mutagenese) og dermed så er leserammeregionaminosyresekvensene i HCVR- og LCVR-regionene til de humaniserte rekombinante antistoffene sekvenser som, mens de er utledet fra de som er relatert til humane germline HCVR- og LCVR-sekvenser, ikke trenger naturlig å eksistere innenfor det humane antistoffgermlinerepertoaret *in vivo*. Det blir overveid at slike aminosyresekvenser til HCVR- og LCVR-leserammeregionene i de humaniserte rekombinante antistoffene er minst 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 98% eller mest ønskelig minst 99% identiske til en human germlinesekvens. Helså vil de leserammerester i foreldreantistoffet (f.eks. museantistoff eller generelt antistoffet som det humaniserte antistoffet er utledet fra) som opprettholder eller påvirker kombinerte setestrukturer vil bli bevart. Disse rester kan identifiseres f.eks. ved røntgenkrystallografi av foreldreantistoffet eller Fab-fragmentet, som dermed identifiserer den tredimensjonale strukturene av det antigenbindende setet. En strategi for å humanisere antistoffer er å velge en human germlinesekvens med den høyeste homologien til leserammen til foreldreantistoffet som leserammen som skal motta donor-CDR'ene. Denne germlinetilnærmingsmåten er basert på den

samme logiske forklaringen som beste treffstrategien, men kun germlinesekvensene søkes for å databasene.

Det humaniserte antistoffet i den foreliggende oppfinnelsen kan omfatte eller kan være
 5 utledet av en human germlinelett kjedeleseramme. I bestemte utførelsesformer er den lett kjedegermlinesekvensen valgt fra humane VK-sekvenser inkludert, men ikke begrenset til, A1, A10, A11, A14, A17, A18, A19, A2, A20, A23, A26, A27, A3, A30, A5, A7, B2, B3, L1, L10, L11, L12, L14, L15, L16, L18, L19, L2, L20, L22, L23, L24, L25, L4/18a, L5, L6, L8, L9, O1, O11, O12, O14, O18, O2, O4 og O8. I visse utførelsesformer, så er denne lette kjedehumane germlineleserammen valgt fra V1-11, V1-13,
 10 V1-16, V1-17, V1-18, V1-19, V1-2, V1-20, V1-22, V1-3, V1-4, V1-5, V1-7, V1-9, V2-1, V2-11, V2-13, V2-14, V2-15, V2-17, V2-19, V2-6, V2-7, V2-8, V3-2, V3-3, V3-4, V4-1, V4-2, V4-3, V4-4, V4-6, V5-1, V5-2, V5-4, og V5-6.

I andre utførelsesformer, kan det humaniserte antistoffet i den foreliggende oppfinnelsen omfatte eller være utledet fra en human germline tung kjedeleseramme. I bestemte utførelsesformer er denne tung kjedehumane germlineleserammen valgt fra VH1-18, VH1-2, VH1-24, VH1-3, VH1-45, VH1-46, VH1-58, VH1-69, VH1-8, VH2-26, VH2-5, VH2-70, VH3-11, VH3-13, VH3-15, VH3-16, VH3-20, VH3-21, VH3-23, VH3-30,
 20 VH3-33, VH3-35, VH3-38, VH3-43, VH3-48, VH3-49, VH3-53, VH3-64, VH3-66, VH3-7, VH3-72, VH3-73, VH3-74, VH3-9, VH4-28, VH4-31, VH4-34, VH4-39, VH4-4, VH4-59, VH4-61, VH5-51, VH6-1, og VH7-81. Se PCT WO 2005/00560 for en beskrivelse av de forskjellige germlinesekvensene.

I bestemte utførelsesformer, så omfatter en lette kjedevARIABLE regionen og/eller den tunge kjedevARIABLE regionen en leserammeregion eller en minst en del av en leserammeregion (f.eks. som inneholder to eller tre subregioner, slik som FR2 og FR3). I visse utførelsesformer er minst FRL1, FRL2, FRL3 og FRL4 fullstendig humane. I andre utførelsesformer er minst FRH1, FRH2, FRH3 eller FRH4 fullstendig humane. I noen
 30 utførelsesformer, så er minst FRL1, FRL2, FRL3 eller FRL4 en germlinesekvens (f.eks. human germline) eller den omfatter humane konsensussekvenser for den bestemte leseramme. I andre utførelsesformer er minst FRH1, FRH2, FRH3 eller FRH4 en germlinesekvens (f.eks. human germline) eller omfatter humane konsensussekvenser for den bestemte leserammen. I foretrukne utførelsesformer, så er hele leserammeregionen human leserammeregion.
 35

Generelt kan humaniserte antistoffer produseres ved å skaffe tilveie nukleinsyresekvenser som koder for HCVR og LCVR til et antistoff, f.eks. et museantistoff eller antistoff laget av en hybridoma, som binder en IL-17-epitop ifølge oppfinnelsen, og å indentifisere CDR'ene i nevnte HCVR og LCVR (ikke human) og sette slike CDR-kodende

5 nukleinsyresekvenser på valgte humane leserammekodende nukleinsyresekvenser. Valgfritt kan en CDR-region optimaliseres ved å mutagenisere tilfeldig eller ved bestemte lokalisasjoner for å substituere en eller flere aminosyrer i CDR'en med en forskjellig aminosyre før CDR-regionen settes inn i leserammeregionen. Alternativt kan en CDR-region optimaliseres etter innsetting inn i den humane leserammeregionen ved

10 hjelp av fremgangsmåter som er tilgjengelig for fagfolk. Helst blir de humane leserammeaminosyresekvensene valgt slik at det resulterende antistoffet sansynligvis er passende for *in vivo* administrering hos mennesker. Dette kan bestemmes f.eks. basert på tidligere bruk av antistoffer som inneholder slik human leserammesekvens. Helst vil ikke den humane leserammesekvensen i seg selv være signifikant immunogen.

15 Alternativt, kan aminosyresekvensene i leserammene til antistoffet som skal humaniseres sammenlignes med de fra kjente humane leserammesekvenser som skal anvendes for CDR-innsetting å velges basert på deres sekvenser som er veldig like de til foreldreantistoffet, f.eks. et museantistoff som binder IL-17 (f.eks. et antistoff som omfatter en

20 HCVR med SEK ID nr. 270 og som videre omfatter en LCVR med SEK ID nr. 271). Flere humane leserammesekvenser er blitt isolert og deres sekvenser er rapportert i fagfeltet. Dette forsterker sansynligheten for at det resulterende CDR-innsatte humaniserte antistoffet som inneholder CDR'er til foreldreantistoffet (f.eks. muse) eller optimaliserte CDR'er til foreldreantistoffet satt inn i valgte humane leserammer (og muligens også

25 den humane konstante regionen) vil vesentlig bevare den antigenbindende strukturen og dermed bevare bindingsaffiniteten til foreldreantistoffet. For å bevare en signifikant grad av antigenbindingsaffinitet, vil de valgte humane leserammeregionene helst være de som er forventet å være passende for *in vivo* administrering, dvs. ikke immunogen.

30 I begge metoder, blir DNA-sekvensen som koder for HCVR- og LCVR-regionene til det foretrukne museanti-IL-17-antistoffet skaffet tilveie. Fremgangsmåter for å klonе nukleinsyresekvenser som koder for immunglobuliner er kjent i fagfeltet. Slike fremgangsmåter kan f.eks. involvere oppformeringen av immunglobulinkodende sekvenser som skal klones ved å anvende passende primere ved polymerasekjedereaksjon (PCR).

35 Primere som er passende for å oppformere immunglobulinnukleinsyresekvenser og spesifikt muse-HCVR- og LCVR-sekvenser er blitt rapportert i litteraturen. Etter at slike

immunglobulinkodende sekvenser er blitt klonet, vil de sekvenseres ved hjelp av fremgangsmåter som er velkjente i fagfeltet.

Etter at de CDR-kodende sekvensene er satt inn i de valgte humane leserammekodende sekvensene, så blir de resulterende DNA-sekvensene som koder for de "humaniserte" variable tunge og variable lette sekvenser så uttrykt for å produsere et humanisert Fv eller humanisert antistoff som binder IL-17. De humaniserte HCVR og LCVR kan uttrykkes som del av et helt anti-IL-17-antistoffmolekyl, dvs. som et fusjonsprotein med humane konstante domenesekvenser hvis kodende DNA-sekvenser er blitt skaffet tilveie fra et kommersielt tilgjengelig bibliotek eller som er blitt skaffet tilveie ved å anvende f.eks. en av de ovenfor beskrevne fremgangsmåtene for å skaffe tilveie DNA-sekvenser eller som er i fagfeltet. Imidlertid kan HCVR- og LCVR-sekvensene også uttrykkes i fraværet av konstante sekvenser for å produsere et humanisert anti-IL-17 Fv. Ikke desto mindre, så er fusjon av humane konstante sekvenser på den variable regionen potensielt ønskelig fordi det resulterende humaniserte anti-IL-17-antistoffet kan inneholde humane effektorfunksjoner.

Fremgangsmåter for å syntetisere DNA som koder for et protein med kjent sekvens er velkjent i fagfeltet. Ved å anvende slike fremgangsmåter, så blir DNA-sekvenser som koder for de gjeldende humaniserte HCVR- og LCVR-sekvensene (med eller uten konstante regioner) syntetisert og deretter uttrykt i et vektorsystem som er passende for uttrykk av rekombinante antistoffer. Dette kan utføres i et hvert vektorsystem som tilveiebringer at de gjeldende humaniserte HCVR- og LCVR-sekvensene blir uttrykt som et fusjonsprotein med humane konstante domenesekvenser og assosieres for å produsere funksjonelle (antigenbindende) antistoffer eller antistofffragmenter.

Humane konstante domenesekvenser er kjent i fagfeltet og er blitt rapportert i litteraturen. Foretrukne humane konstante lett kjedeseekvenser inkluderer κ - og λ -konstante lett kjedeseekvenser. Foretrukne humane konstante tung kjedeseekvenser inkluderer humant IgG1, humant IgG2, humant IgG3, humant IgG4 (se f.eks. SEK ID nr. 257-260) og muterte versjoner av dem som tilveiebringer forandret effektorfunksjon, f.eks. forsterket in vivo halveringstid, redusert Fc-reseptorbinding, forandret deamideringsprofil og lignende.

Hvis de er tilstede, er humane leserammeregioner helst utledet fra en human antistoffvariabel region som har sekvenslikhet til den analoge eller ekvivalente regionen til den

antigenbindende regiondonoren (dvs. foreldreantistoffet). Andre kilder for leseramme-regioner for deler av human opprinnelse til et humanisert antistoff inkluderer humane variable konsensussekvenser (se f.eks. hhv. C.A. Kettleborough, et al., *Protein Engineering* 4:773-783 (1991); Carter et al., WO 94/04679). For eksempel kan sekvensen til

5 antistoffet eller den variable regionen som er anvendt for å skaffe tilveie den ikke-humane delen sammenlignes med humane sekvenser som beskrevet i Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, femte utgave, NIH, U.S. Government Printing Office (1991). I en bestemt foretrukket utførelsesform, er leserammeregionene til en humanisert antistoffkjede utledet fra en human variabel region som har minst ca.

10 60% total sekvensidentitet, helst minst ca. 70%, 80% eller 90% total sekvensidentitet og mer ønskelig minst ca. 85% total sekvensidentitet med den variable regionen til den ikke-humane donoren. En human del kan også utledes fra et humant antistoff som har minst ca. 65% sekvensidentitet og helst minst ca. 70% sekvensidentitet, innen den bestemte delen (f.eks. FR) som blir anvendt, sammenlignet med den ekvivalente delen

15 (f.eks. FR) til den ikke-humane donoren.

Referanser som videre beskriver fremgangsmåter som er involvert i å humanisere et museantistoff som kan anvendes er f.eks. Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2869, 1991; U.S. patent nr. 5,693,761; U.S. patent nr. 4,816,397; U.S. patent nr.

20 5,225,539; computerprogrammene ABMOD og ENCAD som beskrevet i M. Levitt, *J. Mol. Biol.* 168:595-620, 1983; humanisering kan essensielt utføres ved å følge fremgangsmåten til Wintter og medarbeidere (Jones et al., *Nature* 321:522-525, 1986; Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327, 1988; Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536, 1988).

25

Humane antistoffer

Som et alternativ til humanisering, kan humane antistoffer genereres. Humane antistoffer kan produseres ved å anvende forskjellige teknikker som er kjent i fagfeltet, inkludert fagdisplaybiblioteker (Hoogenbroom og Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381, 1991;

30 Marks et al., *J. Mol. Bio.* 222:581, 1991). Teknikkene til Cole et al. og Boerner et al., er også tilgjengelige for tillagingen av humane monoklonale antistoffer (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, side 77 (1985) og Boerner et al., *J. Immunol.*, 147:86-95, 1991). På samme måte kan humane antistoffer lages ved å introdusere humant immunglobulinloki inn i transgene dyr, f.eks. mus hvor de endogene

35 immunglobulingenene er blitt delvis eller fullstendig inaktivert. Ved immunisering, f.eks. med et antigen som omfatter en immunogen epitop av oppfinnelsen, så blir et fullt

repertoar av human antistoffproduksjon skaffet tilveie som nært ligner det som ses hos mennesker inkludert genrearrangement, sammenstilling og antistoffrepertoar. Denne tilnærmingsmåte er beskrevet f.eks. i U.S. patent nr. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,589,369; 5,591,669; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, og i de følgende vitenskapelige publikasjoner: Marks et al., *BioTechnology* 10:779-783, 1992; Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859, 1994; Morrison, *Nature* 368: 812-13, 1994; Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14:845-51, 1996; Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996); Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995) og Jobkobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551, 1993.

10

Humane immunglobulingener introdusert inn i musen, som dermed danner transgene mus i stand til å respondere på antigener med antistoffer som har humane sekvenser er også beskrevet i Bruggemann et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6709-6713, 1989). Det er flere strategier som eksisterer for genereringen av pattedyr som produserer humane antistoffer. Spesielt så er det "minilokus" tilnærmingsmåten hvor et eksogent Ig-lokus etterlignes gjennom inklusjonen av deler (f.eks. individuelle gener) fra Ig-lokuset (se f.eks. U.S. Pat. NOs. 5,545,807, 5,545,806, 5,625,825, 5,625,126, 5,633,425, 5,661,016, 5,770,429, 5,789,650, og 5,814,318, 5,612,205, 5,721,367, 5,789,215), YAC-introduksjon av store og vesentlige germlinefragmenter til Ig-loki (se Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156, 1997; Greene og Jakobovits, *J. Exp. Med.* 188:483-495, 1998), og introduksjonen av hele eller vesentlig hele loki gjennom anvendelsen av mikrocellefusjon (se europeisk patentsøknad nr. EP 0 843 961 A1).

15

20

25

En hver transgen mus som er i stand til å respondere på immunisering med antistoffer som har humane sekvenser kan anvendes til å produsere et anti-IL-17-antistoff ifølge oppfinnelsen når man anvender fremgangsmåter som er tilgjengelige for fagfolk, f.eks. når en slik mus immuniseres med et polypeptid som omfatter en immunogen epitop ifølge oppfinnelsen.

30

Anvendelser

Antistoffer i den foreliggende oppfinnelsen er nyttige i terapeutiske, profylaktiske, diagnostiske og forskningsbruk som beskrevet her. Et antistoff ifølge oppfinnelsen kan anvendes for å diagnostisere en lidelse eller sykdom som er assosiert med uttrykket av et humant IL-17. På en lignende måte kan antistoffet ifølge oppfinnelsen anvendes i en analyse for å måle IL-17-nivåer i et individ som blir testet for en IL-17-assosiert tilstand. Forskningsbruk inkluderer fremgangsmåter som benytter antistoffet ifølge opp-

35

- finnelsen og merking for å detektere IL-17 i en prøve, f.eks. i en human kroppsvæske eller i en celle eller vevsekstrakt. Antistoffer ifølge oppfinnelsen kan anvendes med eller uten modifikasjon og er merket ved kovalent eller ikke-kovalent festing av en detekterbar del. Den detekterbare delen kan være enhver som er i stand til å produsere, enten direkte eller indirekte, et detekterbart signal. For eksempel kan den detekterbare delen være en radioaktiv isotop slik som f.eks. ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , eller ^{125}I , en fluorescerende eller kjemiluminiserende forbindelse slik som fluoresceinisotiocyanat, rodamin eller luciferin; eller et enzym slik som alkalisk fosfatase, β -galaktosidase, eller pepperrotperoksidase. En hver fremgangsmåte kjent i fagfeltet for separat å konjugere antistoffet til den detekterbare delen kan benyttes, inkludert de fremgangsmåter som er beskrevet av Hunter, et al., *Nature* 144:945, 1962; David, et al., *Biochemistry* 13: 1014, 1974; Pain, et al., *J. Immunol. Meth.* 40: 219, 1981; og Nygren, J. *Histochem. and Cytochem.* 30: 407, 1982.
- En rekke konvensjonelle protokoller for å måle IL-17, som inkluderer f.eks. ELISA, RIA og FACS er kjent i fagfeltet og tilveiebringer en basis for å diagnostisere forandrede eller unormale nivåer av IL-17-uttrykk. Normale eller standard uttrykksverdier etableres ved å anvende enhver kjent teknikk i fagfeltet, f.eks. ved å kombinere en prøve som omfatter et IL-17-polypeptid med f.eks. antistoffer under betingelser som er passende for å danne et antigen:antistoffkompleks. Antistoffet er direkte eller indirekte merket med en detekterbar substans for å fasilitere deteksjon av det bundede eller ikke-bundede antistoffet. Passende detekterbare substanser inkluderer forskjellige enzymer, prostetiske grupper, fluorescerende materialer, luminiserende materialer og radioaktive materialer. Eksempler på passende enzymer inkluderer pepperrotperoksidase, alkalisk fosfatase, β -galaktosidase eller acetylkolinesterase; eksempler på passende prostetiske gruppekomplekser inkluderer streptavidin/biotin og avidin/biotin; eksempler på passende fluorescerende materialer inkluderer umbelliferon, fluorescein, fluoresceinisotiocyanat, rodamin, diklortriazinylaminfluorescein, dansylklorid eller fykoerytrin; et eksempel på et luminiserende materiale inkluderer luminol; og eksempler på et radioaktivt materiale inkluderer ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S og ^3H (se f.eks. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc. (1987)). Mengden av et standardkompleks som dannes kvantiteres ved hjelp av forskjellige fremgangsmåter slik som f.eks. fotometriske måter. Mengder av IL-17-polypeptid uttrykt i prøver blir så sammenlignet med standardverdiene.

For letthets skyld kan antistoffet i den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringes i et kitt, en pakkekombinasjon av reagenser i forhåndsbestemte mengder med instruksjoner for å utføre den diagnostiske analysen. Der hvor antistoffet er merket med et enzym, vil kittet inkludere substrater og kofaktorer som er nødvendige ved enzymet (f.eks. en substrat-
 5 forløper som tilveiebringer den detekterbare kromoforen eller fluoroforen). I tillegg kan andre tilleggsstoffer inkluderes slik som stabilisatorer, buffer (f.eks. en blokkeringsbuffer eller lysisbuffer) og lignende. De relative mengdene av de forskjellige reagensene kan varieres vidt for å tilveiebringe konsentrasjoner i løsning av reagensene som vesentlig optimaliserer sensitiviteten av analysen. Spesielt kan reagensene tilveiebringes som
 10 tørre pulvere, vanligvis lyofiliserte, som inkluderer hjelpemidler som ved oppløsning vil tilveiebringe en reagensløsning som har den passende konsentrasjonen.

Terapeutiske anvendelser for antistoffet

IL-17 er et proinflammatorisk cytokin som utskilles av aktiverte T-celler på steder hvor
 15 det er inflammasjon, ikke i den systemiske sirkulasjonen; det er ikke lett detekterbart i serumet eller vevet til en frisk person. IL-17 oppregulerer adhesjonsmolekyler, inducerer produksjonen av flere inflammatoriske cytokiner og kjemokiner for diverse celletyper inkludert synoviocytter, kondrocytter, fibroblaster, endotelceller, epitelceller, og inducerer dermed rekruttering av neutrofiler til et inflammatorisk sted, og stimulerer produksjonen av prostaglandiner og metalloproteinaser og hemmer proteoglykansyntese. Videre
 20 spiller IL-17 en viktig rolle i modningen av hematopoietiske avkomceller. IL-17 har signalleringsroller i forskjellige organer og vev som inkluderer lunge, artikulær brusk, ben, hjerne, hematopoietiske celler, nyre, hud og tarm. IL-17 har 15-27% aminosyrehomologi med IL-17B, C og E og 44-50% aminosyrehomologi med IL-17D og F. IL-17 binder seg til IL-17-reseptoren med lav affinitet (ca. 1 nM), mens andre IL-17-familiemedlemmer ikke binder IL-17-reseptoren.
 25

Økede nivåer av IL-17 (dvs. IL-17A) er blitt assosiert med flere tilstander som inkluderer luftveisinflammasjon, RA, osteoartritt, benerosjon, intraperitoneale abscesser og
 30 adhesjoner, IBD, allograftavstøtning, psoriasis, visse typer cancer, angiogenese, aterosklerose og MS. Både IL-17 og IL-17R er oppregulert i synovialt vev hos RA-pasienter. IL-17 utviser dets rolle i patogenese av RA gjennom IL-1 β og TNF- α -avhengige og uavhengige reaksjonsveier. IL-17 stimulerer utskilling av andre cytokiner og kjemokiner, f.eks. TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 og Gro- α . IL-17 bidrar direkte til sykdomsprogressjon i RA. Injeksjon av IL-17 inn i musekne fremmer leddødeleggelse uavhengig av IL-1 β -aktivitet (Ann. Rheum. Dis. 59:529-32, 2000). Anti-IL-1 β -antistoff har
 35

ingen effekt på IL-17-indusert inflammasjon og leddskade (J. Immunol. 167:1004-1013, 2001). I en SCW-indusert museartrittmodell, induserer IL-17 inflammatorisk celleinfiltrasjon og proteoglykansvekking i vildtype og IL-1 β knock out og TNF- α knock out-mus. IL-17 knock out-mus er fenotypisk normale i fraværet av antigenutfordring, men
 5 har merkbart redusert artritt etter type II-kollagenimmunisering (J. Immunol. 171:6173-6177, 2003).

Multipel sklerose ("MS") er en autoimmun sykdom som er karakterisert ved sentralnervesystem ("CNS") inflammasjon med skade på myelinlaget som omgir aksonene. Et
 10 kjennemerke på MS er at T-celle infiltrerer CNS. MS påvirker mer enn 350 000 personer i U.S.A og 2,5 millioner i verden. Det er mange former av den og den mest vanlige er tilbakefallende/dempende sykdom ("RRMS") etterfulgt av et sekundært progressivt stadie. Nåværende terapeutika består av interferon- β (AVONEX, BETASERON og REBIF) som reduserer tilbakefall/forværringshastigheten med 31% til 34%, men som
 15 kan produsere influensalignende symptomer og/eller syntese av nøytraliserende antistoffer, f.eks. så produserer ca. 15% av pasienter som mottar AVONEX nøytraliserende antistoffer i 18 måneder. TYSABRI godkjent av FDA for RRMS ble fjernet fra markedet p.g.a. CNS-immunsuppressjonsbekymringer. Det er fremdeles et ikke-dekket medisinsk behov i behandlingen av MS. IL-17 mRNA er øket i MS-lesjoner og i mononukleære celler (MNC) i blod og cerebrospinalvæske fra MS-pasienter. Høyere antall IL-17
 20 mRNA-uttrykkende blod MNC detekteres under MS-kliniske forværring sammenlignet med bedring (Multiple Sclerosis, 5:101-104, 1999). Videre blir eksperimentell autoimmun encefalomyelitt ("EAE"), en preklinisk dyremodell for MS signifikant undertrykket i IL-17 knock out-mus.

25 En farmasøytisk sammensetning som omfatter et anti-IL-17 monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen kan derfor være nyttig for behandlingen eller forebyggingen av tilstander hvor tilstedeværelsen av IL-17 forårsaker eller bidrar til at de uønskede patologiske effektene eller nedgangen i IL-17-aktivitet har en terapeutisk fordel hos pattedyr, helst
 30 hos mennesker, inkludert, men ikke begrenset til, luftveisinflammasjon, astma, RA, osteoartritt, benerosjon, intraperitoneale abscesser og adhesjoner, IBD, allograftavstøtning, psoriasis, visse typer cancer, angiogenese, aterosklerose og MS, så vel som andre inflammatoriske lidelser, tilstander, sykdommer og stadier inkludert uten begrensning: erytematose, respons for allergenutsettelse, Helicobacter pylori assosiert gastritt, bronkieastma og allograftavstøtning (f.eks. nyre), systemisk lupus erytematose og lupus nefritt. Anvendelsen av et anti-IL-17 monoklonalt antistoff i den foreliggende oppfinnel-

sen for å behandle eller å forebygge minst en av de tidligere nevnte lidelsene hvor IL-17-aktivitet er skadelig eller som drar nytte av nedsatte nivåer av bioaktivt IL-17 blir overveid her. I tillegg, så blir anvendelsen av et anti-IL-17 monoklonalt antistoff i den foreliggende oppfinnelsen for anvendelse i produksjonen av et medikament for behandling
 5 lingen av minst en av de tidligere nevnte lidelsene overveid.

Som anvendt her, så refererer uttrykkene ”behandling”, ”å behandle” og lignende, seg til å skaffe tilveie en ønsket farmakologisk og/eller fysiologisk effekt. Effekten kan være profylaktisk i lys av fullstendig eller delvis å forhindre en sykdom eller symptomer
 10 av den og/eller den kan være terapeutisk i betydningen av en delvis eller fullstendig kur for en sykdom og/eller alvorlig effekt som skyldes sykdommen. ”Behandling” som anvendt her, inkluderer administrering av en forbindelse i den foreliggende oppfinnelsen for behandling av en sykdom eller tilstand i et pattedyr, spesielt i et menneske og inkluderer: (a) å forhindre sykdommen fra å finne sted i et individ som kan være predisponert
 15 for sykdommen, men som enda ikke har fått diagnosen; (b) å hemme sykdommen, dvs. arrestere dens utvikling; og (c) å lette sykdommen, dvs. forårsake tilbakegang av sykdommen eller lidelsen eller lette symptomer eller komplikasjoner av den. Dosekurer kan justeres for å tilveiebringe den optimale ønskede responsen (f.eks. en terapeutisk eller profylaktisk respons). For eksempel kan en enkel bolus administreres, flere oppdelte
 20 doser kan administreres over tid eller dosen kan proporsjonalt reduseres eller økes indikert ved kravene til den terapeutiske situasjonen.

Farmasøytisk sammensetning

Et antistoff ifølge oppfinnelsen kan inkorporeres inn i farmasøytiske sammensetninger som er passende for administrering til et individ (se f.eks. eksempel 14). Forbindelsene
 25 ifølge oppfinnelsen kan administreres alene eller i kombinasjon med en farmasøytisk akseptabel bærer, fortynner og/eller bindemiddel, i enkle eller flere doser. De farmasøytiske sammensetningene for administrering blir designet slik at de er passende for den valgte administreringsmåten og farmasøytisk akseptabel fortynner, bærer og/eller bindemidler slik som dispersjonsmidler, buffere, overflateaktive stoffer, konserveringsmid-
 30 ler, oppløsningsmidler, isotonisitetmidler, stabiliseringsmidler og lignende, blir anvendt etter som det passer (se f.eks. eksempel 14 her). Nevnte sammensetninger blir designet i henhold til konvensjonelle teknikker som i f.eks. Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19. utgave, Gennaro, red., Mack Publishing Co., Easton, PA,
 35 1995, som tilveiebringer en kompendium av formuleringsteknikker som er generelt kjent av utøvere.

En farmasøytisk sammensetning som omfatter et anti-IL-17 monoklonalt antistoff i den foreliggende oppfinnelsen kan administreres til et individ som er i risikozonen for, eller som utviser patologier som beskrevet her, ved å anvende standard administreringsteknikker inkludert oral, intravenøs, intraperitoneal, subkutan, lunge, transdermal, intramuskulær, intranasal, bukkal, sublingual eller stikkpilleadministrering.

En farmasøytisk sammensetning ifølge oppfinnelsen er helst en "terapeutisk effektiv mengde" eller en "profylaktisk effektiv mengde" av et antistoff ifølge oppfinnelsen. En "terapeutisk effektiv mengde" refererer til en mengde som er effektiv ved doser og for tidsperioder som er nødvendig, til å oppnå det ønskede terapeutiske resultatet. En terapeutisk effektiv mengde av antistoffet kan variere i henhold til faktorer slik som sykdomstilstanden, alder, kjønn og vekt av individet og evnen antistoffet eller antistoffdelen har til å fremkalle en ønsket respons i individet. En terapeutisk effektiv mengde er også en hvor enhver toksisk eller skadelig effekt av antistoffet oppveies av de terapeutisk gunstige effektene. En "profylaktisk effektiv mengde" refererer til en mengde som er effektiv ved doser og for tidsperioder som er nødvendig for å oppnå det ønskede profylaktiske resultatet. Vanligvis, fordi en profylaktisk dose anvendes i individer før eller på et tidlig trinn i sykdommen, så vil den profylaktisk effektive mengden være mindre enn den terapeutisk effektive mengde.

En terapeutisk effektiv eller profylaktisk effektiv mengde er minst den minimale dosen, men mindre enn en toksisk dose, av et aktivt middel som er nødvendig for å gi terapeutisk fordel til et individ. Sagt på en annen måte, er en terapeutisk effektiv mengde av et antistoff ifølge oppfinnelsen, en mengde som i pattedyr, helst i mennesker, reduserer IL-17-bioaktivitet, f.eks. ved å binde seg til IL-17R, hvor tilstedeværelsen av IL-17 forårsaker eller bidrar til uønskede patologiske effekter eller nedgang i IL-17-nivåer som resulterer i en gunstig terapeutisk effekt i et pattedyr, helst et menneske.

Administreringsruten til et antistoff i den foreliggende oppfinnelsen kan være oral, parenteral, ved inhalling eller topikal. Helst kan antistoffene ifølge oppfinnelsen inkorporeres inn i en farmasøytisk sammensetning som er passende for parenteral administrering. Uttrykket parenteral som anvendt her, inkluderer intravenøs, intramuskulær, subkutan, rektal, vaginal eller intraperitoneal administrering. Perifer systemisk levering ved intravenøs eller intraperitoneal eller subkutan injeksjon er foretrukket. Passende verktøy for slike injeksjoner er alminnelige i fagfeltet.

Den farmasøytiske sammensetningen må vanligvis være steril og stabil under betingel-
sene for produksjon og lagring i beholderen som tilveiebringes, inkludert f.eks. et for-
seglet rør eller sprøyte. Derfor kan farmasøytiske sammensetninger være steriltfiltrert
5 etter at formuleringen var laget, eller på annen måte gjort mikrobiologisk akseptabel. En
vanlig sammensetning for intravbenøs infusjon kunne ha et volum på 250-1000 ml væs-
ke, slik som steril Ringer's løsning, fysiologisk saltvann, dekstroseløsning og Hank's
løsning og en terapeutisk effektiv dose (f.eks. 1 til 100 mg/ml, eller mer) av antistoff-
konsentrasjon. Dose kan variere avhengig av typen og alvorligheten av sykdommen.
10 Som er velkjent i det medisinske fagfeltet, så er doser for et hvert individ avhengig av
mange faktorer inkludert pasientens størrelse, kroppsoverflateareal, alder, den bestemte
forbindelsen som skal administreres, kjønn, tid og rute for administrering, generell helse
og andre medikamenter som blir administrert samtidig. En vanlig dose kan f.eks. være i
området 0,001 til 1 000 µg; doser under eller over dette eksempelområdet blir også
15 imidlertid overveid, spesielt ved å betrakte de tidligere nevnte faktorene. Den dagelige
parenterale dosekuren kan være ca. 0,1 µg/kg til ca. 100 mg/kg total kroppsvekt, helst
fra ca. 0,3 µg/kg til ca. 10 mg/kg og mer ønskelig fra ca. 1 µg/kg til 1 mg/kg, enda mer
ønskelig fra ca. 0,5 til 10 mg/kg kroppsvekt pr. dag. Fremskritt kan måles ved periodisk
bedømmelse. For repeterte administreringer over flere dager eller lenger avhengig av
20 tilstanden, blir behandlingen repetert inntil en ønsket undertrykkelse av sykdomssym-
ptomer finner sted. Andre dosekurer kan også være nyttige og er ikke ekskludert her i
fra. Den ønskede dosen kan leveres med en enkel bolusadministrering, ved flere bolus-
administreringer eller ved kontinuerlig infusjonsadministrering av antistoff, avhengig av
mønsteret til farmakokinetisk nedbryting som legen ønsker å oppnå.
25 Disse foreslåtte mengder antistoff blir utsatt for en stor del terapeutisk diskusjon. Nøk-
kelfaktoren i å velge en passende dose og skjema er resultatet som skaffes tilveie. Fak-
torer for betraktning i denne sammenheng inkluderer den spesielle lidelsen som skal
behandles, det bestemte pattedyret som blir behandlet, den kliniske tilstanden til den
30 individuelle pasienten, årsaken til lidelsen, leveringsstedet for antistoffet, den bestemte
typen antistoff, fremgangsmåten for administrering, administreringsskjema og andre
faktorer som er kjent for leger.

Terapeutiske midler ifølge oppfinnelsen kan være frosne eller lyofiliserte for lagring og
35 rekonstitusjon i en passende steril bærer før anvendelse. Lyofilisering og rekonstitusjon

kan føre til varierende grad av antistoffaktivitetstap. Doser kan måtte justeres for å kompensere. Generelt, er pH mellom 6 og 8 foretrukket.

Produksjonsprodukt

- 5 I en annen utførelsesform av oppfinnelsen, blir et produksjonsprodukt som inneholder materialer som er nyttige for behandlingen eller forebyggingen av lidelsene eller tilstandene som er beskrevet over tilveiebragt. Produksjonsproduktet omfatter en beholder og en merking. Passende beholder inkluderer f.eks. flasker, ampuller, sprøyter og testrør. Beholderne kan formes fra en rekke materialer slik som glass eller plastikk. Beholderen
- 10 inneholder en sammensetning av et antistoff ifølge oppfinnelsen som er effektiv i å forebygge eller å behandle lidelsen eller tilstanden og kan ha en steril inngangsport (f.eks. så kan beholderen være en intravenøs løsningspose eller en ampulle som har en kork som er mulig å komme gjennom ved hjelp av en hypoderm injeksjonsnål). Det aktive midlet i sammensetningen er et anti-IL-17-antistoff ifølge oppfinnelsen. Merkingen på
- 15 eller assosiert med beholderen indikerer at sammensetningen anvendes for å behandle tilstanden det er snakk om. Produksjonsproduktet kan videre omfatte en andre beholder som omfatter en farmasøyisk akseptabel buffer, slik som fosfatbufret saltvann, Ringer's løsning og dekstroseløsning. Den kan videre inkludere andre materialer som er ønskelig fra et kommersielt og brukerstandpunkt, inkludert andre buffere, fortynnere, filtere, nå-
- 20 ler, sprøyter og pakkeinnsatser med instruksjoner for anvendelse.

De følgende eksemplene gis kun for illustrative formål og er ikke ment å begrense omfanget av den foreliggende oppfinnelsen på noen måte.

25 Tabell 1

SEK ID nummer

Fab #	LCVR	Lett CDR1	Lett CDR2	Lett CDR3	HCVR	H- CDR1	H- CDR2	H- CDR3
1	178	122	150	168	56	11	29	33
2	179	122	150	169	57	11	29	34
3	180	123	150	168	56	11	29	33
4	181	124	150	168	58	11	29	35
5	179	122	150	169	59	11	29	36
6	182	124	150	169	60	11	29	37
7	183	125	150	170	56	11	29	33
8	184	124	150	171	61	11	29	38

9	185	124	150	170	62	11	29	39
10	178	122	150	168	60	11	29	37
11	181	124	150	168	61	11	29	38
12	186	124	150	172	63	11	29	40
13	187	123	150	169	64	11	29	41
14	188	123	150	173	65	11	29	42
15	189	124	150	174	66	11	29	43
16	181	124	150	168	62	11	29	39
17	187	123	150	169	61	11	29	38
18	181	124	150	168	67	11	29	44
19	190	124	150	175	56	11	29	33
20	178	122	150	168	68	12	29	33
21	178	122	150	168	69	13	29	33
22	178	122	150	168	70	14	29	33
23	178	122	150	168	71	15	29	33
24	178	122	150	168	72	16	29	33
25	178	122	150	168	73	17	29	33
26	178	122	150	168	74	18	29	33
27	178	122	150	168	75	19	29	33
28	178	122	150	168	76	20	29	33
29	178	122	150	168	77	21	29	33
30	178	122	150	168	78	22	29	33
31	178	122	150	168	79	23	29	33
32	178	122	150	168	80	24	29	33
33	178	122	150	168	81	11	30	33
34	178	122	150	168	82	11	31	33
35	178	122	150	168	83	11	32	33
36	178	122	150	168	58	11	29	35
37	178	122	150	168	84	11	29	45
38	178	122	150	168	85	11	29	261
39	178	122	150	168	86	11	29	47
40	178	122	150	168	87	11	29	48
41	178	122	150	168	88	11	29	49
42	178	122	150	168	89	11	29	50
43	178	122	150	168	90	11	29	51

44	178	122	150	168	91	11	29	52
45	178	122	150	168	92	11	29	53
46	178	122	150	168	93	11	29	54
47	191	125	150	168	56	11	29	33
48	192	126	150	168	56	11	29	33
49	193	127	150	168	56	11	29	33
50	194	128	150	168	56	11	29	33
51	195	129	150	168	56	11	29	33
52	196	130	150	168	56	11	29	33
53	197	131	150	168	56	11	29	33
54	198	132	150	168	56	11	29	33
55	199	133	150	168	56	11	29	33
56	200	134	150	168	56	11	29	33
57	201	135	150	168	56	11	29	33
58	202	136	150	168	56	11	29	33
59	203	137	150	168	56	11	29	33
60	204	138	150	168	56	11	29	33
61	205	139	150	168	56	11	29	33
62	206	140	150	168	56	11	29	33
63	199	133	150	168	56	11	29	33
64	207	141	150	168	56	11	29	33
65	208	142	150	168	56	11	29	33
66	209	143	150	168	56	11	29	33
67	210	144	150	168	56	11	29	33
68	211	122	151	168	56	11	29	33
69	212	122	150	176	56	11	29	33
70	213	122	150	177	56	11	29	33
71	214	145	150	168	94	25	29	46
72	191	125	150	168	95	26	29	46
73	215	146	150	168	96	26	29	55
74	199	133	150	168	97	26	29	48
75	178	122	150	168	95	26	29	46
76	199	133	150	168	95	26	29	46
78	178	122	150	168	98	26	29	47
79	195	129	150	168	99	27	29	46

80	195	129	150	168	97	26	29	48
82	199	133	150	168	98	26	29	47
84	199	133	150	168	100	26	29	52
85	191	125	150	168	98	26	29	47
86	191	125	150	168	95	26	29	46
87	216	147	150	168	95	26	29	46
88	199	133	150	168	94	25	29	46
89	196	130	150	168	100	26	29	52
91	195	129	150	168	97	26	29	48
92	216	147	150	168	97	26	29	48
93	195	129	150	168	101	27	29	48
94	199	133	150	168	95	26	29	46
95	217	130	152	168	98	26	29	47
96	218	125	153	168	102	26	32	46
97	219	145	154	168	97	26	29	48
98	199	133	150	168	98	26	29	47
99	199	133	150	168	95	26	29	46
100	220	125	155	168	103	26	32	33
101	221	133	156	168	95	26	29	46
102	222	148	157	168	95	26	29	46
103	223	130	158	168	104	26	32	46
104	224	145	159	168	104	26	32	46
105	225	130	150	169	105	26	32	47
106	226	133	160	168	106	26	29	47
107	227	130	161	169	107	25	32	48
108	228	133	162	169	108	25	29	47
109	229	130	163	168	109	27	32	46
110	230	131	164	169	100	26	29	52
111	231	146	165	168	95	26	29	46
112	232	125	166	168	97	26	29	48
113	199	133	150	168	110	27	29	47
114	233	129	159	168	106	26	29	47
115	234	133	167	168	106	26	29	47
116	235	149	167	168	110	27	29	47
117	236	125	167	168	111	28	32	53

118	234	133	167	168	112	26	30	53
119	237	122	167	168	100	26	29	52
120	238	122	167	169	112	28	30	46
121	239	147	167	169	113	28	32	46
122	237	122	167	168	114	26	30	53
123	236	125	167	168	115	26	29	53
124	240	131	167	168	116	11	30	53
125	178	122	150	168	117	26	32	52
126	241	131	167	168	118	26	30	52
127	241	131	167	168	106	26	29	47
128	242	129	167	169	119	27	30	47
129	236	125	167	168	120	26	30	52
130	243	129	167	168	119	27	30	47
131	236	125	167	168	117	26	32	52
132	236	125	167	168	121	27	30	52

Tabell 2 Tung kjede-CDR-oppstilling

		SEK		Sek		Sek	
Fab#	CDR1	ID Nr.	CDR2	ID Nr.	CDR3	ID Nr.	
5	1	<u>GYSFTDYNMN</u> 11	<u>VINPNYGTTDYNQRFKG</u>	29	<u>YDYATGTGAY</u>	33	
	2	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>W</u> TGTG <u>G</u> Y	34	
	3	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
	4	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>W</u> TGTGAY	35	
	5	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTG <u>L</u> Y	36	
10	6	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTG <u>G</u> Y	37	
	7	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
	8	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTG <u>V</u> Y	38	
	9	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>H</u> TGTG <u>G</u> Y	39	
	10	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTG <u>G</u> Y	37	
15	11	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTG <u>V</u> Y	38	
	12	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTG <u>I</u> Y	40	
	13	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>E</u> TGTG <u>G</u> Y	41	
	14	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>E</u> TGTG <u>P</u> Y	42	
	15	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTG <u>G</u> Y	43	
20	16	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>H</u> TGTG <u>G</u> Y	39	
	17	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTG <u>V</u> Y	38	

	18	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>S</u> TGTG <u>G</u> Y	44
	19	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	20	GYSFTDYN <u>I</u> N 12	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	21	GYSFTDYN <u>L</u> N 13	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
5	22	GYSF <u>G</u> DYNMN 14	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	23	GYSF <u>R</u> DYNMN 15	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	24	GYSFT <u>W</u> YNMN 16	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	25	GYSF <u>N</u> DYNMN 17	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	26	GYSFTDYNM <u>S</u> 18	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
10	27	GYSFTDYN <u>T</u> N 19	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	28	GYSF <u>P</u> DYNMN 20	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	29	<u>H</u> YSFTDYNMN 21	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	30	GY <u>H</u> FTDYNMN 22	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	31	GY <u>P</u> FTDYNMN 23	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
15	32	GYSFTD <u>F</u> NMN 24	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	33	GYSFTDYNMN 11	VINP <u>M</u> YGTDDYNQRFKG	30	YDYATGTGAY	33
	34	GYSFTDYNMN 11	VINP <u>A</u> YGTDDYNQRFKG	31	YDYATGTGAY	33
	35	GYSFTDYNMN 11	VINP <u>E</u> YGTDDYNQRFKG	32	YDYATGTGAY	33
	36	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>W</u> TGTGAY	35
20	37	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>S</u> TGTGAY	45
	38	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YD <u>A</u> F <u>T</u> G <u>T</u> GAY	261
	39	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
	40	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>H</u> TGTGAY	48
	41	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>L</u> TGTGAY	49
25	42	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDYAT <u>S</u> TGAY	50
	43	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDYA <u>P</u> GTGAY	51
	44	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTG <u>V</u> Y	52
	45	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTG <u>V</u> Y	53
	46	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YD <u>P</u> ATGTGAY	54
30	47	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	48	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	49	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	50	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	51	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
35	52	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	53	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33

	54	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	55	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	56	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	57	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
5	58	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	59	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	60	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	61	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	62	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
10	63	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	64	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	65	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	66	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	67	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
15	68	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	69	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	70	GYSFTDYNMN 11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
	71	GYSFTDY <u>H</u> <u>L</u> <u>G</u> 25	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
	72	GYSFTDY <u>H</u> <u>I</u> <u>H</u> 26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
20	73	GYSFTDY <u>H</u> <u>I</u> <u>H</u> 26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>H</u> TGTG <u>V</u> <u>Y</u>	55
	74	GYSFTDY <u>H</u> <u>I</u> <u>H</u> 26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>H</u> TGTGAY	48
	75	GYSFTDY <u>H</u> <u>I</u> <u>H</u> 26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
	76	GYSFTDY <u>H</u> <u>I</u> <u>H</u> 26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
	78	GYSFTDY <u>H</u> <u>I</u> <u>H</u> 26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
25	79	GYSFTDY <u>H</u> <u>M</u> <u>S</u> 27	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
	80	GYSFTDY <u>H</u> <u>I</u> <u>H</u> 26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>H</u> TGTGAY	48
	82	GYSFTDY <u>H</u> <u>I</u> <u>H</u> 26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
	84	GYSFTDY <u>H</u> <u>I</u> <u>H</u> 26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTG <u>V</u> <u>Y</u>	52
	85	GYSFTDY <u>H</u> <u>I</u> <u>H</u> 26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
30	86	GYSFTDY <u>H</u> <u>I</u> <u>H</u> 26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
	87	GYSFTDY <u>H</u> <u>I</u> <u>H</u> 26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
	88	GYSFTDY <u>H</u> <u>L</u> <u>G</u> 25	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
	89	GYSFTDY <u>H</u> <u>I</u> <u>H</u> 26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTG <u>V</u> <u>Y</u>	52
	91	GYSFTDY <u>H</u> <u>I</u> <u>H</u> 26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>H</u> TGTGAY	48
35	92	GYSFTDY <u>H</u> <u>I</u> <u>H</u> 26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>H</u> TGTGAY	48
	93	GYSFTDY <u>H</u> <u>M</u> <u>S</u> 27	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>H</u> TGTGAY	48

	94	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
	95	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
	96	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINP <u>E</u> YGTDDYNQRFKG	32	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
	97	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>H</u> TGTGAY	48
5	98	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
	99	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
	100	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINP <u>E</u> YGTDDYNQRFKG	32	YDYATGTGAY	33
	101	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
	102	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
10	103	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINP <u>E</u> YGTDDYNQRFKG	32	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
	104	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINP <u>E</u> YGTDDYNQRFKG	32	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
	105	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINP <u>E</u> YGTDDYNQRFKG	32	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
	106	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
	107	GYSFTDY <u>HLG</u>	25	VINP <u>E</u> YGTDDYNQRFKG	32	YDY <u>H</u> TGTGAY	48
15	108	GYSFTDY <u>HLG</u>	25	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
	109	GYSFTDY <u>HMS</u>	27	VINP <u>E</u> YGTDDYNQRFKG	32	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
	110	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTG <u>VY</u>	52
	111	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
	112	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>H</u> TGTGAY	48
20	113	GYSFTDY <u>HMS</u>	27	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
	114	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
	115	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
	116	GYSFTDY <u>HMS</u>	27	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTG <u>VY</u>	47
	117	GYSFTDY <u>HIS</u>	28	VINP <u>E</u> YGTDDYNQRFKG	32	YDY <u>Y</u> TGTG <u>VY</u>	53
25	118	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINP <u>M</u> YGTDDYNQRFKG	30	YDY <u>Y</u> TGTG <u>VY</u>	53
	119	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTG <u>VY</u>	52
	120	GYSFTDY <u>HIS</u>	28	VINP <u>M</u> YGTDDYNQRFKG	30	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
	121	GYSFTDY <u>HIS</u>	28	VINP <u>E</u> YGTDDYNQRFKG	32	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
	122	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINP <u>M</u> YGTDDYNQRFKG	30	YDY <u>Y</u> TGTG <u>VY</u>	53
30	123	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTG <u>VY</u>	53
	124	GYSFTDYNMN	11	VINP <u>M</u> YGTDDYNQRFKG	30	YDY <u>Y</u> TGTG <u>VY</u>	53
	125	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINP <u>E</u> YGTDDYNQRFKG	32	YDY <u>F</u> TGTG <u>VY</u>	52
	126	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINP <u>M</u> YGTDDYNQRFKG	30	YDY <u>F</u> TGTG <u>VY</u>	52
	127	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTDDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
35	128	GYSFTDY <u>HMS</u>	27	VINP <u>M</u> YGTDDYNQRFKG	30	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
	129	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINP <u>M</u> YGTDDYNQRFKG	30	YDY <u>F</u> TGTG <u>VY</u>	52

130	GYSFTDY <u>HMS</u> 27	VINP <u>M</u> YGTTDYNQRFKG	30	YDY <u>Y</u> TGTGAY 47
131	GYSFTDY <u>HIH</u> 26	VINP <u>E</u> YGTTDYNQRFKG	32	YDY <u>E</u> TGTG <u>VY</u> 52
132	GYSFTDY <u>HMS</u> 27	VINP <u>M</u> YGTTDYNQRFKG	30	YDY <u>E</u> TGTG <u>VY</u> 52

5 Konsensus:

	SEK ID nr.: 244	SEK ID nr.: 245	SEK ID nr.: 246
	X ₁ YX ₃ FX ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀	VINPX ₅ YGTTDYNQRFKG	YDX ₃ X ₄ X ₅ X ₆ TGX ₉ Y
	X ₁ er H eller G	X ₅ er N,A,M eller E	X ₃ er Y,A eller P
	X ₃ er S,H eller P		X ₄ er Y,F,H,S,W,L eller A
10	X ₅ er G,R,T,N eller P		X ₅ er T eller P
	X ₆ er D eller W		X ₆ er G eller S
	X ₇ er Y eller F		X ₉ er A,G,L,V eller T
	X ₈ er N eller H		
	X ₉ er M,T,L eller I		
15	X ₁₀ er N,G,H eller S		

Tabell 3 Lett kjede-CDR-oppstillinger

Fab#	CDR1	ID Nr:	CDR2	ID Nr:	CDR3	ID NO:
20	1 <u>RSSQSLVHSRGNTYLH</u>	122	<u>KVSNRFS</u>	150	<u>SQSTHLPFT</u>	168
	2 RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTH <u>Y</u> PFT	169
	3 RSSQSLVHS <u>H</u> GNTYLH	123	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	4 RSSQSLVHS <u>N</u> GNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	5 RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTH <u>Y</u> PFT	169
25	6 RSSQSLVHS <u>N</u> GNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTH <u>Y</u> PFT	169
	7 RSSQSLVHS <u>Y</u> GNTYLH	125	KVSNRFS	150	SQSTH <u>I</u> PFT	170
	8 RSSQSLVHS <u>N</u> GNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQS <u>L</u> H <u>V</u> PFT	171
	9 RSSQSLVHS <u>N</u> GNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTH <u>I</u> PFT	170
	10 RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
30	11 RSSQSLVHS <u>N</u> GNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	12 RSSQSLVHS <u>N</u> GNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTH <u>E</u> PFT	172
	13 RSSQSLVHS <u>H</u> GNTYLH	123	KVSNRFS	150	SQSTH <u>Y</u> PFT	169
	14 RSSQSLVHS <u>H</u> GNTYLH	123	KVSNRFS	150	<u>N</u> QSTH <u>V</u> PFT	173
	15 RSSQSLVHS <u>N</u> GNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQ <u>T</u> H <u>V</u> PFT	174
35	16 RSSQSLVHS <u>N</u> GNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	17 RSSQSLVHS <u>H</u> GNTYLH	123	KVSNRFS	150	SQSTH <u>Y</u> PFT	169

	18	RSSQSLVHS <u>N</u> GN TYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	19	RSSQSLVHS <u>N</u> GN TYLH	124	KVSNRFS	150	SQSM <u>H</u> VPFT	175
	20	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	21	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
5	22	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	23	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	24	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	25	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	26	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
10	27	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	28	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	29	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	30	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	31	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
15	32	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	33	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	34	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	35	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	36	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
20	37	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	38	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	39	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	40	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	41	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
25	42	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	43	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	44	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	45	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	46	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
30	47	RSS <u>K</u> SLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	48	RSSQS <u>V</u> VHSRGNTYLH	126	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	49	<u>V</u> SSQSLVHSRGNTYLH	127	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	50	RSS <u>A</u> SLVHSRGNTYLH	128	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	51	RSSQSL <u>K</u> H SRGNTYLH	129	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
35	52	RSSQSL <u>R</u> H SRGNTYLH	130	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	53	RSS <u>R</u> SLVHSRGNTYLH	131	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168

	54	RSHQSLVHSRGNTYLH	132	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	55	RSSQSLVHSRGNTFLH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	56	RSSQSLVHNRGNTYLH	134	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	57	RSSQSLVHSRGRTYLH	135	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
5	58	RSSQSLVHRRGNTYLH	136	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	59	RSSQSLVHSRGNTYTH	137	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	60	RSSQSLVHSRGNTYSH	138	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	61	RSSQSLVHSRGNTYHH	139	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	62	RSSQSLVHARGNTYLH	140	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
10	63	RSSQSLVHSRGNTYFH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	64	RSSQSLVHSRGNTWLH	141	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	65	RSSQSLVHSRGNVYLH	142	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	66	RSSQSLVHSRGKTYLH	143	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	67	RSSQSLVHLRGNTYLH	144	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
15	68	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFI	167	SQSTHLPFT	168
	69	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQITHLPFT	176
	70	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTSLPFT	177
	71	RSSKSLVHSRGNTFLH	145	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	72	RSSKSLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
20	73	RSSQSLRHSRGNTFLH	146	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	74	RSSQSLVHSRGNTFLH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	75	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	76	RSSQSLVHSRGNTFLH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	78	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
25	79	RSSQSLKHSRGNTYLH	129	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	80	RSSQSLKHSRGNTYLH	129	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	82	RSSQSLVHSRGNTFLH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	84	RSSQSLVHSRGNTFLH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	85	RSSKSLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
30	86	RSSKSLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	87	RSSQSLKHSRGNTFLH	147	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	88	RSSQSLVHSRGNTFLH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	89	RSSQSLRHSRGNTYLH	130	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	91	RSSQSLKHSRGNTYLH	129	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
35	92	RSSQSLKHSRGNTFLH	147	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	93	RSSQSLKHSRGNTYLH	129	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168

	94	RSSQSLVHSRGNT <u>EL</u> H	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	95	RSSQSL <u>R</u> HSGRGNTYLH	130	KVSNR <u>FH</u>	152	SQSTHLPFT	168
	96	RSS <u>K</u> SLVHSRGNTYLH	125	KV <u>A</u> NRFS	153	SQSTHLPFT	168
	97	RSS <u>K</u> SLVHSRGNT <u>EL</u> H	145	KVS <u>V</u> RFS	154	SQSTHLPFT	168
5	98	RSSQSLVHSRGNT <u>EL</u> H	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	99	RSSQSLVHSRGNT <u>EL</u> H	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	100	RSS <u>K</u> SLVHSRGNTYLH	125	KVSN <u>N</u> FS	155	SQSTHLPFT	168
	101	RSSQSLVHSRGNT <u>EL</u> H	133	KV <u>D</u> NRFS	156	SQSTHLPFT	168
	102	RSS <u>R</u> SLVHSRGNT <u>EL</u> H	148	KV <u>T</u> NRFS	157	SQSTHLPFT	168
10	103	RSSQSL <u>R</u> HSGRGNTYLH	130	KVSN <u>I</u> FS	158	SQSTHLPFT	168
	104	RSS <u>K</u> SLVHSRGNT <u>EL</u> H	145	KVS <u>T</u> RFS	159	SQSTHLPFT	168
	105	RSSQSL <u>R</u> HSGRGNTYLH	130	KVSNRFS	150	SQSTH <u>Y</u> PFT	169
	106	RSSQSLVHSRGNT <u>EL</u> H	133	KV <u>R</u> NRFS	160	SQSTHLPFT	168
	107	RSSQSL <u>R</u> HSGRGNTYLH	130	KV <u>P</u> NRFS	161	SQSTH <u>Y</u> PFT	169
15	108	RSSQSLVHSRGNT <u>EL</u> H	133	KVSNR <u>FV</u>	162	SQSTH <u>Y</u> PFT	169
	109	RSSQSL <u>R</u> HSGRGNTYLH	130	KVSNR <u>I</u> S	163	SQSTHLPFT	168
	110	RSS <u>R</u> SLVHSRGNTYLH	131	KVSNR <u>F</u> T	164	SQSTH <u>Y</u> PFT	169
	111	RSSQSL <u>R</u> HSGRGNT <u>EL</u> H	146	KVSNR <u>N</u> S	165	SQSTHLPFT	168
	112	RSS <u>K</u> SLVHSRGNTYLH	125	KV <u>H</u> NRFS	166	SQSTHLPFT	168
20	113	RSSQSLVHSRGNT <u>EL</u> H	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	114	RSSQSL <u>K</u> HSGRGNTYLH	129	KVS <u>T</u> RFS	159	SQSTHLPFT	168
	115	RSSQSLVHSRGNT <u>EL</u> H	133	KVSNR <u>F</u> I	167	SQSTHLPFT	168
	116	RSSQSL <u>K</u> H <u>S</u> HGNTYLH	149	KVSNR <u>F</u> I	167	SQSTHLPFT	168
	117	RSS <u>K</u> SLVHSRGNTYLH	125	KVSNR <u>F</u> I	167	SQSTHLPFT	168
25	118	RSSQSLVHSRGNT <u>EL</u> H	133	KVSNR <u>F</u> I	167	SQSTHLPFT	168
	119	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNR <u>F</u> I	167	SQSTHLPFT	168
	120	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNR <u>F</u> I	167	SQSTH <u>Y</u> PFT	169
	121	RSSQSL <u>K</u> HSGRGNT <u>EL</u> H	147	KVSNR <u>F</u> I	167	SQSTH <u>Y</u> PFT	169
	122	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNR <u>F</u> I	167	SQSTHLPFT	168
30	123	RSS <u>K</u> SLVHSRGNTYLH	125	KVSNR <u>F</u> I	167	SQSTHLPFT	168
	124	RSS <u>R</u> SLVHSRGNTYLH	131	KVSNR <u>F</u> I	167	SQSTHLPFT	168
	125	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
	126	RSS <u>R</u> SLVHSRGNTYLH	131	KVSNR <u>F</u> I	167	SQSTHLPFT	168
	127	RSS <u>R</u> SLVHSRGNTYLH	131	KVSNR <u>F</u> I	167	SQSTHLPFT	168
35	128	RSSQSL <u>K</u> HSGRGNTYLH	129	KVSNR <u>F</u> I	167	SQSTH <u>Y</u> PFT	169
	129	RSS <u>K</u> SLVHSRGNTYLH	125	KVSNR <u>F</u> I	167	SQSTHLPFT	168

130	RSSQSLKHSRGNTYLH	129	KVSNRFI	167	SQSTHLPFT	168
131	RSSKSLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFI	167	SQSTHLPFT	168
132	RSSKSLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFI	167	SQSTHLPFT	168

5 Konsensus:

SEK ID nr.: 247	SEK ID nr.: 248	SEK ID nr.: 249
X ₁ SX ₃ X ₄ SX ₆ X ₇ HX ₉ X ₁₀ GX ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ H	X ₁ VX ₃ X ₄ RX ₆ X ₇	X ₁ QX ₃ X ₄ X ₅ X ₆ PFT
X ₁ er R eller V	X ₁ er K eller I	X ₁ er S eller N
X ₃ er S eller H	X ₃ er S,A,D,T,R,H eller P	X ₃ er S eller T
10 X ₄ er Q,K,R eller A	X ₄ er N,V eller T	X ₄ er T,L eller M
X ₆ er V eller L	X ₅ er R,I eller N	X ₅ er H eller S
X ₇ er R,V eller K	X ₆ er F,I eller N eller	X ₆ er L,I,V,E eller Y
X ₉ er S,N,R,A eller L	X ₇ er S,H,I,T eller V	
X ₁₀ er H,R,N eller Y		
15 X ₁₂ er N,K eller R		
X ₁₃ er T eller V		
X ₁₄ er F,Y eller W		
X ₁₅ er L,T,S,H eller F		

20

EKSEMPLER

Eksempel 1 ELISA 1: Antistoffbinding til IL-17 fra forskjellige arter

Et eksempel på ELISA-analyse for å måle binding av antistoffer til IL-17 anvender for-

25 seglede Costar 3366 mikrotiterplater som er overtrukket over natt ved 4°C med 50 µl

1,0 µg/ml humant IL-17 pr. brønn (R&D Systems, #317-IL/CF) i karbonovertrekkings-

buffer (50 mM natriumkarbonat, pH 9,0). Alternativt, så blir muse-, rotte-, kanin- eller

cynomolg ape IL-17 anvendt. Humant IL-22 (R&D Systems) anvendes som et kontroll-

antigen. Kanin- og cynomolg ape IL-17 er ikke kommersielt tilgjengelig og krever der-

30 for kloning og uttrykk, eller artifiisiell syntese, i henhold til fremgangsmåter kjent i fag-

feltet som gjør bruk av aminosyresekvensene for IL-17 til de forskjellige artene tilveie-

bragt i fig. 2 (SEK ID nr.9 og 10). Eksempler på nukleotidsekvenser som koder for IL-

17 til de forskjellige artene er vist i SEK ID nr. 250-254.

35 Platen blir deretter blokkert ved å tilsette 100 µl blokkeringsbuffer (Pierce #37515).

Platen inkuberes i 1 time ved 37°C og vaskes deretter tre ganger i vaskebuffer (PBS pH

7,4 og 0,05% Tween). Deretter blir 50 µl av enten prøveantistoff eller kontrollantistoff (fortynnet til forskjellige konsentrasjoner i PBS pH 7,4, f.eks. 2, 0,4, 0,08, 0,016, 0,0032 og 0 µg/ml) tilsatt til hver brønn og platen inkuberes videre i 1 time ved 37°C. Platen vaskes så tre ganger med vaskebuffer før 50 µl pr. brønn med humant anti-humant κ-alkalisk fosfatase konjugert fortynnet til 1:1000 i PBS pH 7,4 blir tilsatt. Testprøvene inkuberes i 1 time ved 37°C. Deretter blir n-nitrofenylfosfat dinatriumsalt (PNPP, Pierce #37620) laget ved å oppløse det i dietanolaminsubstratbuffer i henhold til produsentens instruksjon og 50 µl blir tilsatt til hver brønn. Fargeutvikling skjer i ca. 10 minutter ved romtemperatur og deretter blir fargesignal målt ved en absorbans på 405 nm ved å anvende enhver passende ELISA-plateleser. Graden av binding er proporsjonal til fargesignalproduksjon.

Antistoffer ifølge oppfinnelsen binder humant IL-17 i en ELISA-analyse som beskrevet her, men binder ikke rotte- eller muse-IL-17. Det forventes, etter Biacore-dataene i eksempel 4 som demonstrerer at antistoffer ifølge oppfinnelsen binder humant IL-17, at antistoffene ifølge oppfinnelsen ville også vise binding til ape-IL-17 i en ELISA-analyse som beskrevet her.

Eksempel 2. ELISA II: Antistoffbinding til proteiner i IL-17-familien

En ELISA anvendes for å måle om antistoffene ifølge oppfinnelsen selektivt og/eller helst binder spesielt humane IL-17-medlemmer (f.eks. IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E eller IL-17F) eller humant IL-22 (negativ kontroll).

I et eksempel på en analyse, blir ELISA-platebrønner (Nunc Immuno Maxisorp) overtrukket med 100 µl (0,5 µg/ml i 1x overtrekkingsbuffer (BioFxx)) til IL-17-familiemedlemsproteiner (R&D Systems) forsegle og inkubert over natt ved 4°C. Løsningen i brønnen blir fjernet ved å snu og slå og blokkeringsbuffer (200 µl, 1,5% BSA i PBS) tilsettes. Platene inkuberes på en roterende rister i 30 minutter ved romtemperatur. Deretter blir 100 µl av et antistoff som skal testes tilsatt pr. brønn ved forskjellige konsentrasjoner (f.eks. 2, 0,4, 0,08, 0,016, 0,0032 og 0 µg/ml). Platene inkuberes igjen over natt (4°C) etterfulgt av oppvarming i en roterende rister (60 minutter romtemperatur). Hver platebrønn blir så vasket fem ganger med buffer (1x Ish-buffer, BioFX). Etter vasking, blir et passende kommersielt tilgjengelig HRP-konjugert sekundært antistoff (1:2000 i PBS med 1,5% BSA) tilsatt (100 µl/brønn). Plater inkuberes igjen på en roterende rister (60 minutter romtemperatur) etterfulgt av buffervasking (5x) som beskrevet over. Det kolorimetrisk signalet som blir utviklet ved å tilsette TMB (100 µl/brønn)

inntil metting (ca. 3-5 minutter) og deretter blir videre utvikling avsluttet ved å tilsette stoppløsning (100 µl/brønn, BioF_x). Fargesignalet måles ved 450 nm absorbanse ved å anvende enhver passende ELISA-plateleser. Graden av binding er proporsjonal med fargesignalproduksjon. Antistoffer ifølge oppfinnelsen (f.eks. Fabs 103, 104, 118, 121, 126 og 131 som beskrevet i tabell 1) binder spesifikt humant IL-17 (dvs. IL-17A), men under lignende betingelser binder de ikke høyere enn bakgrunnsnivåer for humant IL-17B, humant IL-17C, humant IL-17D, humant IL-17E, humant IL-17F, muse-IL-17 eller humant IL-22.

10 Eksempel 3 Isolering og aktivering av celler for å klonе IL-17

A. Rottesplenocytter

Ved å anvende sterile pinsetter og sakser, blir milten fjernet fra en rotte som er drept med CO₂-inhalling og milten blir overført til et rør som inneholder 5 ml RPMI 1640-medium + 10% fetalt bovint serum og penicillin/streptomycin (mediumløsning). Hell innholdet av røret inn i en 10 cm petriskål og fjern fett fra milten. Homogeniser milten forsiktig ved å anvende et par med fullstendig matte, preautoklaverte mikroskopiglass. Vask celler av glassene ved å anvende mediumløsning, pipetter noen få ganger og filtrer celler gjennom cellestrainer (Fisher Scientific). Vask celler en gang med medieløsning, tell celler og resuspender dem til en sluttkonsentrasjon på 2×10^7 celler/ml i 80 ml. Tilsett celleløsning til en T150-flaske, tilsett konkanavalin A til en sluttkonsentrasjon på 3 µg/ml og inkuber ved 37°C i ca. 15 timer. Høst cellene, vask med PBS, frys cellepelletten på tørris og fortsett øyeblikkelig med standard RNA-isoleringsprosedyrer.

B. Cynomolg ape- og kanin-perifer blod mononukleære celler (PBMC)

Fyll ca. 7 ml fullblod fra cynomolg ape eller 10 ml fullblod fra New Zealand hvit kanin i et BD Vacutainer™ CPT™ system for separering av mononukleære celler fra fullblod. Sentrifuger CPT-celletillagingsrøret i 20 minutter ved 1500 x gravitet i en horisontal utsvingningsbøtterotor. Samle lymfocytene og monocytene ved interfasen, vask to ganger med medieløsning, tell og resuspender i medieløsning til en sluttkonsentrasjon på 10^6 celler/ml. Tilsett konkanavalin A til en sluttkonsentrasjon på 3 µg/ml og inkuber ved 37°C i ca. 15 timer. Høst cellene, vask med PBS, frys cellepelletten på tørris og fortsett øyeblikk til standard RNA-isoleringsprosedyrer.

Eksempel 4 Å måle bindingskinetikkonstanter

Et BIACORE® 2000 instrument anvendes for å måle antigenantistoffbindingskinetikker og affinitet. Instrumentet benytter de optiske egenskapene til overflateplasmonresonans

for å detektere forandring i proteinkonsentrasjon av interagerende molekyler innen en dekstranbiosensormatriks. Untatt der det er nevnt, så er alle reagenser og materialer kjøpt fra BIACORE® AB. Alle målinger utføres ved 25°C. Prøver resuspenderes i HBS-EP-buffer til en sluttkonsentrasjon på 2 µg/ml (150 mM natriumklorid, 3 mM EDTA, 0,005% (vekt/volum) overflateaktivt stoff P-20 og 10 mM HEPES, pH 7,4). Protein A immobiliseres på flytende celler 1 til 4 på en CM4-sensorchip ved et nivå på 500 responsenheter ved å anvende et aminkoblingskitt.

Binding evalueres ved å anvende flere analyttiske sykler. Hver syklus utføres ved en strømningshastighet på 50 µl/minutt og består av de følgende trinnene: injeksjon av ca. 20 µl av en antistoffsammensetning på 2 µg/ml for å fange 100-200 responsenheter, injeksjon av 250 µl humant IL-17, cynomolg ape IL-17, New Zealand hvit kanin IL-17, rotte IL-17 eller muse IL-17 (som starter ved 10 nM og som anvender to ganger seriefortynninger for hver syklus) etterfulgt av 20 minutter for dissosiering og regenerering ved å anvende 30 µl av 10 mM glycinhydroklorid, pH 1,5. Assosiasjons- og dissosiasjonshastigheter for hver syklus evalueres ved å anvende en "1:1 med masseoverføring"-bindingsmodell i BIAevalueringssoftwaren.

Fullengde mAb'er 103, 104, 118, 121, 126 og 131 (se tabell 1) som har en IgG₄ Fc-region som utviser høy affinitetsbinding til humant IL-17 og til ape IL-17 med en K_D mindre enn 5 pM, en k_{av} saktere enn $2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ og en $K_{på}$ på minst $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. K_D og k_{av} er forbedret (dvs. lavere K_D , saktere k_{av}) i disse variant-mAb'ene i forhold til Fab 2321 mAb (foreldre-Fab til f.eks. Fab 103 og 104) som omfatter en musevariabel region [SEK ID nr. 261 (VH av 2321), 262 (VL av 2321)], en human IgG₄ tung kjedekonstant region (SEK ID nr. 260) og en κ -lett kjedekonstant region (SEK ID nr. 272). Antistoffer ifølge oppfinnelsen utviser binding som ikke er større enn bakgrunnsnivåer for muse-IL-17 eller rotte-IL-17; ingen binding detekteres opp til 200 nM muse-IL-17 og ingen binding detekteres opp til 1 µM rotte-IL-17. Når fullengde mAb'ene 103, 104, 121 og 126 testes, under de samme betingelsene som er beskrevet over, for binding til cynomolg ape IL-17 og kanin IL-17; så er binding til kanin IL-17 svakt og bifasisk mens binding til ape-IL-17 ligner på binding til menneske. Spesifikke verdier for visse mAb'er (verdier er rapportert som gjennomsnitt $\pm$ standard feil av gjennomsnitt) av oppfinnelsen når de testes i denne analyse er opplistet i tabell 4 under. Det blir overveid at Fc-regioner forskjellig fra IgG₄, ikke signifikant ville påvirke K_D og k_{av} .

Tabell 4

HUMANT IL-17	$k_{pa} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{av} (s^{-1})$	$K_D (pM)$
mAb 103	$11 (\pm 2) \times 10^6$	$1.5 (\pm 0.7) \times 10^{-5}$	$1.4 (\pm 0.7)$
mAb 104	$7.7 (\pm 0.6) \times 10^6$	$1.1 (\pm 0.5) \times 10^{-5}$	$1.7 (\pm 0.9)$
mAb 118	5×10^6	2×10^{-5}	3.9
mAb 121	$10 (\pm 0.9) \times 10^6$	$1.5 (\pm 0.3) \times 10^{-5}$	$1.6 (\pm 0.4)$
mAb 126	$7.5 (\pm 0.4) \times 10^6$	$1.3 (\pm 0.2) \times 10^{-5}$	$1.8 (\pm 0.3)$
mAb 131	5.4×10^6	1.6×10^{-5}	2.9
*Foreldre 2321 mAb	2.7×10^6	6×10^{-5}	7
CYNO IL-17	$k_{pa} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{av} (s^{-1})$	$K_D (pM)$
mAb 103	8.8×10^6	1.1×10^{-5}	1.3
mAb 104	9.4×10^6	0.5×10^{-5}	0.5
mAb 121	$7.8 (\pm 0.3) \times 10^6$	$0.7 (\pm 0.2) \times 10^{-5}$	$1.1 (\pm 0.04)$
mAb 126	$7.9 (\pm 0.3) \times 10^6$	$0.7 (\pm 0.6) \times 10^{-5}$	$0.8 (\pm 0.8)$
KANIN IL-17^a	$k_{pa} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{av} (s^{-1})$	$K_D (pM)$
mAb 103	1.8×10^5 10.6×10^6	3.6×10^{-4} 19.2×10^{-2}	2 18.1
mAb 104	$1.0 (\pm 0.1) \times 10^5$ $4.0 (\pm 2) \times 10^6$	$1.8 (\pm 1.0) \times 10^{-4}$ $7.0 (\pm 2) \times 10^{-2}$	$1.9 (\pm 1.3)$ $20 (\pm 6)$
mAb 121	$8 (\pm 6) \times 10^5$ $17 (\pm 11) \times 10^6$	$4 (\pm 3) \times 10^{-4}$ $2.1 (\pm 0.2) \times 10^{-2}$	$0.51 (\pm 0.13)$ $1.5 (\pm 1.0)$
mAb 126	$1.5 (\pm 0.6) \times 10^5$ $9 (\pm 3) \times 10^6$	$1.7 (\pm 0.5) \times 10^{-4}$ $11 (\pm 2) \times 10^{-2}$	$1.3 (\pm 0.6)$ $14 (\pm 4.0)$

^a Binding er bifasisk og data passer med heterogen ligandbindingsmodell som resulterer i to affiniteter.

5

Eksempel 5 IL-17 reseptor/anti-IL-17-antistoffbindingskonkurransestudier

Dette eksempel viser at antistoffene ifølge oppfinnelsen konkurrerer for binding til IL-17 med IL-17-reseptoren.

BIACORE-bindingsstudier utføres ved å anvende IL-17-reseptor Fc-fusjonsproteinet (R&D #177-IR). For å vise at IL-17-reseptor Fc-fusjonsproteinet binder humant IL-17, så blir en BIACORE-analyse utført i BIACORE-bindingsbuffer (HBS-EP) + 1 mg/ml BSA ved 25°C på et BIACORE 2000-instrument. En CM4-chip anvendes med ca. 600 responsenheter av protein A immobilisert på strømningsceller 1, 2 og 3 til chipen. Ca. 100 responsenheter av IL-17-reseptor Fc-fusjonsprotein fanges på strømningscelle 2 på chipen. Humant IL-17 blir så utsatt for strømningsceller 1 og 2 i konsentrasjoner i området fra 600 nM til 9,4 nM. Etter hver 250 µl injeksjon av human IL-17, så får komplekset lov til å dissosiere i ca. 12 minutter ved å kjøre buffer over chipen. På slutten av dissosieringen blir en 20 µl injeksjon av 100 mM glycin pH 1,5 anvendt for å regenerere chipen før den neste syklusen av binding begynner. Strømningscelle 1 blir anvendt som en referansestrømningscelle. Dataene tilpasses ved å anvende "bivalent analytt"-modellen i BIAevalueringsversjon 3.2 softwaren. Resultatene indikerer at denne interaksjon har en avhastighet på $1,06 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, en rask avhastighet på $20,3 \text{ s}^{-1}$ og en langsom avhastighet på $1,63 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Derfor har denne interaksjon en K_D eller bindingsaffinitet på 1,5 nM og 0,19 mM som er mye svakere enn bindingsaffinitetene til antistoffene ifølge oppfinnelsen for humant IL-17.

Binding for konkurranseeksperimentet måles også i HBS-EP + 1 mg/ml BSA ved 25°C på et BIACORE 2000-instrument med en CM4-chip. Ca. 1000 responsenheter av et antistoff ifølge oppfinnelsen immobiliseres på strømningsceller 2, 3 og 4 av chipen; strømningscelle 1 er blank. Ved å anvende en strømningshastighet på 50 µl/ml, blir 25 µl 500 nM humant IL-17 injisert over alle fire strømningsceller, og danner antistoff:antigenkomplekset på overflaten av chipen. Etter at injeksjonen er ferdig og komplekset dannet, blir 250 µl av 500 nM humant IL-17-reseptor Fc-fusjonsprotein injisert over alle fire strømningsceller. På slutten av denne injeksjonen, blir en 25 µl injeksjon av 100 mM glycin pH 1,5 anvendt for å regenerere chipen. Det samme bindingseksperimentet ble så repetert ved å anvende en 250 µl injeksjon av buffer istedenfor IL-17-reseptor Fc-fusjonsprotein.

Bindingsprofilene for både reseptorinjeksjonen over antistoff:antigenkomplekset og for bufferkontrollinjeksjonen over antistoff:antigenkomplekset er identisk. Dette indikerer at det ikke er noen bindings seter tilgjengelig for det dimere IL-17 til å binde seg til sin reseptor når det er bundet til et antistoff ifølge oppfinnelsen. Dette resultat indikerer også at reseptoren ikke er i stand til å "dra" IL-17 vekk fra noen av antistoffene med en

gang komplekset er dannet. Disse antistoffer kan hemme humant IL-17 fra å binde seg til dens reseptor, og dermed nøytralisere biologisk aktivitet av humant IL-17.

Eksempel 6A In vitro IL-8-reporteranalyse

- 5 For å teste evnen et antistoff ifølge oppfinnelsen har til å nøytralisere eller i å antagonisere en IL-17-bioaktivitet, kan man benytte IL-8-reporteranalysen som er beskrevet her. Denne tilnærmingsmåten kan også anvendes for å bestemme potensen av Fab'er eller mAb'er ifølge oppfinnelsen i en cellebasert analyse. Den humane HS27-cellelinjen (ATCC #CRL-1634) utskiller IL-8 som respons på IL-17. Den IL-17-induserte IL-8-utskillelsen hemmes ved å nøytralisere anti-IL-17-antistoffene (se f.eks. *J. Imm.* 155:5483-5486, 1995 eller *Cytokine* 9:794-800, 1997). Følgelig, så bør IL-17-indusert IL-8-utskillelse skje utvunget hvis tilstrekkelig IL-17 tilsettes til HS27-cellene i fraværet av nøytraliserende anti-IL-17-antistoff.
- 15 HS27-celler opprettholdes i analysemedium: DMEM høy glukosemedium som mangler fenolrødt (Invitrogen #31053-028) med 10% fetalt bovint serum, 4 mM L-glutamin, 1 mM natirumpyruvat, penicillin G (100 U/500 ml) og streptomycin (100 µg/500 ml). Celler dyrkes i T150-flasker inntil de er ca. 80-90% konfluente dagen for analysen. Humant IL-17 (R&D Systems, #317-IL-050) rekonstitueres i steril PBS uten CA^{2+} og Mg^{2+} oppbevart frossen, nytint for anvendelse og fortynnet til 200 ng/ml i analysemedium. En 50 µl alikvot av det fortynnete IL-17 tilsettes til hver brønn av en 96 brønners flatbunnet vevsdyrkningsplate (Falcon #35-3072) hvor de ytre brønnene er tomme. Duplikate brønner anvendes som kun en mediekontroll (100 µl/brønn) og kun IL-17-kontroll (100 µl/brønn). Testing utføres i duplikat eller triplikat. Sterile fullengde mAb-proteiner fortynnes til en maksimal konsentrasjon på 24 µg/ml i analysemedium. Seriefortynninger (vanligvis 1:5) lages i en separat analyseplate og 50 µl av Fab-prøvene ved forskjellige konsentrasjoner tilsettes til brønnene som inneholder IL-17 og inkuberes deretter ved 37°C i 1 time. Analysemedium alene anvendes som en negativ kontroll.
- 25
- 30 HS27-celler (vanligvis ca. 20 000 celler i 100 µl analysemedium) tilsettes til hver brønn av platen som inneholder Fab + IL-17 (eller kontroller) og inkuberes i ca. 48 timer ved 37°C. Mediesupernatantene blir så samlet etter sentrifugering av 96 brønners platene i 5 minutter ved 500 ganger g og fortynnet 1:15 eller 1:10 i analysemedium. Nivået av IL-17-nøytralisering måles ved å bestemme IL-8-mengden i supernatant ved å anvende et kommersielt ELISA-kitt i henhold til produsentens instruksjon untatt for analysemediet som substitueres for standard fortynner og substratvolum er 100 µl/brønn (R&D Sys-
- 35

tems, ELISA D-8000C eller R&D DuoSet ELISA #DY208hIL-8). ELISA-målinger (450 nm) tas på en mikropateleser. Kalibreringskurver skaffes tilveie ved å anvende en 4 parameter logistikktilpassing med IL-8-verdier (pg/ml) bestemt fra kalibreringskurvene ved å anvende standard statistiske teknikker. IC₅₀-verdier skaffes tilveie ved å anvende standard statistiske teknikker.

Fullengde mAb'er 103, 104, 121 og 126 ifølge oppfinnelsen (med IgG₄ Fc-region), når de testes i analysen som er beskrevet (2-4 replikater), har en gjennomsnittlig IC₅₀ (basert på en estimert molekylvekt på 150 kD for hvert mAb) på mellom 450 og 500 pM med området for alle målte verdier mellom 365 og 618 pM.

Eksempel 6B In vitro GRO α -reporteranalyse

For å teste evnen et antistoff ifølge oppfinnelsen har til å nøytralisere eller å antagonisere en IL-17-bioaktivitet, kan man benytte den følgende cellebaserte analysen. IL-17 kan stimulere epitelceller og andre celler til å skille ut GRO α . Evnen et antistoff ifølge oppfinnelsen har til å nøytralisere IL-17-indusert GRO α -utskillelse fra den humane kolorektale adenokarsinomaepiteliale cellelinjen HT-29 testes i denne analyse.

For å teste om human IL-17 induserte GRO α -utskillelse på en doseavhengig måte fra HT-29-cellene, så ble rekombinant IL-17 (R&D Systems #317-IL-050/CF; rekonstituert i steril Dulbecco PBS uten Ca²⁺ og Mg²⁺ (D-PBS)) fortynnet (til 4,5 μ g/ml; 3x den høyeste testkonsentrasjonen) i analyse/dyrkningsmedium (McCoy's 5A (Invitrogen); 10% FBS (Invitrogen); penicillin G (100 U/500 ml); og streptomycin (100 μ g/500 ml)). IL-17 seriefortynnes videre (1:5) i analysemedium. Forskjellige konsentrasjoner av IL-17 (0,096 ng/ml - 1,500 ng/ml; 3,0 pM - 46,875 pM) fordeles (50 μ l hver) inn i de indre brønnene til en vevsdyrkningsbehandlet 96 brønners plate. Analysemedium (50 μ l) fordeles i 3 brønner for en "medium alene"-behandling. Testing utføres i triplikat (3 brønner pr. behandling). Platen som inneholder IL-17 i analysemedium inkuberes i ca. 60-90 minutter ved 37°C, 5% CO₂, før tilsetningen av HT-29-celler.

For evaluering av et antistoff ifølge oppfinnelsen, f.eks. mAb 126 med en IgG₄ Fc-region, så blir en konsentrasjon av IL-17 som ga ca. 70% av maksimal GRO α -utskillelse fra HT-29-celler anvendt (60 ng/ml). Rekombinant humant IL-17 (R&D Systems) blir fortynnet (til 240 ng/ml; 4x arbeidskonsentrasjon) i analyse/dyrkningsmedium. Fortynnet IL-17 fordeles (50 μ l) i 60 separate indre brønner av

vevskyldningsbehandlete 96 brønners plater (Becton Dickinson Falcon #35-3072). Analysemedium (50 µl) fordeles i 3 brønner for en "medium alene"-behandling.

Et doseområde til et antistoff ifølge oppfinnelsen som skal testes er vanligvis fra 2,56-
 5 40 000 pM. I en separat fortynningsplate, så blir antistoffet ifølge oppfinnelsen og kontrollantistoffet (sterilt, i 1x PBS, pH 7,4) fortynnet til 160 000 pM i analysemedium. Antistoffet ifølge oppfinnelsen og kontrollantistoffet seriefortynnes videre (1:5) i analysemedium. Hver testkonsentrasjon av antistoffet ifølge oppfinnelsen som skal testes blir så tilsatt (50 µl) til brønner som inneholder IL-17. Testing utføres vanligvis i triplikater.
 10 Analysemedium alene (50 µl) anvendes "medium alene"- og "IL-17 alene"-kontroller. Plater som inneholder IL-17- og antistoffblanding ifølge oppfinnelsen inkuberes i 60-90 minutter ved 37°C, 5% CO₂ før tilsetningen av HT-29-celler.

HT-29-celler (humane kolorektale adenokarsinomaepiteliale celler, ATCC #HTB-38),
 15 opprettholdes i dyrknings/analysemedium i vevskyldningsbehandlete flasker ved å anvende standard teknikker. HT-29-celler dyrkes i vevskyldningsflasker inntil de var 50-80% konfluente på dagen for analysen. På dagen for analysen blir cellene skylt med HBSS (Cambrex #CC-5024) og løsnet fra dyrkningsflaskene med trypsin + EDTA. Trypsinet inaktiveres med fullstendig analysemedium. HT-29-celler blir så sentrifugert
 20 ved 500 x g i 5 minutter ved romtemperatur. Cellepelleten blir så resuspendert i analysemedium og 20 000 HT-29-celler (i 100 µl) tilsettes til hver behandlingsbrønn i 96 brønners plater. Et likt volum av D-PBS tilsettes til hver av de ubrukte hjørnebrønnene (uten celler) for å redusere hjørneeffektene som er et resultat av fordamping. 96 brønners platene ble plassert i en vevskyldningsinkubator (37°C, 5% CO₂) i ca. 48 timer.

25 På slutten av analysene, blir platene sentrifugert (500 x g i 5 minutter ved romtemperatur) og celledyrkningsmediet overføres til polypropylen 96-brønners plater. GROα-nivåer måles med en GROα-sandwich ELISA (R+D Systems DuoSet #DY275), ved produsentens instruksjoner, untatt at analysemediet anvendes som standardfortynningen,
 30 ved anvende 1 x ELISA-vaskebuffer fra BioFX Labs, ved å anvende et prøve- og standardvolum på 50 µl pr. brønn, ved å anvende et substrat fra BioFX Labs (HRP-substrat, #TMBW-1000-01) og ved å anvende en stoppløsning fra BioFX Labs (#LSTP-1000-01) (100 µl pr. brønn). Ved slutten av ELISA-reaksjonene leses platene ved 450 nm på en mikropplateleser. Kalibreringskurver for GROα skaffes tilveie ved å utføre en fire parameter logistikktilpasning. GROα-verdier (konsentrasjon i pg/ml) for prøvene skaffes
 35 tilveie fra kalibreringskurvene. Den humane kolorektale adenokarsinomaepitelialcelle-

linjen HT-29 utskilte GRO α når cellene ble stimulert med IL-17 på en doseavhengig måte (tabell 5). Kontroll humant IgG₄ forårsaket ikke en reduksjon i IL-17-indusert GRO α -utskillelse. Disse resultater (tabell 6) viser at mAb 126 er i stand til fullstendig å nøytralisere human IL-17-indusert GRO α -utskillelse fra HT-29-celler in vitro ved å

5 anvende betingelsene som er beskrevet. IC₅₀-verdien for mAb 126 i denne analyse er ca. 560 pM.

Tabell 5

Humant IL-17 (ng/ml)	AVG GRO α (pg/ml)	STDEV
1,500.00	2,420.4	311.8
300.00	2,047.5	509.9
60.00	1,556.0	209.0
12.00	960.0	24.9
2.40	502.5	12.3
0.48	297.9	6.3
0.10	205.8	4.8
0	149.2	16.7

10 Forkortelser: AVG = gjennomsnitt; STDEV = standard avvik.

Tabell 6

Antistoffkons, pM	mAb 126		IgG ₄ -negativ kontroll	
	AVG GRO α , pg/ml	STDEV	AVG GRO α , pg/ml	STDEV
40,000.0	123.8	1.4	1,297.3	29.4
8,000.0	134.1	6.4	1,419.9	133.4
1,600.0	151.3	9.5	1,370.4	114.7
320.0	1,170.6	56.0	1,388.6	54.1
64.0	1,340.8	59.1	1,380.4	36.0
12.8	1,362.0	21.1	1,346.2	81.6
2.56	1,280.9	56.1	1,243.4	118.3
0 (IL-17 alene)	1,201.4	66.1		
Medium alene	117.2	10.0		

Forkortelser: kons. = konsentrasjon; AVG = gjennomsnitt; STDEV = standard avvik.

Eksempel 7 In vivo nøytralisering av hIL-17

Humant IL-17 er i stand til å binde og stimulere muse-IL-17-reseptoren som fører til en heving og påfølgende utskillelse av muse KC (CXCL1) kjemokin. Tids- og doseområ-

5 deeksperimenter ble gjennomført for å identifisere den optimale dosen av humant IL-17 og den optimale tiden for induksjon av muse KC. Disse eksperimenter indikerer at en 150 µg/mg dose av humant IL-17 og en tid på 2 timer etter IL-17-administrering gir maksimale nivåer av KC i museserum. Fullengdeantistoffer i den foreliggende oppfin-

10 nelsen (f.eks. Fab 126 eller Fab 121 med HCVR operativt koblet til humant IgG₄ Fc, SEK ID nr. 260 [eller SEK ID nr. 278] og LCVR operativt koblet til en human κ-konstant region, SEK ID nr. 263 [eller SEK ID nr. 277]) administreres intravenøst til mus ved 1, 10, 100 og 1000 µg/kg, en time før en subkutan injeksjon av humant IL-17. To timer etter human IL-17-administrering, blir musene avlivet og KC-nivåer bestemt ved ELISA ved å anvende et kommersielt tilgjengelig kitt i henhold til produsentens

15 instruksjon (KC Quantikine, R&D). Isotypetilpassede antistoffer anvendes som negative kontroller. Antistoffene blokkerer evnen humant IL-17 har til å stimulere muse-IL-17-reseptoren og fører til hemming av en heving av muse KC på en doseavhengig måte. Mab126 (et fullengdeantistoff som omfatter Fab 126), ved en dose på 20 µg/mus under betingelsene som er beskrevet, reduserer det gjennomsnittlige KC-nivået med ca. 4

20 ganger sammenlignet med kontrollantistoff som ikke hadde noen effekt. Mab 121, ved en dose på 20 µg/mus under betingelsene som er beskrevet, reduserer det gjennomsnittlige KC-nivået med ca. 3 ganger sammenlignet med kontrollantistoff.

Eksempel 8 Epitopkartlegging

25 To av anti-IL-17-antistoffene (Fab 126 og Fab 104) anvendes for å bestemme at humaniseringen og optimaliseringen av foreldremuse-Fab'en (2321, SEK ID nr. 261 og 262) ikke forandrer epitopbindingsevnen til Fab'ene som resultat fra humanisering og optimalisering av foreldreantistoffet. De humaniserte optimaliserte Fab'ene binder til den samme epitopen som foreldremuse-Fab'en gjør bestemt ved en standard konkurranse-

30 ELISA eller vbed H-D-utbytting og massespektrofotometeranalyse for epitopkartlegging (se f.eks. A. Hoofnagle et al., *Methods Mol. Biol.* 250:283-298, 2004; A. Hoofnagle et al., *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 32:1-25, 2003; A. Baerga-Ortiz et al., *Protein Sci.* 11:1300-8, 2002), derfor ville Fab 1-132 ifølge oppfinnelsen utledet fra det same foreldre-Fab'et forventes å binde den samme epitopen.

Ved å anvende H-D-utbyttingen og massespektrometrianalysen (H/DXMS) for å kartlegge epitopen, blir det bestemt at aminosyrer mellom 80 og 89 [ADGNVDYHMN (SEK ID nr. 275)] i humant IL-17 (SEK ID nr. 1) finnes innen den diskontinuerlige epitopen som antistoffet ifølge oppfinnelsen binder. DGNVDYH (SEK ID nr. 276) er en essensiell sekvens som finnes innen den diskontinuerlige epitopen som antistoffene ifølge oppfinnelsen binder, basert på sammenligningen av sekvensvariasjon av IL-17 blant forskjellige arter og bindingsevne. Å forandre aminosyresekvensen i SEK ID nr. 267 i forbindelse med hele IL-17-sekvensen, resulterer ikke i noen detekterbar binding til det forandrede IL-17 av et antistoff ifølge oppfinnelsen. Antistoffer ifølge oppfinnelsen binder ikke rotte- eller muse-IL-17 ved nivåer som er høyere enn kontrollantistoff.

H/DXMS-analyse anvendes for å identifisere regioner i IL-17 som antistoffene ifølge oppfinnelsen binder. Hastigheten for amidhydrogenutbytting er avhengig av strukturen og løsemiddeltilgjengelighet for amidhydrogenet. Fritt IL-17 eller IL-17/antistoffkompleks i vann blandes med tungt vann (D₂O) for å tillate utbytting av amidprotoner ved deuterium. De ryggradamidgruppene som deltar i proteinbinding, beskyttes fra utbytting og forblir protonerte. Disse regioner blir så identifisert ved peptidproteolyse, koblet med LC og elektrosprayioniseringmassespektrometri. Humant IL-17 som inneholder en C-terminal His- og Flag-tag (IL-17-Flis) uttrykkes og renses fra GS-CHO-celler ved å anvende en IMAC-kolonne. To 10 µg alikvoter (7,7 µl) av IL-17-Flis-løsning overføres til 2 mikrokon og 100 µg av enten mAb 104 eller mAb 126 (molar forhold mellom IL-17/Mab = ½) tilsettes til mikrokon. 20 µg IL-17 Flis-løsning overføres til et annet mikrokon og ingen antistoff tilsettes. Deretter blir 1x PBS-buffer tilsatt til hver mikrokon til sluttvolum på ca. 180 µl og sentrifugert ved 14 000 g i 14 minutter. Deretter blir 150 µl 1x PBS-buffer tilsatt til hver mikrokon og sentrifugert ved 14 000 g i 14 minutter. Disse trinn er nødvendige for å sikre at det frie antigenet og antigen:antistoffkomplekset er i identiske bufferbetingelser.

Proteindelen samles og sluttvolumet justeres til 50 µl (kompleks) eller 80 µl (kun IL-17 Flis) med 1x PBS. 6 µl IL-17-Flis eller kompleks av IL-17-Flis og mAb-kompleks overføres til et mikroplastisk rør og 14 µl 100% D₂O tilsettes til det og resulterer i 70% D₂O i prøven. Løsningen inkuberes ved omgivelsestemperatur i 10 minutter. Utbyttingen bremses øyeblikkelig, kuttes ved å tilsette 20 µl 1% maursyreløsning og 2 µl 2 mg pr. ml pepsinløsning, og inkuberes ved romtemperatur i 30 sekunder eller ved 0°C i 10 minutter. Kuttingen injiseres umiddelbart på en kolonne manuelt. Waters 2795 HPLC og Micromass LTC Premier anvendes for alle analyser. HPLC-strøm fra HPLC-pumpe er

forbundet med et metallrør (ca. 1 ml), til manuell injektor, til en Zorbax C18-kolonne (2,1x50 mm) som kjører under disse betingelsene (kolonnetemperatur: 0°C; mobil fase C: 0,15% maursyre i H₂O, D: 0,12% maursyre i ACN; kjøretid: 23 minutter). Kolonnen ekvilibrerer med 98% A (0,15% maursyre vandig løsning) og 2% B (0,12% maursyre i acetonitril) ved en strømningshastighet på 0,2 ml/min. En gradienteluering utføres fra 2% til 10% B i løpet av 0,5minutter, deretter til 40% B i løpet av 14,5 minutter og deretter 90% B i løpet av 1 minutt med 2 minutters stans og så returneres til 2% B i 1 minutt. Prøven fra HPLC analyseres ved hjelp av massespektrometer som opereres med disse betingelsene (ionemodus: positiv; massescanområde: 300-2000; prøvecone volt: 80; oppløsningsgasstrømning (L/t.): 700; oppløsningstemperatur: 300°C). Metallrøret, injeksjonssløyfen og kolonnen nedsenkes i isvann gjennom analysen. Massespekter for hver peptisk peptid fra IL-17 skaffes tilveie etter H/D-utbytting med eller uten et anti-IL-17 mAb som ble testet. For små peptider, blir den gjennomsnittlige massen til hvert peptid beregnet basert på dets isotopiske ioner og intensiteter. For større peptider, blir de gjennomsnittlige massene skaffet tilveie fra utpakkede massespekter etter intern kalibrering.

Når antistoff danner et kompleks med IL-17, er bindingsregionen (epitopen) til IL-17 beskyttet fra løsemidlet. Dette fører til saktere amidhydrogenutbyttingshastigheter sammenlignet med de til IL-17 alene. Ved å sammenligne massen til peptider fra den frie og fra komplekset etter deuteriumutbytting, så bør peptidene som er beskyttet ved kompleksdannelse være forskjellig fra det korresponderende peptidet i fri IL-17. Tabell 7 under opplister masseforskjeller som skaffes tilveie ved H/DXMS for peptiske peptider av IL-17. Disse peptiske peptidene dekker hele sekvensen til IL-17-Flis. Som dataene i tabellene viser, er masseforskjellen til IL-17-Flis-peptid mellom komplekset og seg selv lik for begge antistoffer som er testet, dvs. de binder den samme epitopen. En hovedmasseforskjell finnes for det peptiske peptidet 24-87+117-133 (dvs. aminosyrer 24 til 87 og 117 til 133 i IL-17) (disse to peptider er sammenbundet gjennom disulfidbinding) og 66-87+117-134, noe som tyder på at rester innen disse regioner er involvert i binding. Fordi disse peptiske peptider er ganske store, så er andre enzymatiske kuttinger nødvendig for å snevre ned spesifikke aminosyrerester som er involvert i binding. I tillegg til disse data, binder ikke antistoffene ifølge oppfinnelsen andre medlemmer av IL-17-familien (IL-17B, C, D, E og F) og de binder heller ikke muse- eller rotte-IL-17. Disse data sammen med sekvenssammenligning og undersøkelser av IL-17-homologistrukturell modell antyder at rester 80-89 finnes innen en ikke-lineær epitop i IL-17 som antistoffene ifølge oppfinnelsen binder.

Tabell 7

Peptisk peptid	IL-17-Flis +mAb 104		IL-17-Flis+ mAb 126	
	Gjennomsnitt (n=3)	SD	Gjennomsnitt (n=3)	SD
1-23+98 -116	-0.36	0.61	-0.78	0.59
24-43	-0.79	0.13	-0.44	0.65
27-42	-0.56	0.17	-0.56	0.38
24-65	-1.32	0.54	-1.17	0.19
54 to 65	-0.17	0.37	-0.53	0.25
24-87+117-133	-3.60	0.38	-4.09	0.29
66- 87+117-134*	-1.94		-2.38	
88 -97	-0.30	0.08	-0.29	0.14
111-116	-0.08	0.07	-0.17	0.08
135 -151	-0.14	0.03	-0.12	0.12

NB: δ -masse skaffes tilveie ved å subtrahere en peptisk peptidgjennomsnittlig masse av IL-17-Flis alene fra den korresponderende peptidgjennomsnittlige massen til IL-17-Flis og antistoffkompleks.

* Disse data er fra en 10 minutters kutting ved 0°C (n = 1). Alle andre er fra omgivelses-temperaturkutting i 0,5 minutter.

Eksempel 9 IL-17 uttrykt i cancertev

Forskjellige humane ikke-cancer- og cancercellelysater festes for tilstedeværelsen av IL-17-protein. Vev (ca. 50-100 mg pr. stykk) hurtigfryses på tørris, tines på is og lyses i 350 μ l TPER-buffer (Pierce #78510) som inkluderer proteasehemmere (Pierce #78410) og fosfatasehemmere i rør som inneholder keramiske lysingskuler (Qbiogene #6913-050; 1,4 mm keramiske kuler i 2,0 ml rør). Rørene plasseres på is i 5-10 minutter og sentrifugeres deretter ved 13 000 x g i 10 minutter ved 4°C og materialet overføres til nye rør for å fjerne debris. Resentrifugeres som beskrevet og overføres til nytt rør. Proteinkonsentrasjon bestemmes ved å anvende en standard BSA-fremgangsmåte. Prøvene analyseres for IL-17 ved å anvende et kommersielt IL-17 ELISA-kitt i henhold til produsentens instruksjoner (R&D #DY317 ved å anvende vaskebuffer, substratløsning og stoppløsning fra BioFX Labs). IL-17-nivåer normaliseres til total proteinkonsentrasjon. IL-17-nivåer er øket mellom to og tre ganger i cancerkolonvev (60 prøver ble testet) sammenlignet med normalt kolonvev (63 prøver testet). IL-17-nivåer er øket i gjennom-

snittlig tre til fire ganger i cancernyrevev (21 prøver testet) sammenlignet med normalt nyrevev (21 prøver testet). IL-17-nivåer i cancerprostatavev (44 prøver testet) er øket sammenlignet med det normale prostatavevet (7 prøver testet). IL-17-nivåene var ikke forhøyet i andre typer tumorvev som ble testet, inkludert bryst, hals, lunge, strupehode, tyroidea, tunge, ovarie og hjerne.

Eksempel 10 IL-17-aktivering av mikrogliale celler

IL-17 induserer en musehjernemikroglial cellelinje (BV-2) til å utskille IFN og IL-12p70. Den BV-2-musemikrogliale cellelinjen [skaffet tilveie fra Scios, med tillatelse fra Elisabeta Blasi (Microbiology University of Perugia, Italia) som opprinnelig isolerte dem (E. Blasi et al., *J. Immunology* 1990, 27:229-237)] ble dyrket på poly-D-lysinoovertrukne vevsdyrkningsflasker, ikke høyere enn 60% konfluens i høy glukose DMEM (Invitrogen #31053-028) med 2 mM L-gutamin (Invitrogen/GIBCO #25030-081), 10% FBS (varmeinaktivert; Invitrogen/GIBCO #10082-147), 1 mM natriumpyruvat (Invitrogen/GIBCO #11360-070), 100 µg/ml normocin (InvivoGen) ved 37°C, 5% CO₂.

På dag 0 for analysen, ble BV-2-celler skylt (Dulbecco's PBS uten Ca²⁺ og Mg²⁺; Invitrogen), løst (0,25% trypsin + EDTA) etterfulgt av trypsininaktivering og deretter sentrifugert (500 x g i 5 minutter ved romtemperatur). Den resulterende cellepelletten ble resuspendert til en celletetthet på ca. 7 000 celler pr. 100 µl dyrkningsmedium. 100 µl celledensjon fordeles i 60 separate indre brønner i poly-D-lysinoovertrukne vevsdyrkningsbehandlete 96 brønners plater. Plater inkuberes som beskrevet, i ca. 48 timer før behandling med IL-17.

På dag 2 av analysen, blir rekombinant muse-IL-17 (mIL-17) (bærerfritt; R&D Systems); rekonstituert i steril Dulbecco's PBS uten Ca²⁺ og Mg²⁺ fortynnet i en polypropylenplate til 1,5 µg/ml (den høyeste testkonsentrasjonen) i dyrkningsmedium. Muse-IL-17 seriefortynnes videre i polypropylenplaten. En positiv kontroll er LPS fortynnet i dyrkningsmedium til 1 µg/ml (den høyeste testkonsentrasjonen). Analysemedium anvendes som en negativ kontroll. Medium blir forsiktig fjernet fra cellene før tilsetning av behandlinger (150 µl/brønn). Testing utføres i triplikat (3 brønner pr. behandling). Separate replikatplater inkuberes i enten 24 timer eller 48 timer ved 37°C, 5% CO₂.

På dagene 3 og 4 av analysen, blir platene sentrifugert (500 x g i 5 minutter, RT), cellekulturmediet blir så overført til polypropylen 96-brønners plater som blir forseglet og

frosset (-80°C). Mediumprøver tines og undersøkes for cytokin- og kjemokinnivåer med et muse 22-pleks multiplekskitt (Linco) i følge produsentens instruksjoner (unntak: en polykarbonatfilterplate med svarte vegger (Millipore) erstatter filterplaten som er inkludert i kittet). Fluorescens leses på et Luminex®-instrument (50 kuler pr. kulesett, lav RP1 gain setting). Data er vist i tabell 8 under.

Standardkurver skaffes tilveie ved å anvende en fire- eller fem-parameter logistikktilpasning. IFN γ - og IL-12p70-verdier (pg/ml) bestemmes fra standardkurvene ved å anvende standard statistiske teknikker.

10

Tabell 8

24 timer etter behandling med IL-17

Konsentrasjon av mIL-17, µg/ml	Gjennomsnitt IFN γ , pg/ml	Gjennomsnitt IL-12p70, pg/ml
1.5	125.87	65.58
0.375	123.89	59.63
0.0938	125.61	67.87
0.0059	58.91	38.12
0.0015	18.78	12.34
Kontroll kun medium	Under deteksjonsgrense	Under deteksjonsgrense
LPS, 1 µg/ml	5.11	51.11
LPS, 0.25 µg/ml	5.07	49.00

48 timer etter behandling med IL-17

Konsentrasjon av mIL-17, µg/ml	Gjennomsnitt, IFN γ , pg/ml	Gjennomsnitt, IL-12p70, pg/ml
1.5	125.87	65.58
0.375	123.89	59.63
0.0938	125.61	67.87
0.0059	58.91	38.12
0.0015	18.78	12.34
Kontroll kun medium	Under deteksjonsgrense	Under deteksjonsgrense
LPS, 1 µg/ml	5.11	51.11
LPS, 0.25 µg/ml	5.07	49.00

Eksempel 11 DSS-induksjonsmodell for irritert Bowel-lidelse

IBD er en kronisk inflammatorisk sykdom som inkluderer Crohn's sykdom og ulcerøs kolitt. IL-17-proteinnivåer er signifikant forhøyet i serum og i kolonvev fra både ulcerøs kolitt og Crohn's sykdomspasienter. Imidlertid er IL-17 ikke detekterbar i serum fra normale individer eller pasienter med infektøs kolitt eller iskemisk kolitt. DSS (dekstrannatriumsulfat) -modellen er en av de eldste og mest representative prekliniske modeller for irritert Bowel-sykdom (IBD). I DSS-modellen (se f.eks. *FASEB Journal*. 2004; 18:1550-1552) blir både akutte og kroniske inflammatoriske lesjoner induisert. Mus har høy grad uniformitet av legioner med å tape kroppsvekt og kolonlengde. Den er reproducerbar med hensyn på tidsforløp og alvorlighet blant individuelle mus. For sykdomsinduksjon, mottar mus 5% DSS (30-40 Kd) i drikkevann i 7 dager. Sykdomsaktivitetsindeks (DAI) som inkluderer hemokkulte positive eller rektale blødninger, løsavføring og tap av kroppsvekt (5-8%) observeres ved ca. dag 8. Kroppsvekt til mus måles hver dag i 2 uker. Mus avlives fra ca. dag 12 til ca. dag 15. IL-17-protein økes signifikant i DSS-behandlet kolon i forhold til naiv. Behandling med IL-17-antistoff kan redusere sykdomsaktivitetsindeksen.

Eksempel 12 EAE-modell for multipel sklerose

EAE er en CD4⁺ T-cellestyrt demyelineringssykdom i sentralnervesystemet (CNS) som tjener som en modell for MS hos mennesker. De patogene mekanismene til EAE-utvikling inkluderer antigenspesifikk T-celleaktivering og Th1-differensiering etterfulgt av T-celle- og makrofaginfiltrering inn i CNS. IL-17 bidrar til patologien av multipel sklerose (MS). Mikromatriseanalyse av MS-lesjoner hos humane pasienter har vist en økning av IL-17 (Lock et al., *Nat. Med.* 8:500-508, 2002). IL-17 mRNA-uttrykkende mononukleære celler (MNC) i blod og cerebrospinal væske er signifikant forhøyet i et antall MS-pasienter og høyere antall IL-17 mRNA-uttrykkende blod MNC ble detektert under MS klinisk forverring sammenlignet med remisjon. EAE blir signifikant undertrykket i IL-17 knock out-mus (Nakae et al., *J. Immun.* 171:6173-6177).

Eksemplet som er beskrevet her, viser at IL-17-protein er øket i ryggmargen til EAE-mus og behandling med et anti-muse-IL-17-antistoff reduserer EAE-kilde i den aktive EAE-modellen. For sykdomsinduksjon, blir 8-9 uker gamle hunnlige C57BL/6-mus subkutan immunisert på dag 0 med enten (i) 200 µl 5 mg/ml pertussis toksin (PT) og fullstendig Freund's adjuvant (CFA) eller (ii) PT, CFA og 300 µg/200 µl MOG35-55 (myelinoligodendrocyttglykoprotein emulgert i CFA som inneholder 5 mg/ml av varmeinaktivert *Mycobacterium tuberculosis*). På dag 2, blir mus igjen behandlet med PT. Mus bedømmes gjennom studien for paralyse nivåer. Sykdom forventes i gruppen som mottar

MOG. Et rotte anti-muse-IL-17 monoklonalt IgG1-antistoff eller isotypekontrollantistoff gis til mus på dagene 1, 7 og 15 (BD Biosciences for rotte anti-muse-IL-17 antistoff). Mus som mottar MOG avlives når klinisk bedømming når mellom 1-3 (på en skala fra 0-4); dette er mellom dager 14-31 for studie 1 i tabell 9 under og mellom dager 14-16 for studie 2 i tabell 10 under. Kliniske tegn på sykdom utvikler seg på ca. dag 10. Individuelle dyr blir subjektivt bedømt med minst 2 skåringer som er uavhengig og som er blindet for identiteten i behandlingsgruppene i henhold til klinisk CNS-sykdomsalvorlighet. Grad 0 er normal; grad 1 er fullstendig kraftløs hale; grad 2 er unilateral delvis svakhet i bakre lem; grad 3 er fullstendig paralyse av bakre lem; og grad 4 er døende. (Se *J. Exp. Med.* 194: 873-881, 2001). En kontrollmus avlives på den samme dagen som en MOG-behandlet mus. Ryggmarg isoleres ved tidspunktet for avliving og flashfryses for å bli anvendt til IL-17-proteinanalyse ved hjelp av ELISA. IL-17-antistoffbehandlingsgruppe har signifikant lavere sykdomsskår sammenlignet med isotypekontrollgruppe.

Lysater av hver hele ryggmarg gjøres i 1 ml (studie 1 i tabell 9 under) eller 0,4 ml (studie 2 i tabell 7 under) TPER-proteinekstraksjonsreagens (Pierce #78510) med fullstendige proteasehemmere (Roche Applied Science #11697498), i 2 ml rør som inneholder keramiske kuler (lyserende matriks D, QBiogene #6913050), og FastPrep-instrument (Bio101) i 30 sekunder ved en skala på 5,5. Etter lysis, blir prøver sentrifugert (5 minutter ved 14 000 rpm i en mikrofuge) for å fjerne debris. Supernatanter overføres til nye mikrofugerør. Total proteinkonsentrasjon i hvert lysat bestemmes med et BCA-proteinanalysekitt (Pierce #23225), ved å anvende mikroplateprotokollen til produsenten. Lysater fryses og lagres ved -80°C.

Etter tining av lysater på is og rensing ved sentrifugering, måles muse-IL-17-nivåer i ufortynnede prøver ved ELISA (R&D Quantikine #M1700) ifølge produsentens instruksjoner. Standardkurver skaffes tilveie ved å anvende en fireparameter logistikktilpassning. IL-17-verdier bestemmes fra standardkurvene ved å anvende standard statistiske teknikker. IL-17-nivåer normaliseres til proteinkonsentrasjon i hver prøve og uttrykkes som pg IL-17/ml total protein i hvert lysat i tabell 9 og 10 under. Som vist ved dataene i tabellene, ble økede nivåer av IL-17 detektert i EAE-mus.

Tabell 9

Studie 1

GRUPPE	OMRÅDE FOR mIL- 17 VERDIER, pg/mg	GJENNOMSnittLIG mIL-17, pg/mg (+/- SE)	OMRÅDE FOR KLINISKE SKÅR VED AVLIVNING	GJENNOMSnittLIG KLINISK SKÅR VED AVLIVNING (+/- SE)
Naive (n=7)	3.63 – 10.06	5.19 +/- 0.87	N/A	N/A
CFA (n=14)	3.16 – 7.51	4.31 +/- 0.33	N/A	N/A
CFA+MOG (n=14)	4.12 – 16.62	8.57 +/- 1.01	0.9 – 3.0	1.74 +/- 0.20

Alle IL-17 ELISA-verdier var innenfor deteksjonsområdet for ELISA, gjennomsnitt av duplikater.

Tabell 10

Studie 2

GRUPPE	OMRÅDE FOR mIL- 17 VERDIER, pg/mg	GJENNOMSNTTLIG, mIL-17, pg/mg (+/- SE)	OMRÅDE FOR KLINISKE SKÅR VED AVLIVNING	GJENNOMSNTTLIG KLINISKE SKÅR VED AVLIVNING (+/- SE)
CFA (n=6)	1.88 – 2.78	2.24 +/- 0.14	N/A	N/A
CFA+MOG (n=8)	1.78 – 5.42	3.34 +/- 0.45	2.75 – 3.20	2.94 +/- 0.06

Alle IL-17 ELISA-verdier er innenfor deteksjonsområdet for ELISA, gjennomsnitt av
5 duplikater.

Eksempel 13 Kollagenindusert artrittmodell

Kollagenindusert artritt (CIA) er en vidt anvendt gnagermodell for reumatoid artritt
("RA") og har histopatologiske trekk felles med human RA. Eksperimentell artritt som
10 er indusert i DBA/1 mus ved immunisering og boosting med emulsjoner av type II koll-
lagen, er en polyartrittsykdom som er karakterisert ved inflammasjon av de små leddene
og progressiv erosjon av brusk og ben (D. Trentham et al., *J. Exp. Med.* 146:857-858,
1977). Nylig så viste Lubberts et al., (*Arthritis & Rheumatism*, 50:650-659, 2004; in-
korporert her) at polyklonalt kanin anti-muse IL-17-antistoff gitt enten ved starten eller
15 på et senere trinn av muse-CIA, forbedret kliniske tegn av artritt.

I CIA-modellen, så viser mus som er gitt en enkel injeksjon av rotte anti-muse IL-17
IgG2a mAb intraperitonealt (8 mg/kg R&D, MAB421 klon 50104.11) signifikant lavere
kliniske skår enn mus injisert med 16 mg/kg kontrollrotte IgG2a. Akuttfasereaktanten,
20 C-reaktivt protein (CRP), er et akseptert indeks på sykdomsaktivitet i RA-pasienter.
Lignende med CRP, tjener museserumamyloidprotein (SAP) som en indikator på syk-
dom i muse-CIA-modellen (M. Bliven et al., *Arthritis & Rheumatism*, 29:1131-1138,
1986). I dyr behandlet med 8 mg/kg anti-mus IL-17, var SAP-nivået signifikant lavere
enn i de som var behandlet med kontrollantistoff. Videre er nedgangen i kliniske skår og
25 SAP-verdier sammenlignet med en anti-muse IL-1 β -gruppe (8 mg/kg) anvendt som en
positiv kontroll. Til slutt er signifikant reduksjon i synovialinflammasjon ved 8 mg/kg
antistoff og benresorpsjon ved 16 mg/kg antistoff tilstede sammenlignet med mus som
er behandlet med kontrollantistoff. En doseresponsstudie kan utføres i CIA-modellen
med anti-muse IL-17-antistoff (f.eks. ved 0,1, 1 og 8 mg/kg). De kliniske skårene for

rotte anti-muse IL-17 viser en tendens for doserespons. En lignende analyse kan utføres i cynomolge aper som en modell for RA ved å anvende et antistoff ifølge oppfinnelsen.

Eksempel 14 Anti-IL-17 mAb-rensing

- 5 En vektor som uttrykker et mAb ifølge oppfinnelsen blir stabilt inkorporert inn i en passende vertscelle (f.eks. CHO DG44 (dhfr-) -celler (Chasin) eller NSO-celler) ved å anvende standardprosedyrer og rensing ved å anvende proteinaffinitetskolonne. I korthet, blir renset kondisjonert medium satt på en 5 ml HiTrap rProtein A Sepharose FF-kolonne (Amersham Biosciences) som er blitt ekvilibrert med PBS (pH 7,4). Kolonnen
- 10 vaskes med 5 kolonnevolum av ekvibreringsbuffer ved en strømningshastighet på 110 cm/time for å vaske ut ikke-spesifikke bindingskomponenter. Det bundede antistoffet elueres ved å anvende en lineær pH-gradient (0,1M natriumfosfatbuffer pH 6,8 til 0,1M natriumsitratbuffer pH 2,5). Hovedproteintoppen i elueringen samles og dets pH justeres til nøytralitet med 1M Tris-buffer (pH 8,5). Proteinpoolen konsentreres til 1-2
- 15 mg/ml ved å anvende 10K Vivaspinn-membran (Vivasciences) og sterilfiltrert (0,45 µm) før lagring ved 4°C.

- For store tillaginger av et mAb ifølge oppfinnelsen, blir det cellefrie konsentratet renset over tre etterfølgende kromatografikolonner (Protein A, anionutbytting og hydrofob
- 20 interaksjonskromatografi). Renheten av mAb etter disse kromatografitrinn er større enn 99% bedømt ved analytisk størrelseseksklusjonskromatografi. mAb utbyttes i en buffer oppløst under avhengig av konsentrasjonen av antistoffet. Kjemiske stabilitetsresultater indikerer en foretrukket pH mellom 6,0 og 7,0 (inkludert); selv om for 20 mg/ml tillaginger så kan pH være mellom 5,5 og 7,0 (inkludert f.eks. 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0,
 - 25 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6 eller 7,0). For lyofilisert produkt er et natriumkloridnivå på 90-30 mM (90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35 eller 30 mM eller enhver verdi mellom 30 og 90 mM) foretrukket, mens for en flytende formulering (f.eks. som skal administreres subkutan) så er et natriumkloridnivå på 100 til 150 mM (100, 110, 120, 130, 140 eller 150 mM eller en hver verdi mellom 100 og 150 mM) fore-
 - 30 tretrukket. Produktet blir konsentrert til en sluttkonsentrasjon på ca. 10, 20 eller 25 mg/ml (alternativt høyere, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 mg/ml eller høyere) og sterilfiltrert. Det filtrerte produktet kan øyeblikkelig fryses ved -70°C eller så kan det lyofiliseres. Et minimalt vektforhold på 1:2 for antistoff til lyobeskytter (f.eks. sukrose eller trehalose) er nødvendig for stabil lyofilisert formulering,
 - 35 men er ikke nødvendig for en flytende formulering. I tillegg, blir 0,02% overflateaktivt stoff (vekt/volum), dvs. polysorbat 80, tilsatt til begge løsningsformuleringer og løs-

ninger som skal lyofiliseres. Det lyofiliserte materialet resuspenderes i sterilt vann for injeksjon eller steril 0,9% natriumklorid før administrering.

Tabell 11

5

<u>mAb kons.</u>	<u>Buffer</u>	<u>pH</u>	<u>NaCl (mM)</u>
10 mg/ml	10 mM sitrat (Na)	6.0	30, 50-150
20 mg/ml	10 mM sitrat	5.5	50-150
20 mg/ml	10 mM sitrat	6.0	50-150
10 20 mg/ml	10 mM sitrat	6.5	50-150
20 mg/ml	10 mM sitrat	7.0	50-150
20 mg/ml	10 mM histidin	6.5	150
>50 mg/ml	10 mM sitrat	5.5	50-150
>50 mg/ml	10 mM sitrat	6.0	50-150
15 >50 mg/ml	10 mM sitrat	6.5	50-150
>50 mg/ml	10 mM histidin	6.5	150

Eksempel 15 Antistoffhalveringstid in vivo

Serumfarmakokinetikk til antistoffer ifølge oppfinnelsen (f.eks. mAb 126 og 121 [IgG4
 20 Fc-region med hhv. Fab 126 eller 121]) bestemmes etter intravenøs eller subkutan administrering i hannlige cynomolge aper. Konsentrasjoner av antistoffene i serumet bestemmes ved å anvende en standard antigenfangings-ELISA-analyse hvor plater er overtrukket med humant IL-17 og bundet serumantistoff detekteres ved å anvende et anti-IgG₄-sekundært antistoff. Etter intravenøs administrering av 1 mg/kg, blir mAb 126
 25 eliminert med en gjennomsnittlig halveringstid på 6,5 dager og mAb 121 blir eliminert med en gjennomsnittlig halveringstid på ca. 11 dager. Etter subkutan administrering av 1 mg/kg har mAb 126 en gjennomsnittlig elimineringshalveringstid på 10,3 dager og mAb 121 har en gjennomsnittlig elimineringshalveringstid på 13 dager.

30 Eksempel 16 Tumorxenograftmodell

For å etablere tumorxenograftmodeller som kan benyttes til å teste antitumoraktivitet til anti-IL-17 antistoffer ifølge oppfinnelsen, så blir 5 millioner HCT116-kolorektale karcinomaceller blandet med Matrigel og deretter injisert inn i den venstre bakdel av 56
 uker gamle hunnlige atymiske (nu/nu) -mus (Charles River Laboratories, Wilmington,
 35 MA). Mus behandles med subkutan injeksjon hver 7. dag med kontrollantistoffer (f.eks. humant IgG4 og muse IgG1), 4 mg/kg anti-humant IL-17, 8 mg/kg anti-muse IL-

17 eller kombinasjon av 4 mg/kg anti-human IL-17 og 8 mg/kg anti-mus IL-17 i 4 uker. Den første antistoffadministreringen starter en dag før implantering av cellene. Tumor størrelse måles to ganger pr. uke med en krum passer og kroppsvekt måles to ganger pr. uke. Plasma samles fra hver mus på dag 34 og KC-nivåer måles ved å anvende et KC

5 ELISA-kitt i henhold til produsentens instruksjoner (R&D Systems). Sammenlignet med kontroll-IgG-injiserte mus, har mus som er behandlet med kombinasjonen av anti-humant IL-17-antistoff og anti-muse IL-17-antistoff signifikant redusert tumorvolum. Videre, har mus behandlet med både anti-humant IL-17-antistoff og anti-mus IL-17-antistoff dramatisk nedsatt plasma KC. Musene behandlet med enten 4 mg/kg anti-

10 humant IL-17-antistoff eller 8 mg/kg anti-muse IL-17-antistoff viste ingen signifikant reduksjon i tumorvolumet og plasma KC-nivåer. Data er vist i tabell 12 og 13 her.

For å måle IL-17-nivåer i tumorene, blir tumorer fra mus xenograftmodeller laget stort sett som beskrevet i eksempel 9. For proteinmåling, blir tumorlysater fortynnet 1:1 i

15 TPER + 1x Halt i en polypropylen 96-brønners fortynningsplate. Proteinkonsentrasjon bestemmes ved å anvende mikroplatekontrollen til Coomassie Plus proteinanalysen (Pierce #23236). BSA-standard fortynnes i TPER + Halt. IL-17-proteinnivåer bestemmes ved å anvende humane- og muse-IL-17-ELISA-kitt fra R&D System etter produsentens instruksjoner (humant IL-17 DuoSet ELISA, R+D Systems, kat. #DY317;

20 muse-IL-17 ELISA, R+D System, kat. #421). Både humant og muse-IL-17 var øket i tumorer fra HCT116 og HT29 kolonnetumor xenograftmodeller, sammenlignet med H460 lungetumor xenograftmodell.

Tabell 12 Tumorvolum

(n = 10)

Tid, dager (etter implantering av HCT-116 celler)	Rotte IgG1 + humane IgG4-isotypekontroller (gjennomsnitt +/- SE)	Anti-muse IL-17 + anti-humant IL-17 (gjennomsnitt +/- SE)
8	101.4 +/- 6.7	91.5 +/- 9.4
14	149.2 +/- 9.2	123.9 +/- 16.2
17	162.1 +/- 12.4	134.6 +/- 14.7
20	177.7 +/- 17.1	152.8 +/- 18.7
24	279.2 +/- 22.8	222.4 +/- 35.4
28	323.3 +/- 22.5	244.6 +/- 32.8
31	405.8 +/- 33.4	275.1 +/- 36.6

34	537.7 +/- 50.7	339.8 +/- 46.3
----	----------------	----------------

Tumorvolum beregnes ved å anvende LogVol, AR-fremgangsmåten.

Tabell 13 KC-kjemokine nivåer i plasma 35 dager etter implantering
(n = 10)

5

GRUPPE	OMRÅDE FOR KC-VERDIER, pg/ml	GJENNOMSN ITTILIG KC, pg/ml (+/- SE)
Rotte IgG1 + humane IgG4-isotypekontroller	76.3 – 168.4	112.5 +/- 10.0
Anti-mus IL-17 + anti- humant IL-17	55.6 – 110.5	84.7 +/- 5.7
Prosent gjennomsnittlig KC-forskjell (anti-IL-17-gruppe sammenlignet med isotypekontrollgrup- pe): -24.7%		

P a t e n t k r a v

1.

Humanisert anti-IL-17 monoklonalt antistoff,

k a r a k t e r i s e r t v e d at antistoffet omfatter:

5

a) et peptid med SEQ ID NO: 131 ved CDRL1,

b) et peptid med SEQ ID NO: 167 ved CDRL2,

c) et peptid med SEQ ID NO: 168 ved CDRL3,

d) et peptid med SEQ ID NO: 26 ved CDRH1,

10

e) et peptid med SEQ ID NO: 30 ved CDRH2, og

f) et peptid med SEQ ID NO: 52 ved CDRH3.

2.

Humanisert anti-IL-17 monoklonalt antistoff ifølge krav 1,

k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte antistoff omfatter et LCVR

15

med SEQ ID NO: 241 og et HCVR med SEQ ID NO: 118.

3.

Humanisert anti-IL-17 monoklonalt antistoff ifølge krav 1 eller 2,

k a r a k t e r i s e r t v e d at antistoffet er et fullengdeantistoff, et
vesentlige intakt antistoff, et Fab-fragment, et F(ab')₂-fragment eller et enkeltkjedet Fv-
fragment.

20

4.

Antistoff ifølge et hvert av kravene 1 til 3,

k a r a k t e r i s e r t v e d at antistoffet videre omfatter en tung-
kjede konstantregion valgt fra IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA, IgE, IgM and IgD.

25

5.

Sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter
antistoffet ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 4 og hvor nevnte sammensetning
videre omfatter en farmasøytisk akseptabel bærer.

30

6.

Antistoff ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 4 for anvendelse som et medikament.

35

7.

Antistoff ifølge et hvert av kravene 1 til 4, for anvendelse ved behandlingen av en eller flere tilstander valgt fra reumatoid artritt, inflammatorisk tarm-lidelse, psoriasis og multipel sklerose.