

(12) **PATENT**(11) **343687**(13) **B1****NORGE**

(19) NO

(51) Int Cl.

*C07K 16/24 (2006.01)**A61K 39/395 (2006.01)***Patentstyret**

(21)	Søknadsnr	20041018	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.06.25 PCT/US2002/020181
(22)	Inng.dag	2004.03.10	(85)	Videreføringsdag	2004.03.10
(24)	Løpedag	2002.06.25	(30)	Prioritet	2001.06.26, US, 60/301,172
(41)	Alm.tilgj	2004.03.10			
(45)	Meddelt	2019.05.06			
(73)	Innehaver	Amgen Inc., One Amgen Center Drive, CA91320-1799 THOUSAND OAKS, USA			
		Amgen Fremont Inc, 6701 Kaiser Drive, CA94555 FREMONT, USA			
(72)	Oppfinner	Francis H Martin, 865 Ferhill Court, CA91320 NEWBURY PARK, USA			
		William J Boyle, 1910 Loralwood Court, CA91362 THOUSAND OAKS, USA			
		Geoffrey C Davis, 1132 Vancouver Avenue, CA94010 BURLINGAME, USA			
		Jose R Valan, 125 Williams Lane, CA94404 FOSTER CITY, USA			
(74)	Fullmektig	ONSAGERS AS, Postboks 1813, Vika, 0123 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	OPGL bindende antistoff og farmasøytisk sammensetning derav			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 0037504 A2, WO 0015807 A1, WO 1998046751 A1			
(57)	Sammendrag				

Det er beskrevet antistoffer som virker sammen med osteoprote gerinligand (OPGL). Det er videre beskrevet fremgangsmåter for å behandle osteopene lidelser ved å administrere en farmasøytisk effektiv mengde av antistoffer til OPGL. Det er også beskrevet fremgangsmåter for å påvise mengden av OPGL i en prøve ved å bruke antistoffer til OPGL.

OPPFINNELSENS OMRÅDE

Den foreliggende oppfinnelsen angår antistoffer som binder osteoprotegerinligand (OPGL). Det er også beskrevet sammensetninger og fremgangsmåter for behandling av bensykdommer så som osteoporose, bentap på grunn av artritt, Pagets sykdom og osteopeni.

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

Benvev gir støtte for kroppen og innbefatter mineraler (så som kalsium og fosfor), en matrise av collagene og ikke-collagene proteiner og celler. Levende benvev har en dynamisk likevekt mellom dannelse av ben som kalles avsetning, og nedbrytning av ben som kalles resorpsjon. Det finnes tre celletyper i ben som inngår i denne likevekten, det vil si osteocytter, osteoblaster og osteoklaster. Osteoblastene fremmer dannelsen av benvev, mens osteoklastene er forbundet med resorpsjon. Resorpsjon eller oppløsning av benmatrise og mineraler er en rask og effektiv prosess sammenlignet med bendannelse og kan frigjøre store mengder av mineraler fra bensubstansen. Osteoklaster inngår i reguleringen av den normale remodelleringen av skjelettvevet og i resorpsjon som er indusert av hormoner. For eksempel blir resorpsjon stimulert ved en utskillelse av paratyroidhormon som respons på synkende konsentrasjoner av kalsiumioner i ekstracellulære væsker. I motsetning til dette, er en hemming av resorpsjon en funksjon av kalsitonin. I tillegg vil metabolitter av vitamin D endre bens følsomhet eller reaksjonsevne overfor paratyroidhormon og kalsitonin.

Osteoprotegerinligand (OPGL) som hører hjemme i TNF-familien eller gruppen av cytokiner, fremmer dannelse av osteoklaster ved binding til reseptoraktivatoren for $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (RANK, også kalt osteoklastdifferensiering og aktiveringsreseptor eller ODAR). Osteoprotegerin (OPG) på den annen side, hemmer dannelsen av osteoklaster ved å isolere eller ødelegge OPGL og hindrer derved en assosiasjon med ODAR. Mengden av OPGL som er assosiert med ODAR er således korrelert med likevekten mellom benavsetning og resorpsjon.

Etter skjelettets modning vil mengden av ben i skjelettet være et resultat av en balanse (eller ubalanse) mellom bendannelse og benresorpsjon. Størst benmasse opptrer etter skjelettmodning før ca 40-årsalderen. Mellom 40- og 50-årsalderen vil likevekten skifte og benresorpsjon vil dominere. Denne uunngåelige minskningen av benmassen som skjer med alderen starter tidligere hos kvinner enn hos menn og er distinkt akselerert etter menopausen hos enkelte kvinner (prinsipielt de som er av kaukasiske eller asiatiske opprinnelse).

Osteopeni er en tilstand som generelt angår enhver minskning eller nedsettelse av benmassen til nivåer som ligger under det normale. En slik tilstand kan oppstå ved at det er synkende hastighet med hensyn til bensyntese, eller at det skjer en økende bendestruksjon eller begge deler. En vanlig form for osteopeni er primær

osteoporose, som ofte betegnes som postmenopausal eller senil osteoporose. Denne formen for osteoporose er en konsekvens av det generelle bentapet som opptrer med økende alder, og er ofte et resultat av økende benresorpsjon, med en normal bendannelse. Mange hvite kvinner i de forente stater utvikler symptomatisk osteoporose. Det er et direkte forhold mellom osteoporose og forekomsten av hofte-, lår-, nakke- og indre leddbrudd hos kvinner som er 45 år eller eldre. Eldre menn kan utvikle symptomatisk osteoporose i aldersintervallet fra 50 til 70 år. Osteoporose kan i enkelte tilfeller også være et resultat av økende nivåer eller aktivitet av OPGL. Det vil således være fordelaktig å kunne ha molekyler som kan regulere aktiviteten til OPGL i osteoklastogenesen.

Det er blitt identifisert flere faktorer som kan bidra til postmenopausal og senil osteoporose. Disse innbefatter blant annet en endring i hormonnivåer som utvikler seg med alderen, foruten utilfredsstillende kalsiumforbruk som skyldes nedsatt absorpsjon i tarmkanalen av kalsium og andre mineraler. Enkelte behandlinger har derfor inkludert hormonterapi og dietttilskudd i et forsøk på å forsinke eller å stoppe denne prosessen. I den senere tid er det utviklet antiresorptive midler så som bisfosfonater og selektive østrogenreseptormodifiserende forbindelser (SERM) for å hindre og behandle redusert benmasse. Det kan således være brukbart og fordelaktig å kombinere disse behandlingene med molekyler som kan regulere aktiviteten av OPGL ved behandling av visse osteopene lidelser og sykdommer.

WO 0037504 A2 beskriver antistoff som binder CTLA-4. WO 0015807 A1 beskriver metoder til å nedregulere den biologiske aktiviteten av OPGL. WO 1998046751 A1 beskriver proteiner som binder seg til osteoprotegerin.

SAMMENDRAG AV OPPFINNELSEN

Nærværende oppfinnelse er definert i kravene.

Oppfinnelsen tilveiebringer et antistoff som omfatter en tung kjede og en lett kjede, og hvor den tunge kjeden omfatter en aminosyresekvens som angitt i SEKV.ID. NR. 13, og hvor den lette kjeden omfatter en aminosyresekvens som angitt i SEKV.ID. NR. 14, og hvor antistoffet binder seg til osteoprotegerinligand (OPGL) og hemmer binding av OPGL til en osteoklastdifferensierings og -aktiveringsreseptor (ODAR). og angår beskriver

I visse utførelser tilveiebringer oppfinnelsen et antistoff som omfatter en tung kjede og lett kjede, og hvor den tunge kjeden omfatter en aminosyresekvens som angitt i SEKV.ID. NR. 2 fra residua 20 til residua 467, mens den lette kjeden omfatter en aminosyresekvens som angitt i SEKV.ID. NR. 4 fra residua 21 til residua 235.

Heri beskrives et antistoff som omfatter en tung kjede og en lett kjede, og hvor den tunge kjeden omfatter en aminosyresekvens som angitt i SEKV.ID. NR. 2 eller et fragment av denne.

Heri beskrives et antistoff som omfatter en tung kjede og en lett kjede, og hvor den tunge kjeden omfatter et variabelt område som omfatter en aminosyresekvens som angitt i SEKV.ID. NR. 13 eller et fragment av denne.

5 Heri beskrives et antistoff som omfatter en tung kjede og en lett kjede, og hvor den lette kjeden omfatter en aminosyresekvens som angitt i SEKV.ID. NR. 4 eller et fragment av denne.

Heri beskrives et antistoff som omfatter en tung kjede og en lett kjede, og hvor sistnevnte omfatter et variabelt område som omfatter en aminosyresekvens som angitt i SEKV.ID. NR. 14 eller et fragment av denne.

10 Heri beskrives et antistoff som omfatter en tung kjede og en lett kjede, og (a) hvor den tunge kjeden omfatter et første variabelt område og hvor dette omfatter en sekvens som har minst 90% identitet til den aminosyresekvensen som er angitt i SEKV.ID. NR. 13, og (b) hvor den lette kjeden omfatter et andre variabelt område og hvor dette omfatter en sekvens som har minst 90% identitet til den
15 aminosyresekvensen som er angitt i SEKV.ID. NR. 14, og (c) hvor antistoffet virker sammen med en osteoprotegerinligand (OPGL).

Heri beskrives et første variable område som har minst 95% identitet til den aminosyresekvensen som angitt i SEKV.ID. NR. 13, mens det andre variable området omfatter en sekvens som har minst 95% identitet til den
20 aminosyresekvensen som angitt i SEKV.ID. NR. 14.

Heri beskrives et første variable område som har minst 99% identitet til den aminosyresekvensen som angitt i SEKV.ID. NR. 13, mens det andre variable området omfatter en sekvens som har minst 99% identitet til den aminosyresekvensen som angitt i SEKV.ID. NR. 14.

25 Heri beskrives en tung kjede som omfatter en aminosyresekvens som angitt i SEKV.ID. NR. 2 eller et fragment av denne. Heri beskrives en tung kjede som omfatter et variabelt område og et konstant område, og hvor det variable området omfatter en aminosyresekvens som angitt i SEKV.ID. NR. 13 eller et fragment av denne.

30 Heri beskrives en lett kjede som omfatter en aminosyresekvens som angitt i SEKV.ID. NR. 4 eller et fragment av denne. Heri beskrives en lett kjede som omfatter en aminosyresekvens som angitt i SEKV.ID. NR. 14 eller et fragment av denne.

35 Heri beskrives enkeltkjedede antistoffer. I enkelte utførelser av oppfinnelsen er det tilveiebrakt enkeltkjedede Fv-antistoffer. I enkelte utførelser av oppfinnelsen er det tilveiebrakt Fab-antistoffer. I enkelte utførelser av oppfinnelsen er det tilveiebrakt Fab'-antistoffer. I visse utførelser av oppfinnelsen er det tilveiebrakt (Fab')₂-antistoffer.

I enkelte utførelser av oppfinnelsen er det tilveiebrakt en farmasøytisk sammensetning som omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen. Heri beskrives en farmasøytisk sammensetning som omfatter en terapeutisk effektiv mengde av et antistoff til OPGL.

- 5 Heri beskrives en farmasøytisk sammensetning som omfatter et antistoff til OPGL, og minst ett terapeutisk middel valgt fra en benmorfogen faktor, transformerende vekstfaktor- β (TGF- β), en interleukin-1 (IL-1) inhibitor, IL-1ra, KineretTM, en TNF α -inhibitor, en løselig TNF α -reseptor, EnbrelTM, et anti-TNF α -antistoff, RemicadeTM, et D2E7-antistoff, et paratyroidhormon, en analog av et
- 10 paratyroidhormon, et paratyroidhormonrelatert protein, en analog av et paratyroidhormonrelatert protein, et prostaglandin, et bifosfonat, et alendronat, fluorid, kalsium, et ikke-steroid antiinflammatorisk medikament (NSAID), en COX-2-inhibitor, CelebrexTM, VioxxTM, et immunosuppressivt middel, metotreksat, leflunomid, en serinproteaseinhibitor, en sekretorisk leukocytproteaseinhibitor
- 15 (SLPI), en IL-6-inhibitor, et antistoff til IL-6, en IL-8-inhibitor, et antistoff til IL-8, en IL-18-inhibitor, et IL-18-bindende protein, et IL-18-antistoff, en interleukin-1-omdannende enzym (ICE) modulator, en fibroblastvekstfaktor (FGF), en FGF-modulator, en PAF-antagonist, en keratinocytvekstfaktor (KGF), et KGF-relatert molekyl, en KGF-modulator, en matrise metalloproteinase (MMP) modulator, en
- 20 nitritoksidsyntase (NOS) modulator, en modulator av glukokortikoidreseptor, en modulator av glutamatreseptor, en modulator av lipopolysakkarid (LPS) nivåer, et noradrenalin, en noradrenalinetterlignende forbindelse, og en noradrenalinmodulator.

- 25 Heri beskrives en fremgangsmåte for å behandle en osteopenisk lidelse som omfatter en administrering av en farmasøytisk effektiv mengde av et antistoff. Heri beskrives en fremgangsmåte for å behandle en osteopenisk lidelse som omfatter en administrering av en farmasøytisk sammensetning.

- 30 Heri beskrives en fremgangsmåte for å behandle en inflammatorisk tilstand med medfølgende bentap hos en pasient, som omfatter en administrering av en farmasøytisk sammensetning.

Heri beskrives en fremgangsmåte for å behandle en autoimmun tilstand med medfølgende bentap hos en pasient, som omfatter en administrering av en farmasøytisk sammensetning.

- 35 Heri beskrives en fremgangsmåte for å behandle en reumatisk artritt i en pasient, som omfatter en administrering av en farmasøytisk sammensetning.

Heri beskrives en fremgangsmåte for å påvise nivået av OPGL i en biologisk prøve, som omfatter at prøven kontaktes et antistoff.

KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

Figur 1 viser en cDNA-sekvens som koder den α OPGL-1-antistoff tunge kjeden (SEKV.ID. NR. 1).

Figur 2 viser aminosyresekvensen for den α OPGL-1-antistoff tunge kjeden (SEKV.ID. NR. 2).

- 5 Figur 3 viser en cDNA-sekvens som koder den α OPGL-1-antistoff lette kjeden (SEKV.ID. NR. 3).

Figur 4 viser aminosyresekvensen for den α OPGL-1-antistoff lette kjeden (SEKV.ID. NR. 4).

- 10 Figur 5 viser et skjematisk diagram av det α OPGL-1 kappa lettkjede ekspresjonsplasmidet α OPGL-1-kappa/pDSRa19.

Figur 6 viser et skjematisk diagram av det α OPGL-1 IgG2 tungkjede ekspresjonsplasmidet α OPGL-1-IgG2/pDSRa19.

Figur 7 viser den doseavhengige bindingen av α OPGL-1 til OPGL-belagte EIA-plater.

- 15 Figur 8 viser spesifikk binding av α OPGL-1 til membranbundet OPGL.

Figur 9 viser inhibering av α OPGL-1-binding til OPGL-belagte EIA-plater ved løselig OPGL.

Figur 10 viser spesifikk binding av α OPGL-1 til OPGL-1-belagte EIA-plater.

Figur 11 viser doseavhengig inhibering av osteoklastdannelse av α OPGL-1.

- 20 Figur 12 viser doseavhengig inhibering av OPGL-binding til ODAR ved α OPGL-1.

Figur 13 viser de midlere serumkonsentrasjonstidsprofilene etter administrering av en enkelt dose av α OPGL-1 til cynomolgusaper.

Figur 14 viser den midlere prosentvise forandring i serum N-Tx-konsentrasjon etter administrering av en enkelt dose av α OPGL-1 til cynomolgusaper.

- 25 Figur 15 viser prosentvis forandring i urin N-Tx-konsentrasjon etter administrering av en enkelt dose av α OPGL-1 til cynomolgusaper.

Figur 16 viser de antistoffpositive og -negative serumkonsentrasjonstidsprofilene etter administrering av en enkelt dose av α OPGL-1 til cynomolgusaper.

- 30 Figur 17 viser aminosyresekvensen til det variable området av α OPGL-1-antistoff tung kjede variable området (SEKV.ID. NR. 13).

Figur 18 viser aminosyresekvensen til det variable området av α OPGL-1-antistoff lett kjede variable området (SEKV.ID. NR. 14).

Figur 19 viser en cellekulturprosess for produksjon av α OPGL-1.

Figur 20 viser den prosentvise forandringen av serumkalsium etter administrering av en enkelt dose av α OPGL-1 til cynomolgusaper.

Figur 21 viser den midlere prosentvise forandringen av alkalisk fosfatase etter administrering av en enkelt dose av α OPGL-1 til cynomolgusaper.

5 DETALJERT BESKRIVELSE

De avsnittsoverskrifter som her er brukt, er kun angitt for å få en bedre organisering av beskrivelsen og er som sådan ingen begrensning av oppfinnelsen som sådan.

Definisjoner

Standardteknikker kan brukes for rekombinant DNA oligonukleotidsyntese og vevskulturer og transformasjoner (for eksempel elektroporering, lipofeksjon). Enzymatiske reaksjoner og renseteknikker kan utføres som angitt av fabrikantens beskrivelser eller slik de vanligvis brukes innenfor bioteknologien. Disse teknikker og fremgangsmåter kan generelt utføres ved hjelp av vanlig kjente fremgangsmåter slik disse er kjente innenfor bioteknologien og slik de er beskrevet i forskjellige generelle og mer spesifikke referanser som her er angitt og diskutert i den foreliggende beskrivelsen. Se for eksempel Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2. utgave, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Hvis intet annet er angitt, vil den nomenklatur som brukes i forbindelse med laboratorieteknikk og fremgangsmåter, analytisk kjemi, syntetisk organisk kjemi og medisinsk og farmasøytisk kjemi, være de som er velkjente og vanlig brukte innenfor fagområdet. Standardteknikker kan brukes for kjemisk syntese, kjemisk analyse, fremstilling av farmasøytiske preparater, opparbeiding og administrering og behandling av pasienter.

Slik de er brukt i overensstemmelse med den foreliggende søknaden, vil de følgende begreper, hvis intet annet er angitt, ha følgende betydning:

Begrepet "isolert polynukleotid" betyr her et polynukleotid av genomisk, cDNA eller syntetisk opprinnelse, eller en kombinasjon av disse, og på grunn av sin opprinnelse så vil det "isolerte polynukleotidet" (1) ikke være assosiert med hele eller en del av et polynukleotid i hvilket det "isolerte polynukleotidet" finnes i naturen, (2) er forbundet til et polynukleotid som ikke er forbundet til det i naturen, eller (3) ikke opptrer i naturen som en del av en større sekvens.

Begrepet "isolert protein" slik det brukes her, betyr et protein som er kodet av cDNA, rekombinant RNA eller av syntetisk opprinnelse eller en kombinasjon av disse som (1) er fri for i det minste noen proteiner med hvilke det normalt forekommer, (2) er i alt vesentlig fritt for andre proteiner fra den samme kilden, for eksempel fra den samme arten, (3) er uttrykt ved hjelp av en celle fra en annen art, eller (4) ikke forekommer i naturen.

Begrepet "polypeptid" brukes her som et generelt begrep for naturlige proteiner eller sekvenser som har delesjoner, adderinger og/eller substitusjoner av en eller

flere aminosyrer i den naturlige sekvensen. Begrepet "polypeptid" omfatter også α OPGL-1 (slik det er beskrevet nedenfor, SEKV.ID. NR. 2 og SEKV.ID. NR. 4), eller sekvenser med delesjoner, adderinger og/eller substitusjoner av en eller flere aminosyrer i α OPGL-1. Heri beskrives det humane tungkjede

- 5 immunoglobulinmolekylet som er representert ved figur 2 (SEKV.ID. NR. 2) og det humane lett kjede immunoglobulinmolekylet som er representert ved figur 4 (SEKV.ID. NR. 4).

- Begrepet "naturlig forekommende" slik det brukes her i forhold til en gjenstand, refererer seg til det faktum at denne gjenstanden kan finnes i naturen. For eksempel
10 vil et polypeptid- eller en polynukleotidsekvens som er tilstede i en organisme (heri inngår virus) og som kan isoleres fra en kilde i naturen og som ikke med hensikt er modifisert i et laboratorium eller på annen måte, vil være naturlig forekommende.

- Begrepet "operativt forbundet" slik det brukes her, refererer seg til komponenter som befinner seg i et forhold som gjør det mulig for dem å fungere på sin påtenkte
15 måte. For eksempel vil en kontrollsekvens som er "operativt forbundet" til en kodende sekvens være ligert på en slik måte at ekspresjonen av den kodende sekvensen oppnås under betingelser som er forenlige med kontrollsekvensene.

- Begrepet "kontrollsekvens" slik det brukes her, refererer seg til polynukleotidsekvenser som kan utføre ekspresjonen og bearbeidingen av de
20 kodende sekvensene til hvilke de er ligert. Typen av slike kontrollsekvenser kan være forskjellig avhengig av vertsorganismen. Kontrollsekvenser for prokaryoter kan innbefatte promotorer, ribosomale bindingssteder og transkripsjonstermineringssekvenser. Kontrollsekvenser for eukaryoter kan innbefatte promotorer og transkripsjonstermineringssekvenser. "kontrollsekvenser"
25 kan innbefatte ledersekvenser og/eller fusjonspartnersekvenser.

Begrepet "polynukleotid" slik det brukes her, betyr en polymer form av nukleotider med en lengde på minst 10 baser. Basene kan være ribonukleotider eller deoksyribonukleotider eller en modifisert form av begge disse typer nukleotider. Begrepet innbefatter både enkelt- og dobbelttrådede former av DNA.

- Begrepet "oligonukleotid" refererer seg til naturlig forekommende og modifiserte nukleotider som er forbundet med hverandre ved naturlige forekommende og/eller ikke naturlig forekommende oligonukleotidbindinger. Oligonukleotider er et polynukleotidundersett som generelt omfatter en lengde på 200 baser eller færre. Oligonukleotidene har en lengde på fra 10 til 60 baser. Oligonukleotidene vil ha en
30 lengde på 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 eller 20 til 40 baser. Oligonukleotidene kan være enkeltrådede eller dobbelttrådede, for eksempel for anvendelse under konstruksjonen av en genmutant. Oligonukleotidene kan være sens- eller antisens oligonukleotider.

Begrepet "naturlig forekommende nukleotider" innbefatter deoksyribonukleotider og ribonukleotider. Begrepet "modifiserte nukleotider" innbefatter nukleotider som er modifiserte eller inneholder substituerte sukkergrupper og lignende. Begrepet "oligonukleotidbindinger" innbefatter oligonukleotidbindinger så som fosfortioat, fosforditioat, fosforselenoat, fosfordiselenoat, fosforanilotioat, fosforaniladat, fosforamidat og lignende. Se for eksempel LaPlanche et al. Nucl. Acids Res. 14: 9081 (1986); Stec et al. J. Am. Chem. Soc. 106: 6077 (1985); Stein et al. Nucl. Acids res. 16: 3209 (1988); Zon et al. Anti-Cancer Drug Design 6: 539 (1991); Zon et al. Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, sidene 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al. U.S. patentsøknad nr. 5,151,510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90: 543 (1990). Et oligonukleotid kan inneholde en markør for påvisning.

- Identitet og likhet eller slektskap mellom polypeptider kan lett beregnes ved hjelp av kjente fremgangsmåter. Slike fremgangsmåter innbefatter, men er ikke begrenset til, de som er beskrevet i Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York (1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); og Carillo *et al.*, *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988).
- Foretrukne fremgangsmåter for å bestemme identitet er utformet slik at de gir den best mulige tilpasningen mellom de testede eller undersøkte sekvensene. Fremgangsmåter for å bestemme identitet er beskrevet i offentlig tilgjengelige dataprogrammer. Foretrukne dataprogrammetoder for å bestemme identitet mellom to sekvenser innbefatter, men er ikke begrenset til, GCG-programpakken som innbefatter GAP (Devereux *et al.*, *Nucl. Acid. Res.*, 12: 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI, BLASTP, BLASTN og FASTA (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410 (1990)). BLASTX-programmet er allment tilgjengelig fra "the National Center for Biotechnology Information" (NCBI) og andre kilder (*BLAST Manual*, Altschul *et al.* NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul *et al.*, *supra* (1990)). Den velkjente Smith Waterman-algoritmen kan også brukes for å bestemme identitet.
- Visse parallellsammenlignings (alignment) skjemaer for å parallellsammenligne (alligning) to aminosyresekvenser kan resultere i en tilpasning i bare et kort område av de to sekvensene og dette parallellsammenlignede området kan ha meget høy sekvensidentitet selv om det ikke er noe signifikant forhold mellom de to fullengde sekvensene. Følgelig vil den valgte parallsammenligningsmetoden (GAP-programmet) resultere i en parallellsammenligning som griper over eller strekker seg over minst 50 sammenhengende aminosyrer i målpolypeptidet.
- Ved å for eksempel å bruke dataalgoritmen GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), kan to polypeptider hvor det er ønskelig å bestemme prosent sekvensidentitet parallellsammenlignes for optimal tilpasning med hensyn til deres respektive aminosyrer (det "tilpassede området" bestemmes ved hjelp av algoritmen). Der brukes en såkalt gap åpningspenalitet (som er beregnet som 3X middeldiagonalen og hvor "middeldiagonalen" er gjennomsnittet av diagonalen i den sammenligningsmatrisen som brukes og hvor "diagonalen" er det skår eller det tall som er gitt for hver perfekte aminosyretilpasning i den spesielle sammenligningsmatrisen som brukes), og en såkalt gap forlengelsespenalitet (som vanligvis er en 1/10 av gap åpningspenaliteten), så vel som en sammenligningsmatrise så som PAM 250 eller BLOSUM 62 i forbindelse med algoritmen. Algoritmen vil også anvende en standard sammenligningsmatrise

(se Dayhoff *et al.*, *Atlas of Protein Sequence and Structure*, 5(3) (1978) for PAM 250 sammenligningsmatrisen; Henikoff *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89: 10915-10919 (1982) for BLOSUM 62 sammenligningsmatrisen.

Parametrene vil for en polypeptidsekvenssammenligning innbefatte følgende:

- 5 Algoritme: Needleman *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 48: 443-453 (1970);
 Sammenligningsmatrise: BLOSUM 62 fra Henikoff *et al.*, *supra* (1992);
 Gap-penalitet: 12
 Gap-lengde penalitet: 4
 Terskel for likhet: 0
- 10 GAP-programmet kan brukes med de ovennevnte parametrene. De forannevnte parametrene vil være såkalte standardparametere for polypeptidsammenligninger (sammen med ingen penalitet for endegap) ved å bruke GAP-algoritmen.

 Slik de brukes her, vil de tjue vanlig kjente aminosyrene og deres forkortelser følge vanlig kjent brukspraksis. Se Immunology - A Synthesis (2. utgave, E.S. Golub og
15 D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Stereoisomerer (for eksempel D-aminosyrer) av de tjue vanlig kjente aminosyrene, unaturlige aminosyrer så som α -, α -disubstituerte aminosyrer, N-alkylaminosyrer, melkesyre og andre uvanlige aminosyrer, er også egnet som komponenter i polypeptider.
 Eksempler på uvanlige aminosyrer innbefatter: 4-hydroksyprolin, γ -
20 karboksylglutamat, ϵ -N,N,N-trimetyllysin, ϵ -N-acetyllysin, O-fosfoserin, N-acetylserin, N-formylmetionin, 3-metylhistidin, 5-hydroksyllysin, σ -N-metylarginin og lignende aminosyrer og iminosyrer (for eksempel 4-hydroksyprolin). I beskrivelsen av polypeptider vil venstrehåndsretningen være den aminoterminalre retningen, mens høyrehåndsretningen vil være den karboksyterminalre retningen, i
25 overensstemmelse med vanlig kjent bruk og kjente konvensjoner.

 På lignende måte, hvis intet annet er angitt, så er venstrehåndsretningen av enkelttrådede polynukleotidsekvenser 5'-enden, mens venstrehåndsretningen for dobbelttrådede polynukleotidsekvenser er angitt som 5'-retningen. Retningen på 5'-til 3'-adderingen på utviklende RNA-transkripter er betegnet som
30 transkripsjonsretningen, og de sekvensområdene på DNA-tråden som har den samme sekvensen som i nevnte RNA og som er 5' til 5'-enden av RNA-transkriptene, er betegnet som "oppstrøms sekvenser", mens de sekvensområdene på DNA-tråden som har den samme sekvensen som for nevnte RNA og som er 3' til 3'-enden av RNA-transkriptet er betegnet som "nedstrøm sekvenser".

35 Konservative aminosyresubstitusjoner kan omfatte ikke naturlig forekommende aminosyregrupper og blir typisk inkorporert ved en kjemisk peptidsyntese snarere enn ved syntese i biologiske systemer. Disse innbefatter peptidomimetika og andre reverserte eller inverterte former av aminosyregrupper.

Naturlig forekommende grupper kan deles i klasser basert på felles sidekjedeegenskaper:

- 1) hydrofobe: norleucin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2) nøytralt hydrofile: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 5 3) sure: Asp, Glu;
- 4) basiske: His, Lys, Arg;
- 5) residua som påvirker kildeorientering: Gly, Pro; og
- 6) aromatiske: Trp, Tyr, Phe.

10 For eksempel kan ikke-konservative substitusjoner innbefatte en utbytting av en eller flere syrer i en eller flere av disse klassene med en syre i en annen klasse. Slike substituerte grupper eller residua kan innføres i områder av det humane antistoffet som er homologe med ikke-humane antistoffer, eller i ikke-homologe områder av molekylet.

15 Ved utføringen av slike forandringer, kan det være ønskelig å ta hensyn til aminosyrenes hydropatiske indeks. Hver aminosyre er blitt gitt en hydropatisk indeks på basis av dens hydrofobisitet og ladningsegenskaper. Disse er som følger: Isoleukin (+4,5); valin (+4,2); leukin (+3,8); fenylalanin (+2,8); cystein/cystin (+2,5); metionin (+1,9); alanin (+1,8); glysin (-0,4); treonin (-0,7); serin (-0,8); tryptofan (-0,9); tyrosin (-1,3); prolin (-1,6); histidin (-3,2); glutamat

20 (-3,5); glutamin (-3,5); aspartat (-3,5); asparagin (-3,5); lysin (-3,9); og arginin (-4,5).

Viktigheten av den hydropatiske aminosyreindeksen for å tilveiebringe en interaktiv biologisk funksjon i et protein er velkjent. Kyte *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 157: 105-131 (1982). Det er kjent at visse aminosyrer kan substitueres for andre aminosyrer med

25 en lignende hydropatisk indeks eller skår, og allikevel beholde en lignende biologisk aktivitet. Ved å utføre slike forandringer basert på den hydropatiske indeksen, så inngår en substitusjon av aminosyrer hvis hydropatiske indekser er innenfor ± 2 . De som inngår ligger innenfor ± 1 , og innenfor $\pm 0,5$.

Det er også underforstått at substitusjonen av like aminosyrer effektivt kan utføres

30 på basis av hydrofilisitet, spesielt i de tilfeller hvor det biologisk funksjonelle proteinet eller peptidet som derved skapes er påtenkt brukt i immunologiske utførelser, noe som er tilfellet her. Et proteins største lokale midlere vil hydrofilisitet, slik denne styres av hydrofilisiteten til de tilstøtende aminosyrene, være korrelert med dets immunogenitet og antigenitet, det vil si en biologisk

35 egenskap for proteinet.

De følgende hydrofilisitetsverdier er gitt disse aminosyregruppene: arginin (+3,0); lysin (+3,0); aspartat (+3,0 $\pm$ 1); glutamat (+3,0 $\pm$ 1); serin (+0,3); asparagin (+0,2);

- glutamin (+0,2); glysin (0); treonin (-0,4); prolin (-0,5 $\pm$ 1); alanin (-0,5); histidin (-0,5); cystein (-1,0); metionin (-1,3); valin (-1,5); leukin (-1,8); isoleukin (-1,8); tyrosin (-2,3); fenylalanin (-2,5) og tryptofan (-3,4). Ved å utføre forandringer basert på lignende hydrofilisitetsverdier, så inngår det i en substitusjon av
- 5 aminosyrer hvis hydrofilisitetsverdier ligger innenfor ± 2 , de som inngår ligger innenfor ± 1 og de som inngår ligger innenfor $\pm 0,5$. Det er også mulig å identifisere epitoper ut fra primære aminosyresekvenser på basis av hydrofilisitet. Disse områdene er også betegnet som "epitopiske kjerneområder".

Eksempler på aminosyresubstitusjoner er gitt i tabell 1.

10

Tabell 1: Aminosyresubstitusjoner

Opprinnelige residua	Eksempler på substitusjoner	Foretrukne substitusjoner
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norleucin	Leu
Leu	Norleucin, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,1-diaminosmørsyre, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser

Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, norleucin	Leu

En dyktig fagperson vil være i stand til å bestemme egnede varianter av polypeptidet slik dette er gitt her ved å bruke velkjente teknikker. I visse tilfeller er det mulig å identifisere egnede områder av molekylet som kan forandres uten
5 derved å ødelegge aktiviteten ved å gjøre dette i områder som ikke anses å være viktige for aktivitet. Det er mulig å identifisere residua eller deler av molekylet som er konservert blant like polypeptider. Områder som er viktige for biologisk aktivitet eller struktur kan selv underkastes konservative aminosyresubstitusjoner uten
10 derved å ødelegge den biologiske aktiviteten eller på skadelig måte påvirke polypeptidets struktur.

En dyktig fagperson kan videre ved å utføre strukturelle undersøkelser identifisere residua eller grupper i like polypeptider som er viktige for aktivitet eller struktur. På bakgrunn av en slik sammenligning er det mulig å forutsi viktigheten av aminosyregrupper i et protein som tilsvarende aminosyregrupper eller residua som er
15 viktige for aktivitet eller struktur i lignende proteiner. En fagperson kan så eventuelt utføre kjemisk lignende aminosyresubstitusjoner for slike på forhånd beregnede viktige aminosyreresidua.

En fagperson kan videre analysere den tredimensjonale strukturen og aminosyresekvensen i forhold til strukturen i lignende polypeptider. På bakgrunn av
20 slik informasjon er det mulig å forutsi eller forutberegne parallellsammenligningen av aminosyreresidua i et antistoff med hensyn til dets tredimensjonale struktur. Det er således mulig å ikke utføre radikale forandringer i aminosyreresidua som er forutberegnert til å befinne seg på overflaten av proteinet, ettersom slike residua eller grupper kan inngå i viktige interaksjoner med andre molekyler. Videre er det
25 mulig for en fagperson å utvikle testvarianter som inneholder en enkel aminosyresubstitusjon for hver forønsket aminosyregruppe eller residuum. Variantene kan så screenes ved å bruke velkjente aktivitetsprøver. Slike varianter kan brukes for å samle informasjon om egnede varianter. Hvis man for eksempel
30 oppdager at en forandring av en spesiell aminosyregruppe resulterer i en ødelagt, uønsket, redusert eller uegnet aktivitet, så er det derved mulig å unngå varianter med en slik forandring. Med andre ord, basert på den informasjon som kan samles ved hjelp av rutineeksperimenter, er det derved lett å kunne bestemme de aminosyrene hvor man bør unngå ytterligere substitusjoner, enten alene eller i kombinasjon med andre mutasjoner.

- Det er publisert en rekke vitenskapelige undersøkelser som angår slike forutberegninger av sekundære strukturer. Se Moult J., *Curr. Op. in Biotech.*, 7(4): 422-427 (1996), Chou *et al.*, *Biochemistry*, 13(2): 222-245 (1974); Chou *et al.*, *Biochemistry*, 113(2): 211-222 (1974); Chou *et al.*, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 47: 45-148 (1978); Chou *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.*, 47: 251-276 og Chou *et al.*, *Biophys. J.*, 26: 367-384 (1979). Videre er det i dag tilgjengelig dataprogrammer som vil kunne brukes for å forutberegne eller forutsi sekundære strukturer. En slik fremgangsmåte for å forutberegne en sekundær struktur er basert på homologimodellering. For eksempel så vil to polypeptider eller proteiner som har en sekvensidentitet på mer enn 30% eller en likhet som er større enn 40% ofte ha lignende strukturelle topologier. Den senere tids forbedring av den proteinstrukturelle databasen (PDB) har gitt bedret forutsigbarhet med hensyn til sekundære strukturer, inklusive mulig antall folder innenfor strukturen for et polypeptid eller et protein. Se Holm *et al.*, *Nucl. Acid. Res.*, 27(1): 244-247 (1999).
- Det er blitt foreslått (Brenner *et al.*, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 7(3): 369-376 (1997)) at et gitt polypeptid eller protein har et begrenset antall folder, og så snart et kritisk antall strukturer er blitt oppløst så vil en strukturell forutsigelse eller forutberegning bli dramatisk mer nøyaktig.
- Ytterligere fremgangsmåter for å forutberegne eller forutsi sekundære strukturer innbefatter såkalt "threading" (Jones, D., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 7(3): 377-87 (1997); Sippl *et al.*, *Structure*, 4(1): 15-19 (1996)), "profilanalyse" (Bowie *et al.*, *Science*, 253: 164-170 (1991); Gribskov *et al.*, *Meth. Enzym.*, 183: 146-159 (199); Gribskov *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 84(13): 4355-4358 (1987)) og "evolusjonsmessig binding" (se Holm, *supra* (1999) og Brenner, *supra* (1997)).
- Antistoffvarianter inkludere glykosyleringsvarianter hvor antallet og/eller typen av glykosyleringsseter er blitt endret sammenlignet med aminosyresekvensen i det opprinnelige polypeptidet. Proteinvarianter vil omfatte et større eller mindre antall av N-koblede eller -forbundne glykosyleringsseter enn i det opprinnelige proteinet. Et N-koblet glykosyleringssete er karakterisert ved sekvensen Asn-X-Ser eller Asn-X-Thr, hvor aminosyregruppen eller residuet med betegnelsen X kan være enhver aminosyregruppe bortsett fra prolin. Substitusjonen av aminosyregrupper for å skape denne sekvensen vil gi et mulig nytt sete for addering av en N-koblet karbohydratkjede. Alternativt vil substitusjoner som eliminerer denne sekvensen fjerne en eksisterende N-koblet karbohydratkjede. Det er også tilveiebrakt en omleiring av N-koblede karbohydratkjeder hvor ett eller flere N-koblede glykosyleringsseter (typisk er de som er naturlig forekommende) blir eliminert og det blir skapt ett eller flere nye N-koblede seter. Ytterligere foretrukne antistoffvarianter innbefatter cysteinvarianter hvor en eller flere cysteingrupper er fjernet eller substituert med en annen aminosyre (for eksempel serin) sammenlignet med den opprinnelige aminosyresekvensen. Cysteinvarianter kan brukes når antistoffer må refoldes til en biologisk aktiv konformasjon så som etter isoleringen

av uløselige inneslutningslegemer. Cysteinvarianter har generelt færre cysteingrupper enn det naturlige proteinet, og har typisk et likt antall for å minimalisere interaksjoner som kan være et resultat av uparrede cysteingrupper.

Aminosyresubstitusjoner vil være de som: (1) reduserer sjansen for proteolyse, (2) reduserer sjansen for oksidasjon, (3) endrer bindingsaffiniteten for å danne proteinkomplekser, (4) endrer bindingsaffiniteter og/eller (5) tilveiebringer eller modifiserer andre fysiokjemiske eller funksjonelle egenskaper for slike polypeptider. Enkle eller multiple aminosyresubstitusjoner kan (også konservative aminosyresubstitusjoner) utføres i den naturlige forekommende sekvensen (i den delen av polypeptidet som ligger utenfor det eller de domener som danner de intermolekylære kontaktene). En konservativ aminosyresubstitusjon vil så typisk ikke i vesentlig grad endre den opprinnelige sekvensens strukturelle egenskaper (for eksempel bør en erstatning av en aminosyre ikke gi en tendens til å bryte den spiralen (heliks) som forekommer i den opprinnelige sekvensen, eller bryte andre typer av sekundære strukturer som karakteriserer den opprinnelige sekvensen). Eksempler på velkjente polypeptid sekundære og tertiære strukturer er beskrevet i *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1984); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden og J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); og Thornton et al. *Nature* 354: 105 (1991).

Begrepet "polypeptidfragment" slik det brukes her, betegner et polypeptid med en aminoterminal og/eller karboksyterminal delesjon. Fragmentene har en lengde på minst fra 5 til 467 aminosyrer. Det er underforstått at så vil fragmentene være minst 5, 6, 7, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 eller 450 aminosyrer lange.

Peptidanaloger er vanligvis anvendt i den farmasøytiske industrien som ikke-peptidmedikamenter med egenskaper som er analoge til de som forefinnes i templatpeptidet. Disse typer av ikke-peptidforbindelser er betegnet "peptidmimetika" eller "peptidomimetika". Fauchere, J. *Adv. Drug Res.* 15:29 (1986); Veber og Freidinger *TINS* p. 392 (1985); og Evans et al. *J. Med. Chem.* 30: 1229 (1987). Slike forbindelser er ofte utviklet ved hjelp av datastyrt molekylmodellering. Peptidmimetika som er strukturelt lignende terapeutiske brukbare peptider, kan brukes for å frembringe en tilsvarende terapeutisk eller profylaktisk effekt. Generelt vil peptidomimetika som er strukturelt lignende et paradigmepeptid (det vil si et polypeptid som har en biokjemisk egenskap eller farmakologisk aktivitet) så som humant antistoff, men vil ha en eller flere peptidbindinger eventuelt erstattet med en binding valgt fra: -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂-, -CH=CH (cis og trans), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- og -CH₂SO- ved hjelp av fremgangsmåter som i seg selv er velkjente. Systematisk substitusjon av en eller flere aminosyrer i en konsensussekvens med en D-aminosyre av samme type (det vil si D-lysin i stedet for L-lysin), kan brukes for å

utvikle mer stabile peptider. Videre kan begrensede peptider som omfatter en konsensussekvens eller en i alt vesentlig identisk konsensussekvensvariasjon utvikles ved hjelp av kjente fremgangsmåter (Rizo og Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61: 387 (1992)), ved for eksempel å addere indre cysteingrupper som er i stand til å danne intramolekylære disulfidbroer som sykliserer peptidet.

"Antistoff" eller "antistoffpeptid(er)" refererer seg til et intakt antistoff, eller et bindende fragment av dette som konkurrerer med det intakte antistoffet for spesifikk binding. Bindende fragmenter er fremstilt ved hjelp av rekombinante DNA-teknikker. De bindende fragmentene er fremstilt ved enzymatisk eller kjemisk spalting av intakte antistoffer. Bindende fragmenter innbefatter, men er ikke begrenset til, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv og enkeltkjedede antistoffer.

Begrepet "tung kjede" innbefatter ethvert polypeptid som har en tilstrekkelig variabel områdesekvens til å gi spesifitet for et OPGL. Begrepet "lett kjede" innbefatter ethvert polypeptid som har tilstrekkelig områdesekvens til å gi spesifitet for et OPGL. En fullengde tung kjede innbefatter et variabelt områdedomene V_H og tre konstante områdedomener C_{H1}, C_{H2} og C_{H3}. V_H-domenet er aminoterminal for polypeptidet, mens C_{H3}-domenet er ved karboksyterminal. Begrepet "tung kjede" slik det brukes her, omfatter en fullengde tung kjede og fragmenter av dette. En fullengde lett kjede innbefatter et variabelt områdedomene V_L og et konstant områdedomene C_L. På lignende måte som i den tunge kjeden, så vil det variable områdedomenet i den lette kjeden være aminoterminal i polypeptidet. Begrepet "lett kjede" slik det brukes her, omfatter en fullengde lett kjede og fragmenter av dette. Et Fab-fragment omfatter en lett kjede og det C_{H1} og de variable områdene i en tung kjede. Den tunge kjeden i et Fab-molekyl kan ikke danne en disulfidbinding med et annet tungkjedemolekyl. Et Fab'-fragment inneholder en lett kjede og en tung kjede som inneholder mer av det konstante området mellom C_{H1}- og C_{H2}-domenene, slik at det kan dannes en interkjede disulfidbinding mellom to tunge kjeder slik at det dannes et F(ab')₂-molekyl. Fv-området omfatter de variable områdene i både de tunge og lette kjedene, men mangler de konstante områdene. Enkeltkjedede antistoffer er Fv-molekyler hvor de tung- og lettkjedede variable områdene er forbundet ved hjelp av en fleksibel linker, slik at de danner en enkelt polypeptidkjede som danner et antigenbindende område. Enkeltkjedede antistoffer er detaljert beskrevet i WO 88/01649 og U.S. patentene nr. 4,946,778 og 5,260,203.

Et bivalent antistoff annet enn et "multispesifikt" eller "multifunksjonelt" antistoff er å forstå å ha hvert av sine bindingssteder identiske.

Et antistoff hemmer i alt vesentlig adhesjon av en ligand til en reseptor når et overskudd av antistoff reduserer mengden av reseptor bundet til motreseptor med minst 20%, 40%, 60%, 80%, 85% eller mer (slik dette kan måles i en *in vitro* konkurrerende bindingsprøve).

Begrepet "epitop" innbefatter enhver polypeptiddeterminant som er i stand til spesifikt å binde seg til et immunoglobulin eller en T-cellereseptor.

- Epitopdeterminanter vil innbefatte kjemisk aktive overflategrupper på molekyler så som aminosyrer, sukkersidekjeder, fosforyl eller sulfonyl, og kan ha spesifikke
- 5 tredimensjonale strukturelle egenskaper og/eller spesifikke ladningsegenskaper. En epitop er et område av et antigen som er bundet ved hjelp av et antistoff. Det er angitt at et antistoff spesifikt binder seg til et antigen når det preferensielt gjenkjenner sitt målantigen i en kompleks blanding av proteiner og/eller makromolekyler. Et antistoff vil bli angitt å spesifikt binde seg til et antigen når
- 10 dissosiasjonskonstanten er $\leq 1 \mu\text{M}$, når dissosiasjonskonstanten er $\leq 100 \text{ nM}$, når dissosiasjonskonstanten er $\leq 10 \text{ nM}$.

Begrepet "middel" slik det brukes her, betegner en kjemisk forbindelse, en blanding av kjemiske forbindelser, et biologisk makromolekyl eller et ekstrakt fra biologiske materialer.

- 15 Med begrepene "markør" eller "merket" forstås inkorporeringen av en påvisbar markør, for eksempel ved å inkorporere en radiomerket aminosyre eller tilknytning til et polypeptid av biotingrupper som kan påvises ved hjelp av merket avidin (for eksempel streptavidin som inneholder en fluorescerende markør eller enzymatisk aktivitet som kan påvises ved hjelp av optiske eller kolorimetriske metoder).
- 20 Markøren kan også være terapeutisk. Det er kjent mange forskjellige fremgangsmåter for merking av polypeptider og glykoproteiner. Eksempler på markører for polypeptider innbefatter, men er ikke begrenset til de følgende radioisotoper eller radionuklider (for eksempel ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), fluorescerende markører (for eksempel FITC, rodamin,
- 25 lantanidfosfor), enzymatiske markører (for eksempel pepperrotperoksidase, β -galaktosidase, luciferase, alkalisk fosfatase), kjemiluminescerende forbindelser eller grupper, biotinyllgrupper, forutbestemte polypeptidepitoper som gjenkjenner en sekundær reporter (for eksempel leukin glidelås ("zipper") parsekvenser, bindende seter for sekundære antistoffer, metallbindende domener, epitoptagger). Markørene
- 30 er tilknyttet ved hjelp av avstandsskapende armer med forskjellige lengder for å redusere eventuell sterisk hindring.

- Begrepet "biologisk prøve" slik det brukes her innbefatter, men er ikke begrenset til, enhver mengde av et stoff fra en levende ting eller en tidligere levende ting eller organisme. Slike levende ting innbefatter, men er ikke begrenset til, mennesker,
- 35 mus, aper, rotter, kaniner og andre dyr. Slike stoffer innbefatter, men er ikke begrenset til, blod, serum, urin, celler, organer, vev, ben, benmarg, lymfeknuter og hud.

- Begrepet "osteopenisk lidelse" innbefatter, men er ikke begrenset til, osteoporose, osteopeni, Pagets sykdom, lytiske benmetastaser, periodontitt, reumatisk artritt og
- 40 bentap som skyldes immobilisering. I tillegg til disse bensykdommene og lidelsene,

er det kjent at visse cancere øker den osteoklastiske aktiviteten og induserer benresorpsjon så som brystkreft, prostatakreft og multippelt myelom. Disse cancere er nå kjent for å fremstille faktorer som resulterer i en overekspressjon av OPGL i benet, noe som fører til økt antall osteoklaster og økt aktivitet.

- 5 Begrepet "farmasøytisk middel eller medikament" slik det brukes her, refererer seg til en kjemisk forbindelse eller sammensetning som er i stand til å indusere en forønsket terapeutisk effekt når dette middelet eller medikamentet blir passende administrert til en pasient.

Begrepet "modulator" slik det brukes her, er en forbindelse som endrer aktiviteten eller funksjonen til et molekyl. For eksempel kan en modulator forårsake en økning eller nedsettelse med hensyn til en viss aktivitet eller funksjon av et molekyl sammenlignet med størrelsen på aktiviteten eller funksjonen som ble observert i fravær av modulatorene. En modulator er en inhibitor som nedsetter størrelsen på minst én aktivitet eller funksjon for et molekyl. Visse eksempler på aktiviteter og funksjoner for molekyler innbefatter, men er ikke begrenset til, bindingsaffinitet, enzymatisk aktivitet og signaloverføring. Visse eksempler på inhibitorer innbefatter, men er ikke begrenset til, proteiner, peptider, antistoffer, peptidlegemer, karbohydrater og små organiske molekyler. Peptidlegemer er for eksempel beskrevet i WO01/83525.

Slik det brukes her, betyr "i alt vesentlig rent" at en forbindelse er den i alt vesentlig tilstedeværende forbindelsen (for eksempel på en molar basis er mer vanlig eller forekommende enn eventuelle andre individuelle forbindelser i sammensetningen). En i alt vesentlig rensset fraksjon vil være en sammensetning hvor den forønskede forbindelsen omfatter minst 50 prosent (på molar basis) av alle de tilstedeværende makromolekylene. En i alt vesentlig ren sammensetning vil omfatte mer enn 80%, 85%, 90%, 95% eller 99% av alle makromolekylene som er tilstede i sammensetningen. Den forønskede forbindelsen vil bli rensset til en i alt vesentlig homogenitet (forurensende forbindelser kan ikke påvises i sammensetningen ved hjelp av vanlige påvisningsmetoder) og hvor sammensetningen som sådan i alt vesentlig består av bare en type makromolekyler.

Begrepet pasient innbefatter mennesker og dyr.

I den foreliggende søknaden vil bruken av entall også innbefatte flertall hvis intet annet er angitt. I foreliggende søknad vil bruken av "eller" bety "og/eller" hvis intet annet er angitt. Bruken av begrepet "inkluderende" så vel som andre former så som "inkluderer" og "inkludert" brukes uten begrensning. Også begreper så som "element" eller "komponent" innbefatter både elementer og komponenter som omfatter en enhet, og elementer og komponenter som omfatter mer enn en underenhet hvis intet annet spesifikt er angitt.

Osteoprotegerinligand (OPGL) hører hjemme i tumor nekrosefaktor (TNF) gruppen av cytokiner og inngår i dannelsen av osteoklaster. Forøkt osteoklastaktivitet er korrelert med en rekke osteopene lidelser så som postmenopausal osteoporose, Pagets sykdom, lytiske benmetastaser og reumatisk artritt. En reduksjon av OPGL-aktiviteten vil derfor kunne resultere i nedsatt osteoklastaktivitet og kan derved redusere graden av osteopene lidelser. Antistoffer som er rettet inn mot OPGL kan brukes for å behandle osteopene lidelser inklusive, men ikke begrenset til, de som er nevnt ovenfor.

Heri beskrives et helt humant monoklonalt antistoff mot human osteoprotegerinligand (OPGL). Det er tilveiebrakt nukleotidsekvenser som koder

det nevnte antistoffet foruten aminosyresekvenser som omfatter tung- og lettkjedede immunoglobulinmolekyler, da spesielt sekvenser som tilsvarer de variable områdene. Det er tilveiebrakt sekvenser som tilsvarer de komplementært bestemmende områdene (CDR), spesifikt fra CDR1 til og med CDR3. Det blir også

5 tilveiebrakt en hybridomcellelinje som uttrykker et slikt immunoglobulinmolekyl og monoklonalt antistoff. Det blir videre tilveiebrakt et renset humant monoklonalt antistoff mot humant OPGL.

Evnen til å klonere og rekonstruere megabase store humane loki i gjær kunstige kromosomer (YAC) og føre disse inn i musegermlinjen, gir en fremgangsmåte for å

10 belyse de funksjonelle komponentene i meget store og grovt kartlagte loki, så vel som å kunne utvikle brukbare modeller for humane sykdommer. Videre vil en anvendelse av slik teknologi hvor man erstatter nevnte museloki med deres humane ekvivalenter, kunne gi enestående innsyn eller innblikk i ekspresjonen og reguleringen av humane genprodukter under utvikling, deres kommunikasjon med

15 andre systemer og hvorledes de inngår i induksjon og utvikling av sykdommer.

En viktig praktisk anvendelse av en slik strategi er den såkalte "humaniseringen" av det humane immunsystemet hos mus. Innføring av humane immunoglobulin (Ig) loki i mus hvor de endogene Ig-genene er blitt inaktivert, gir en stor mulighet for å studere de mekanismene som ligger under en programmert ekspresjon og samling av

20 antistoffer så vel som deres rolle ved B-celleutvikling. Videre vil en slik strategi gi en kilde for produksjon av hele humane monoklonale antistoffer (MAbs). Det er forventet at hele humane antistoffer vil kunne minimalisere de intrinsiske immunogene og allergiske reaksjonene overfor mus eller musederivatiserte monoklonale antistoffene og derfor kunne øke effekten og sikkerheten til de

25 administrerte antistoffene. Hele humane antistoffer vil kunne brukes for behandling av kroniske og tilbakevendende humane sykdommer så som osteoporose, inflammasjon, autoimmunitet og cancer som vil kunne innbefatte gjentatte antistoffadministreringer.

Man kan behandle eller utvikle musestammer som har sviktende

30 museantistoffproduksjon med store fragmenter av de humane Ig-loki i forventning av at slike mus vil kunne produsere humane antistoffer i fraværet av museantistoffer. Store humane Ig-fragmenter kan beholde den store variable gendiversiteten så vel som passende regulering av antistoffproduksjon og ekspresjon. Ved å utnytte musens genmaskineri for antistoffdiversifisering og

35 seleksjon og mangelen på immunologisk toleranse overfor humane proteiner, så kan det reproduserte humane antistoffutvalget i disse musestammene gi høyaffinitets antistoffer mot ethvert antigen av interesse, inklusive humane antigener. Ved å bruke hybridomteknologi, er det mulig å fremstille og velge ut antigenspesifikke MAb med den forønskede spesifiteten.

Det er mulig å bruke konstante områder fra andre arter enn mennesker sammen med de humane variable områdene.

Naturlig forekommende antistoffstruktur

Naturlig forekommende antistoffstrukturelle enheter omfatter typisk en tetramer.

- 5 Hver slik tetramer er typisk sammensatt av to identiske par av polypeptidkjeder, og hvor hvert par har en fullengde "lett" (ca 25 kDa) og en fullengde "tung" kjede (ca 50-70 kDa). Den aminoterminal delen av hver kjede vil typisk innbefatte et variabelt område med fra 100 til 110 eller flere aminosyrer som vanligvis vil være ansvarlig for antigengjenkjennelse. Den karboksyterminale delen av hver kjede vil
- 10 typisk definere et konstant område som er ansvarlig for effektorfunksjonen. Humane lette kjeder er typisk klassifisert som kappa- og lambdalette kjeder. Tunge kjeder er vanligvis klassifisert som my, delta, gamma, alfa eller epsilon, og definerer antistoffisotypen som henholdsvis IgM, IgD, IgG, IgA og IgE. IgG har flere underklasser, inklusive men ikke begrenset til, IgG1, IgG2, IgG3 og IgG4. IgM har
- 15 underklasser som innbefatter, men som ikke er begrenset til, IgM1 og IgM2. IgA er på lignende måte oppdelt i underklasser som inkluderer, men som ikke er begrenset til, IgA1 og IgA2. Innenfor fullengde lette og tunge kjeder vil typisk de variable og konstante områdene være knyttet sammen ved hjelp av et "J"-område med fra 12 eller flere aminosyrer, og hvor den tunge kjeden også innbefatter et "D"-område på
- 20 fra ca 10 eller flere aminosyrer. Se for eksempel Fundamental Immunology kapittel 7 (Paul, W., red. 2. utgave Raven Press, N.Y. (1989)). De variable områdene i hvert av de lette/tunge kjedeparene vil typisk danne det antigenbindende setet.

- De variable områdene vil typisk ha de samme generelle strukturer av relativt konserverte rammeverksområder (FR) knyttet sammen ved hjelp av tre
- 25 hypervariable områder, også kalt komplementerende bestemmende områder eller CDR. De nevnte CDR fra de to kjedene av hvert par vil typisk være på linje (aligned) ved hjelp av rammeverksområdene, noe som muliggjør en binding til en spesifikk epitop. Fra N-terminal til C-terminal, så vil både de lette og tunge kjedevARIABLE områdene typisk omfatte domene FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3,
- 30 CDR3 og FR4. Anvisningen av aminosyrer til hvert domene er typisk i overensstemmelse med de definisjonene som er gitt i Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 og 1991)) eller Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987); Chothia et al. Nature 342: 878-883 (1989).

Bispesifikke eller bifunksjonelle antistoffer

Et bispesifikt eller bifunksjonelt antistoff vil typisk være et kunstig hybridantistoff med to forskjellige par av tunge og lette kjeder og to forskjellige bindings seter.

- 5 Bispesifikke antistoffer kan fremstilles ved en rekke forskjellige fremgangsmåter som innbefatter, men som ikke er begrenset til, fusjon av hybridomer eller en sammenbinding av Fab'-fragmenter. Se for eksempel Songsivilai & Lachmann Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990), Kostelny et al. J. Immunol. 148: 1547-1553 (1992).

Fremstilling av antistoffer

- 10 Antistoffer som spesifikt binder seg til OPGL kan fremstilles ved en immunisering av fulllengde OPGL, løselige former av OPGL, eller et fragment av disse. Antistoffene kan være polyklonale eller monoklonale og/eller de kan være rekombinante antistoffer. Antistoffene kan være humane antistoffer, fremstilt for eksempel ved å immunisere transgene dyr som er i stand til å fremstille humane
15 antistoffer (se for eksempel PCT publisert søknad nr. WO 93/12227).

- De komplementære bestemmende områdene (CDR) kan i de variable områdene i de lette og tunge kjedene i α OPGL-1 kodes på rammeverksområder (FR) fra den samme eller en annen art. Nevnte CDR kan i de variable områdene i de lette og tunge kjedene i α OPGL-1 podes til konsensus humane FR. For å skape slike, så kan
20 FR fra flere tungkjedede eller lettkjedede aminosyresekvenser, bli parallellsammenlignet (aligned) for å identifisere en konsensussekvens. Nevnte FR vil i de α OPGL-1 tunge og lette kjedene bli erstattet med FR fra en annen tung kjede eller lett kjede. Sjeldne aminosyrer vil i FR i de tunge og lette kjedene i α OPGL-1 ikke bli erstattet, mens resten av FR-aminosyrene blir erstattet. Sjeldne
25 aminosyrer er spesifikke aminosyrer som er i posisjoner hvor de vanligvis ikke finnes i rammeverksområdene. De podede variable områdene fra α OPGL-1 kan brukes sammen med et konstant område som er forskjellig fra det konstante området i α OPGL-1. De podede variable områdene er en del av et enkeltkjedet Fv-antistoff. CDR-poding er blant annet beskrevet i U.S. patentene nr. 6,180,370, 5,693,762, 5,693,761, 5,585,089 og 5,530,101.
30

- Antistoffer kan fremstilles ved å bruke en transgen mus hvor en vesentlig del av det humane antistoffproduserende genomet er innsatt, men hvor samtidig musen har sviktende produksjon av endogene, museantistoffer. Slike mus vil således være i stand til å produsere humane immunoglobulinmolekyler og antistoffer og har
35 sviktende produksjon av muse immunoglobulinmolekyler og antistoffer. Teknologier som kan brukes for å oppnå dette resultatet er beskrevet i patenter, søknader og de referanser som her er angitt. Man kan bruke de fremgangsmåtene som for eksempel er beskrevet i PCT publisert søknad nr. WO 98/24893. Se også Mendez et al. Nature Genetics 15: 146-156 (1997).

- Helt humane monoklonale antistoffer som er spesifikke for OPGL kan fremstilles som følger. Transgene mus som inneholder humane immunoglobulingener blir immunisert med antigenet av interesse. Det blir så innvunnet lymfatiske celler (så som B-celler) fra musen som uttrykker antistoffer. Slike innvunne celler blir så
- 5 fusjonert med en cellelinje av myeloidtypen for derved å få fremstilt immortale hybridomcellelinjer, og slike kan så screenes og velges ut for å identifisere hybridomcellelinjer som produserer antistoffer som er spesifikke for antigenet av interesse. Heri beskrives en produksjon av en hybridomcellelinje som fremstiller antistoffer som er spesifikke for OPGL.
- 10 Antistoffene blir fremstilt ved hjelp av hybridomlinjene AMG 6.1, AMG 6.4, AMG 6.5, AMG 7.1 og AMG 7.2. Antistoffene blir fremstilt ved hjelp av hybridomlinjene AMG 6.1, AMG 6.4 og AMG 6.5. Antistoffene vil binde seg til OPGL med en dissosiasjonskonstant (K_d) som ligger omtrent mellom 0,23 og 0,29 nM. Antistoffene vil binde seg til OPGL med en K_d på mindre enn 0,23 nM.
- 15 Antistoffene er av IgG2-isotypen. Antistoffene vil omfatte en human kappa lett kjede og en human IgG2 tung kjede. Antistoffene vil være klonet for ekspresjon i pattedyrceller. De variable områdene vil i antistoffene være ligert til et konstant område som er forskjellig fra det konstante området i IgG2-isotypen.
- Konservative modifikasjoner vil i de tunge og lette kjedene i α OPGL-1 (og
- 20 tilsvarende modifikasjoner i de kodende nukleotidene) produsere antistoffer til OPGL som har funksjonelle og kjemiske egenskaper som er lik de i α OPGL-1. I motsetning til dette, kan vesentlige modifikasjoner med hensyn til de funksjonelle og/eller kjemiske egenskapene for α OPGL-1 oppnås ved å velge substitusjoner i aminosyresekvensen i de tunge og lette kjedene som skiller seg signifikant i sin
- 25 effekt ved å opprettholde (a) strukturen på den molekylære kjeden i substitusjonsområdet, for eksempel som en plate eller som en spiralkonformasjon, (b) ladningen eller hydrofobisiteten til molekylet i målsetet, eller (c) volumet på sidekjeden.
- For eksempel kan en "konservativ aminosyresubstitusjon" innbefatte en substitusjon
- 30 av en opprinnelig og naturlig aminosyregruppe med en ikke-naturlig aminosyregruppe slik at det er liten eller ingen effekt på polariteten eller ladningen på aminosyregruppen i denne posisjonen. Videre kan enhver naturlig og opprinnelig gruppe i polypeptidet også substitueres med alanin, slik det tidligere er beskrevet for "alaninskanningmutagenese".
- 35 Ønskelige aminosyresubstitusjoner (enten disse er konservative eller ikke-konservative) kan lett bestemmes av innsiktsfulle fagpersoner på det tidspunktet hvor slike substitusjoner er ønskelige. Aminosyresubstitusjoner kan brukes for å identifisere viktige grupper i α OPGL-1, eller for å øke eller å nedsette antistoffenes affinitet til OPGL slik dette er beskrevet her.

- Antistoffene kan uttrykkes i cellelinjer som er forskjellige fra hybridomcellelinjer. Sekvenser som koder spesielle antistoffer vil brukes for å transformere en egnet pattedyrvertscelle. Transformasjonen kan utføres ved enhver kjent fremgangsmåte for å føre polynukleotider inn i en vertscelle, for eksempel ved å pakke
- 5 polynukleotidet i et virus (eller i en viral vektor) og så infisere en vertscelle med nevnte virus (eller vektor), eller ved å anvende transfeksjonsmetoder slik disse er kjente, for eksempel som eksemplifisert i U.S. patentene nr. 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461 og 4,959,455. Den transformasjonsmetoden som brukes vil være avhengig av den vert som skal transformeres. Fremgangsmåter for å innføre
- 10 heterologe polynukleotider i pattedyrceller er velkjente innenfor bioteknologien og innbefatter, men er ikke begrenset til, dekstranmediert transfeksjon, kalsiumfosfatutfelling, polybrenmediert transfeksjon, protoplastfusjon, elektroporering, innkapsling av polynukleotider i liposomer og direkte mikroinjeksjon av DNA i kjerner.
- 15 Pattedyrcellelinjer som er tilgjengelige som verter for ekspresjon er velkjente innenfor bioteknologien og innbefatter, men er ikke begrenset til, mange immortaliserte cellelinjer som er tilgjengelige fra "the American Type Culture Collection" (ATCC) og som innbefatter, men som ikke er begrenset til, kinesiske hamstereggstokk (CHO) celler, HeLa-celler, fosterhamsternyre (BHK) celler,
- 20 apenyreceller (COS), humane hepatocellulære karsinomceller (for eksempel Hep G2) og et antall andre lignende cellelinjer. Cellelinjene kan velges ut ved å bestemme hvilken cellelinje som har de høyeste ekspresjonsnivåene og produserer antistoffer med konstitutive OPGL-bindende egenskaper.
- Antistoffene vil kunne brukes for å påvise OPGL i biologiske prøver. Dette vil
- 25 muliggjøre identifikasjonen av celler eller vev som produserer proteinet. Antistoffer som binder seg til OPGL og blokkerer interaksjon med andre bindende forbindelser vil ha terapeutisk anvendelse for å modulere osteoklastdifferensiering og benresorpsjon. Antistoffer til OPGL vil kunne blokkere OPGL-binding til ODA, og dette vil kunne resultere i en blokkering av signaloverføringskaskaden og tap av
- 30 NF-kB-mediert transkripsjonsaktivering. Prøver for å måle NF-kB-mediert transkripsjonsaktivering, for eksempel ved å bruke en luciferase reporterprøve, er velkjente for fagpersoner innenfor fagfeltet.
- Heri beskrives fremgangsmåter for å behandle en benlidelse som omfatter å administrere en terapeutisk effektiv mengde av et antistoff til OPGL. Det beskrives
- 35 videre fremgangsmåter for å behandle en benlidelse som omfatter å administrere en terapeutisk effektiv mengde av et antistoff til OPGL og et annet terapeutisk middel. Det ytterligere terapeutiske middelet vil bli administrert i en terapeutisk effektiv mengde. I visse fremgangsmåter er benlidelsen en lidelse som er karakterisert ved et netto bentap og innbefatter, men er ikke begrenset til, osteopeni og osteolyse. I
- 40 visse fremgangsmåter vil behandling med et antistoff til OPGL bli brukt for å nedsette eller å undertrykke hastigheten med hensyn til benresorpsjon. I visse

fremgangsmåter kan derfor behandlingen brukes for å redusere hastigheten av benresorpsjon når denne hastigheten ligger over den normale, eller for å redusere benresorpsjonen til nivåer under det normale for å kompensere for tidligere lave nivåer med hensyn til bendannelse. I visse fremgangsmåter kan antistoffene testes for binding til OPGL i fraværet eller nærværet av OPG og derved undersøkes for sin evne til å hemme OPGL-mediert osteoklastogenese og/eller benresorpsjon.

Tilstander som kan behandles innbefatter, men er ikke begrenset til, de følgende:

- 10 Osteoporose inklusive, men ikke begrenset til, primær osteoporose, endokrin osteoporose (inklusive, men ikke begrenset til, hypertyroidisme, hyperparatyroidisme, Cushings syndrom og akromegali), arvelige og kongenitale former av osteoporose (inklusive, men ikke begrenset til, osteogenese imperfekta, homocystinuri, Menkes syndrom, Riley-Day syndrom) og osteoporose som skyldes immobilisering av ekstremiteter;
- 15 Pagets sykdom i ben (osteititt deformans) hos voksne og unge personer;
- 15 Osteomyelitt, det vil si et infeksjonssår i ben som fører til bentap;
- 20 Hyperkalsemi inklusive, men ikke begrenset til, hyperkalsemi som er et resultat av faste tumorer (inklusive, men ikke begrenset til, bryst, lunger og nyrer) og hematologisk ondartede sykdommer (inklusive, men ikke begrenset til, multippelt myelom, lymfom og leukemi), idiopatisk hyperkalsemi, foruten hyperkalsemi assosiert med hypertyroidisme og nyrefunksjonslidelser;
- 25 Osteopeni inklusive, men ikke begrenset til, osteopeni etter kirurgiske inngrep, osteopeni induisert ved steroid administrering, osteopeni assosiert med lidelser i tynn- eller tykktarmen og osteopeni assosiert med kroniske nyrelidelser;
- 30 Osteonekrose, det vil si bencelledød inklusive, men ikke begrenset til, osteonekrose assosiert med traumatisk skade, osteonekrose assosiert med Gauchers sykdom, osteonekrose assosiert med sigdcelleanemi, osteonekrose assosiert med systemisk lupus erytematose, osteonekrose assosiert med reumatisk artritt, osteonekrose assosiert med periodontal sykdom, osteonekrose assosiert med osteolytisk metastase og osteonekrose assosiert med andre tilstander; og

Tap av brusk og ledderosjon som er assosiert med reumatisk artritt.

Et antistoff til OPGL kan brukes alene eller sammen med minst ett ytterligere terapeutisk middel for behandling av benlidelser. Et antistoff til OPGL vil brukes sammen med en terapeutisk effektiv mengde av et ytterligere terapeutisk middel. Eksempler på terapeutiske midler som kan administreres sammen med et antistoff til OPGL innbefatter, men er ikke begrenset til, de benmorfogene faktorene som er

- betegnet BMP-1 til og med BMP-12; transformerende vekstfaktor- β (TGF- β) og andre faktorer som hører til TGF- β -gruppen; interleukin-1 (IL-1) inhibitorer som innbefatter, men som ikke er begrenset til, IL-1ra og derivater av disse og KineretTM; TNF α -inhibitorer som innbefatter, men som ikke er begrenset til, 5 løselige TNF α -reseptorer, EnbrelTM, anti-TNF α -antistoffer, RemicadeTM og D2E7-antistoffer; paratyroidhormon og analoger av disse; paratyroidrelatert protein og analoger av dette; E-serier av prostaglandiner; bisfosfonater (så som alendronat og andre); benforbedrende mineraler så som fluorid og kalsium; ikke-steroidale antiinflammatoriske medikamenter (NSAID) som innbefatter, men som ikke er 10 begrenset til, COX-2-inhibitorer så som CelebrexTM og VioxxTM; immunundertrykkende midler så som metotreksat eller leflunomid; serinproteaseinhibitorer som innbefatter, men ikke er begrenset til, sekretorisk leukocytproteaseinhibitor (SLPI); IL-6-inhibitorer (som inkluderer, men ikke er begrenset til, antistoffer mot IL-6); IL-8-inhibitorer (som inkluderer, men ikke er 15 begrenset til, antistoffer mot IL-8); IL-18-inhibitorer (som inkluderer, men ikke er begrenset til, IL-18-bindende proteiner og IL-18-antistoffer); interleukin-1-omdannende enzym (ICE) modulatorer; fibroblastvekstfaktorer FGF-1 til FGF-10 og FGF-modulatorer; PAF-antagonister; keratinocytvekstfaktor (KGF), KGF-relaterte molekyler og KGF-modulatorer; matrise metalloprotease (MMP) 20 modulatorer; nitrittoksidsyntase (NOS) modulatorer som innbefatter, men ikke er begrenset til, modulatorer av induserbart NOS; modulatorer av glukokortikoidreseptor; modulatorer av glutamatreseptor; modulatorer av lipopolysakkarid (LPS) nivåer; og noradrenalin og modulatorer og mimetika av denne.
- 25 Et antistoff til OPGL kan brukes sammen med forskjellige terapeutiske midler for   behandle forskjellige inflammatoriske tilstander, autoimmune tilstander eller andre tilstander med et medfølgende bentap. På bakgrunn av tilstanden og det forønskede behandlingsniv et, kan to eller tre eller flere midler administreres. Slike midler kan tilveiebringes ved at de inkluderes i det samme preparatet eller sammensetningen.
- 30 Slike midler og et antistoff til OPGL vil bli tilveiebrakt for sammensetning i det samme preparatet. Slike midler kan tilveiebringes ved at de inkluderes i et behandlingssett. Slike midler og et antistoff til OPGL vil kunne tilveiebringes sammen for sammensetning i et behandlingssett. Slike midler kan tilveiebringes separat. Når de administreres ved genterapi, så kan gener som koder for 35 proteinmidler og/eller et antistoff til OPGL inkluderes i den samme vektoren. De gener som koder proteinmidler og/eller et antistoff til OPGL kan være under kontroll av det samme promotoromr det. De genene som koder proteinmidler og/eller et antistoff til OPGL vil være i separate vektorer.
- 40 Heri beskrives terapier som omfatter et antistoff til OPGL og minst én interleukin-1 (IL-1) inhibitor og fremgangsmåter for behandling hvor man anvender slike terapier. En terapi vil omfatte et antistoff til OPGL og en IL-1-inhibitor og minst ett

ytterligere molekyl som beskrevet her. Fremgangsmåter for behandling vil anvende IL-1-inhibitorer og/eller TNF- α -inhibitorer sammen med et antistoff til OPGL. Et antistoff til OPGL i kombinasjon med IL-1-inhibitorer og/eller TNF- α -inhibitorer vil kunne brukes for behandling av tilstander så som astma, reumatisk artritt og

5 multippel sklerose.

Interleukin-1 (IL-1) er et antiinflammatorisk cytokin. I visse tilfeller er IL-1 en mediator i mange sykdommer og medisinske tilstander. I visse tilfeller blir IL-1 fremstilt av celler av makrofag-/monocyttopprinnelse. I visse tilfeller blir IL-1 fremstilt i to former: IL-1 alfa (IL-1 α) og IL-1 beta (IL-1 β).

- 10 En sykdom eller en medisinsk tilstand er ansett å være en "interleukin-1-mediert sykdom" hvis den spontane eller eksperimentelt frembrakte sykdommen eller medisinske tilstanden er assosiert med forhøyede nivåer av IL-1 i kroppsvæsker eller vev og/eller hvis celler eller vev tatt fra kroppen produserer forhøyede nivåer av IL-1 i kultur. Slike interleukin-1-medierte sykdommer vil også kunne
- 15 gjenkjennes ved de følgende to ytterligere tilstandene: (1) Patologiske observasjoner assosiert med sykdommen eller den medisinske tilstanden kan etterlignes eller frembringes eksperimentelt i dyr ved å administrere IL-1 eller foreta en oppregulering av ekspresjonen av IL-1; og (2) en patologi induert i eksperimentelle dyremodeller av sykdommen eller den medisinske tilstanden kan
- 20 hemmes eller fjernes ved behandling av midler som hemmer virkningen av IL-1. En eller flere av de ovennevnte tilstandene vil opptre i en IL-1-mediert sykdom. Alle tre tilstandene vil opptre i en IL-1-mediert sykdom.

- Akutte og kroniske interleukin-1 (IL-1) medierte sykdommer innbefatter, men er ikke begrenset til, følgende: Akutt pankreatitt; amyotrofisk lateral sklerose (ALS eller Lou Gehrigs sykdom); Alzheimers sykdom; cachexi/anoreksi som innbefatter, men som ikke er begrenset til, AIDS-indusert cachexi; astma og andre
- 25 lungesykdommer; aterosklerose; autoimmun vaskulitt; kronisk tretthetssyndrom; clostridium-assosiert sykdom som innbefatter, men ikke er begrenset til, clostridium-assosiert diaré; koronare tilstander og indikasjoner som innbefatter, men som ikke er begrenset til, kongestiv hjertesvikt, koronar restenose, myokardialt infarkt, myokardial dysfunksjon (for eksempel relatert til sepsis) og koronar arterie bypass transplantering; cancer som innbefatter, men som ikke er begrenset til, leukemi som innbefatter, men ikke er begrenset til, multippel myelom leukemi og myelogene leukemier (for eksempel AML og CML) og tumormetastaser; diabetes
- 30 (som inkluderer, men ikke er begrenset til, insulinavhengig diabetes); endometriose; feber; fibromyalgi; glomerulonefritt; transplanterte organer versus vertssykdommer og/eller avstøtning av transplanterte organer; blødningssjokk; hyperalgesi; inflammatorisk tarmsykdom; inflammatoriske tilstander i et ledd som innbefatter, men ikke er begrenset til, osteoartritt, psoriatisk artritt og reumatisk artritt;
- 40 inflammatoriske øyesykdommer som innbefatter, men ikke er begrenset til, de som

for eksempel er assosiert med korneatransplanteringer; ischemi som innbefatter, men ikke er begrenset til, cerebral ischemi (som innbefatter, men ikke er begrenset til, en hjerneskode som et resultat av for eksempel traume, epilepsi, blødninger eller slag som alle kan føre til nevrodegenerering); Kawasakis sykdom;

5 læringsproblemer; lungesykdommer (som inkluderer, men ikke er begrenset til, akutt respiratorisk stressyndrom eller ARDS); multippel sklerose; myopatiser (for eksempel muskelproteinmetabolisme som inkluderer, men som ikke er begrenset til, muskelproteinmetabolisme i sepsis); nevrotoksitet (som inkluderer, men ikke er begrenset til, slike tilstander som er induisert av HIV); osteoporose; smerte som

10 innbefatter, men ikke er begrenset til, cancerrelatert smerte; Parkinsons sykdom; periodontal sykdom; for tidlige veer; psoriasis; reperfusjonsskade; septisk sjokk; sideeffekter av strålingsterapi; temporal mandibular leddsykdom; søvnforstyrrelser; uveitt; og en inflammatorisk tilstand som for eksempel er et resultat av en forstrekning, en forstuing, bruskskade, traume, ortopedisk kirurgisk inngrep,

15 infeksjon eller andre sykdomsprosesser.

En IL-1-inhibitor kan være ethvert protein eller molekyl som er i stand til spesifikt å hindre aktivering av cellulære reseptorer til IL-1 som kan være et resultat av en rekke forskjellige mekanismer. Eksempler på mekanismer innbefatter, men er ikke begrenset til, en nedregulering av IL-1-produksjon, binding av fritt IL-1, påvirkning

20 av IL-1-binding til dens reseptor, påvirkning av dannelsen av IL-1-reseptorkomplekset (for eksempel assosiasjon av IL-1-reseptor med IL-1-reseptorassessorisk protein) og en påvirkning av moduleringen av IL-1-signaliseringen etter bindingen til dens reseptor.

Visse interleukin-1-inhibitorer innbefatter, men er ikke begrenset til, IL-1-reseptorantagonister og disse innbefatter, men er ikke begrenset til, KineretTM, IL-1ra, IL-1ra-varianter og IL-1ra-derivater som kollektivt betegnes "IL-1ra-proteiner"; anti-IL-1-reseptor monoklonale antistoffer (se for eksempel EP 623674); IL-1-bindende proteiner som innbefatter, men ikke er begrenset til, løselige IL-1-reseptorer (se for eksempel U.S. patent nr. 5,492,888, U.S. patent nr. 5,488,032 og

30 U.S. patent nr. 5,464,937, U.S. patent nr. 5,319,071 og U.S. patent nr. 5,180,812); anti-IL-1-monoklonale antistoffer (se for eksempel WO 9501997, WO 9402627, WO 9006371, U.S. patent nr. 4,935,343, EP 364778, EP 267611 og EP220063); IL-1-reseptor assessoriske proteiner og antistoffer til disse (se for eksempel WO 96/23067 og WO 99/37773); inhibitorer av interleukin-1 beta-konverterende enzym

35 (ICE) eller kaspase I (se for eksempel WO 99/46248, WO 99/47545 og WO 99/47154) som kan brukes for å hemme IL-1 betaproduksjon og -sekresjon; interleukin-1beta proteaseinhibitorer; og andre forbindelser og proteiner som blokkerer en *in vivo* syntese eller ekstracellulær frigjøring av IL-1.

Eksempler på IL-1-inhibitorer er blant annet beskrevet i U.S. patentene nr.

40 5,747,444; 5,359,032; 5,608,035; 5,843,905; 5,359,032; 5,866,576; 5,869,660; 5,869,315; 5,872,095; 5,955,480; 5,965,564; internasjonal (WO) patentsøknader

98/21957, 96/09323, 91/17184, 96/40907, 98/32733, 98/42325, 98/44940, 98/47892, 98/56377, 99/03837, 99/06426, 99/06042, 91/17249, 98/32733, 98/17661, 97/08174, 95/34326, 99/36426, 99/36415; europeiske (EP) patentsøknader 534978 og 894795; og fransk patentsøknad FR 2762514.

- 5 En interleukin-1-reseptorantagonist (IL-1ra) er et humant protein som virker som en naturlig inhibitor av interleukin-1 og som hører hjemme i IL-1-gruppen som innbefatter IL-1 α og IL-1 β . Visse reseptorantagonister inklusive IL-1ra og varianter og derivater av disse, så vel som fremgangsmåter for fremstilling og bruk av dem er beskrevet i U.S. patent nr. 5,075,222; WO 91/08285; WO 91/17184; AU 9173636; 10 WO 92/16221; WO 93/21946; WO 94/06457; WO 94/21275; FR 2706772; WO 94/21235; DE 4219626; WO 94/20517; WO 96/22793; WO 97/28828; og WO 99/36541. En IL-1-reseptorantagonist kan være glykosylert. En IL-1-reseptorantagonist kan være ikke-glykosylert.

- 15 Tre former av IL-1ra og varianter av denne er beskrevet i U.S. patent nr. 5,075,222 (det såkalte '222-patentet). Den første formen som i nevnte '222-patentet kalles "IL-1i" er karakterisert som et 22-23 kD molekul på SDS-PAGE med et omtrentlig isoelektrisk punkt på 4,8 og som elueres fra en Mono Q FPLC-kolonne ved omkring 52 mM NaCl i Tris-buffer, pH 7,6. Den andre formen, IL-1ra β , er karakterisert som et 22-23 kD protein som elueres fra en Mono Q-kolonne ved 48 mM NaCl. Både IL- 20 1ra α og IL-1ra β er glykosylerte. Den tredje formen, IL-1rax, er karakterisert som et 20 kD protein som elueres fra en Mono Q-kolonne ved 48 mM NaCl og som er ikke-glykosylert. '222-patentet beskriver også visse fremgangsmåter for å isolere gener som koder for inhibitorene, fremgangsmåter for kloning av disse genene i egnede vektorer foruten en transformering og transfektering av disse genene inn i 25 visse celletyper, og ekspresjon av disse genene for fremstilling av inhibitorene.

Det kan utføres delesjoner, innsettinger og/eller substitusjoner (individuell eller samlet betegnet som "variant(er)") i aminosyresekvensene i IL-1ra. En IL-1ra-variant vil være biologisk aktiv (det vil si ha evnen til å hemme IL-1).

- 30 Heri beskrives terapier som omfatter et antistoff til OPGL og minst én TNF α -inhibitor og fremgangsmåter for behandling hvor man anvender slike terapier. En terapi vil omfatte et antistoff til OPGL og en TNF α -inhibitor og minst ett ytterligere molekul som beskrevet her.

- 35 Visse sykdommer og medisinske tilstander er kontrollert eller mediert av TNF og kan kategoriseres som inflammatoriske tilstander. Slik begrepet brukes her, innbefatter en "TNF-mediert sykdom", men er ikke begrenset til, en sykdom eller medisinsk tilstand som er assosiert med forhøyede nivåer av TNF i kroppsvæsker eller i vev og/eller hvor celler eller vev som er tatt fra kroppen produserer forhøyede nivåer av TNF i kultur. En sykdom vil være en TNF-mediert sykdom hvis (1) patologiske observasjoner assosiert med sykdommen eller den medisinske 40 tilstanden kan etterlignes eksperimentelt i dyr ved administrering eller ved en

oppregulering av ekspresjonen av TNF og/eller (2) en patologi induisert i eksperimentelle dyremodeller av sykdommen, eller en medisinsk tilstand kan hemmes eller fjernes ved behandling med midler som hemmer virkningen av TNF.

- 5 Visse akutte og kroniske TNF-medierte sykdommer innbefatter, men er ikke begrenset til: Cachexi og anoreksi; cancer som innbefatter, men som ikke er begrenset til, leukemi; kronisk tretthetssyndrom; koronare tilstander og/eller indikasjoner som innbefatter, men som ikke er begrenset til, kongestiv hjertesvikt, koronar restenose, myokardialt infarkt, myokardial dysfunksjon (som innbefatter, men ikke er begrenset til, slike tilstander som er relatert til sepsis) og koronare
- 10 arterie bypass transplanteringer; depresjon; diabetes som innbefatter, men som ikke er begrenset til, ungdoms type 1 diabetes, diabetes mellitus og insulinresistens (som innbefatter, men som ikke er begrenset til, insulinresistens assosiert med overvekt); endometriose, endometritt og relaterte tilstander; fibromyalgi og analgesi; vertsavstøtning av innpodede organer; hyperalgesi; inflammatoriske
- 15 tarmsykdommer som inkluderer, men ikke er begrenset til, Crohns sykdom og Clostridium difficile-assosierte diaré; ischemi som innbefatter, men ikke er begrenset til, cerebral ischemi som innbefatter, men ikke er begrenset til, hjerneskade som et resultat av traume, epilepsi, blødninger og/eller slag; lungesykdommer som innbefatter, men ikke er begrenset til, voksent respiratorisk
- 20 stressyndrom, astma og lungefibrose; multippel sklerose; nevroinflammatoriske sykdommer; øyesykdommer og tilstander som innbefatter, men ikke er begrenset til, korneatransplantering, okular degenerering og uveitt; smerte som innbefatter, men ikke er begrenset til, cancerrelatert smerte; pankreatitt; periodontale sykdommer; Pityriasis rubra pilaris (PRP); prostatitt som innbefatter både bakteriell og ikke-
- 25 bakteriell prostatitt og relaterte tilstander; psoriasis og relaterte tilstander; lungefibrose; reperfusjonsskade; reumatiske sykdommer som innbefatter, men som ikke er begrenset til, reumatisk artritt, osteoartritt, ungdomsartritt (som innbefatter, men ikke er begrenset til, juvenil reumatisk artritt), seronegativ polyartritt, ankyloserende spondylitt, Reiters syndrom og reaktiv artritt, psoriatisk artritt,
- 30 enteropatisk artritt, polymyositt, dermatomyositt, skleroderma, systemisk sklerose, vaskulitt (for eksempel Kawasakis sykdom), cerebral vaskulitt, Lymes sykdom, stafylokokkindusert ("septisk") artritt, Sjögrens syndrom, reumatisk feber, polykondritt og polymyalgi reumatika og gigantcelleartritt); septisk sjokk; sideeffekter av strålingsterapi; systemisk lupus erytematose (SLE); temporal
- 35 mandibular leddsykdom; tyroiditt; og vevstransplantering og/eller en inflammatorisk tilstand som er et resultat av forstrekning, forstuing, bruskskade, traume, ortopediske kirurgiske inngrep, infeksjon (for eksempel HIV, Clostridium difficile og relaterte arter) eller andre sykdomsprosesser.

- 40 TNF-inhibitorene vil virke slik at de i det minste nedregulerer eller hemmer TNF-produksjon, binder fritt TNF, påvirker TNFs binding til dens reseptor og påvirker moduleringen av TNF-signaliseringen etter bindingen til dens reseptor. Begrepet

"TNF-inhibitor" inkluderer, men er ikke begrenset til, løseliggjorte TNF-reseptorer inklusive, men ikke begrenset til, løselig tumor nekrosefaktor reseptor type I (sTNF-RI; også kalt p55-reseptoren), løselig tumor nekrosefaktor reseptor type II (også kalt p75-reseptoren) og EnbrelTM; antistoffer til TNF som inkluderer, men ikke er begrenset til, RemicadeTM og D2E7 (se for eksempel U.S. patentene nr. 6,090,382 og 6,258,562); antistoffer til TNF-reseptor; sTNF-RI (se for eksempel WO 98(24463), etanercept (EnbrelTM), AvakinTM; inhibitorer av TNF- α -omdannende enzym (TACE); og andre molekyler som påvirker TNF-aktivitet.

Eksempler på TNF- α -inhibitorer er blant annet beskrevet i europeiske patentsøknader EP 308 378; EP 422 339; EP 393 438; EP 398 327; EP 415 486; EP 418 014; EP 417 563; EP 433 900; EP 464 533; EP 512 528; EP 526 905; EP 568 928; EP 607 776 som beskriver bruken av leflunomid for inhibering av TNF- α ; EP 663 210; EP 542 795; EP 818 439; EP 664 128; EP 542 795; EP 741 707; EP 874 819; EP 882 714; EP 880 970; EP 648 783; EP 731 791; EP 895 988; EP 550 376; EP 882 714; EP 853 083; EP 550 376; EP 943 616; EP 939 121; EP 614 984; EP 583 083; U.S. patent nr. 5,136,021; 5,929,117; 5,948,638; 5,807,862; 5,695,953; 5,834,435; 5,817,822; 5,830,742; 5,834,435; 5,851,556; 5,853,977; 5,359,037; 5,512,544; 5,695,953; 5,811,261; 5,633,145; 5,863,926; 5,866,616; 5,641,673; 5,869,677; 5,869,511; 5,872,146; 5,854,003; 5,856,161; 5,877,222; 5,877,200; 5,877,151; 5,886,010; 5,869,660; 5,859,207; 5,891,883; 5,877,180; 5,955,480; 5,955,476; 5,955,435; 5,994,351; 5,990,119; 5,952,320; 5,962,481; internasjonale patentsøknader WO 90/13575, WO 91/03553, WO 92/01002, WO 92/13095, WO 92/16221, WO 93/07863, WO 93/21946, WO 93/19777, WO 95/34326, WO 96/28546, WO 98/27298, WO 98/30541, WO 96/38150, WO 96/38150, WO 97/18207, WO 97/15561, WO 97/12902, WO 96/25861, WO 96/12735, WO 96/11209, WO 98/39326, WO 98/39316, WO 98/38859, WO 98/39315, WO 98/42659, WO 98/39329, WO 98/43959, WO 98/45268, WO 98/47863, WO 96/33172, WO 96/20926, WO 97/37974, WO 97/37973, WO 97/47599, WO 96/35711, WO 98/51665, WO 98/43946, WO 95/04045, WO 98/56377, WO 97/12244, WO 99/00364, WO 99/00363, WO 98/57936, WO 99/01449, WO 99/01139, WO 98/56788, WO 98/56756, WO 98/53842, WO 98/52948, WO 98/52937, WO 99/02510, WO 97/43250, WO 99/06410, WO 99/06042, WO 99/09022, WO 99/08688, WO 99/07679, WO 99/09965, WO 99/07704, WO 99/06041, WO 99/37818, WO 99/37625, WO 97/11668, WO 99/50238, WO 99/47672, WO 99/48491; japanske patentsøknader 10147531, 10231285, 10259140 og 10130149, 10316570, 11001481 og 127,800/1991; tysk patentsøknad nr. 19731521; og britiske patentsøknader nr. 2 218 101, 2 326 881, 2 246 569.

EP 393 438 og EP 422 339 beskriver aminosyren og nukleinsyresekvensene for en løselig TNF-reseptor type I (også kjent sTNFR-I eller 30 kDa TNF-inhibitor) og en løsning TNF-reseptor type II (også kjent som sTNFR-II eller 40 kDa TNF-inhibitor) som kollektivt betegnes "sTNFRs". EP 393 438 og EP 422 339 beskriver også

modifiserte former av sTNFR-I og sTNFR-II som innbefatter, men ikke er begrenset til, fragmenter, funksjonelle derivater og varianter. Videre beskriver EP 393 438 og EP 422 339 fremgangsmåter for å isolere gener som koder for inhibitorene, fremgangsmåter for å klonere genene inn i egnede vektorer, fremgangsmåter for å transformere og transfekte genene inn i visse celletyper og å uttrykke genene for derved å få fremstilt inhibitorene.

sTNFR-I og sTNFR-II hører til nervevekstfaktor/TNF-reseptorsupergruppen av reseptorer som innbefatter nervevekstfaktorreseptoren (NGF), B-celleantigenet CD40, 4-1BB, rotte T-celleantigenet MRC OX40, fasantigenet og Cd27- og CD30-antigenene (Smith et al. (1990) Science, 248: 1019-1023). En konserverert del i denne gruppen av celleoverflaterreseptorer er et cysteinrikt ekstracellulært ligandbindende domene som kan oppdeles i fire gjentatte motiver med ca 40 aminosyrer som inneholder fra 4 til 6 cysteinresidua i posisjoner som er godt konserverert (Smith et al. (1990), supra).

EP 393 438 beskriver en 40 kDa TNF-inhibitor $\Delta 51$ og en 40 kDa TNF-inhibitor $\Delta 53$ som er trunkerte (forkortede) versjoner av det fullengde rekombinante 40 kDa TNF-inhibitorproteinet. $\Delta 51$ og $\Delta 53$ har henholdsvis 51 eller 53 aminosyrer, fjernet fra karboksylterminus i det modne eller fullengde proteinet.

Publisert PCT-søknad nr. WO 98/01555 beskriver trunkerte former av sTNFR-I og sTNFR-II som ikke inneholder det fjerde domenet (aminosyreresiduaene Thr¹²⁷-Asn¹⁶¹ i sTNFR-I og aminosyreresiduaene Pro¹⁴¹-Thr¹⁷⁹ i sTNFR-II); en del av det tredje domenet (aminosyreresiduaene Asn¹¹¹-Cys¹²⁶ i sTNFR-I og aminosyreresiduaene Pro¹²³-Lys¹⁴⁰ i sTNFR-II); og eventuelt ikke inneholder en del av det første domenet (aminosyreresiduaene Asp¹-Cys¹⁹ i sTNFR-I og aminosyreresiduaene Leu¹-Cys³² i sTNFR-II). De vil trunkerte sTNFR inkludere proteiner representert ved formelen R₁-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂ og R₄-[Cys³²-Cys¹¹⁵]-R₅. Disse proteinene er trunkerte former av henholdsvis sTNFR-I og sTNFR-II.

Slik det brukes her, representerer "R₁-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂" ett eller flere proteiner hvor [Cys¹⁹-Cys¹⁰³] er residuaene eller gruppene 19 til og med 103 i sTNFR-I, og hvor sekvensen er gitt på figur 1 i WO 98/01555; hvor R₁ representerer en metionylert eller ikke-metionylert aminogruppe av Cys¹⁹ eller en eller flere aminoterminal aminosyreresidua valgt fra Cys¹⁸ til Asp¹; og hvor R₂ representerer en karboksygruppe av Cys¹⁰³, eller en eller flere karboksyterminale aminosyreresidua valgt fra Phe¹⁰⁴ til Leu¹¹⁰.

Eksempler på trunkerte sTNFR-I innbefatter, men er ikke begrenset til, sTNFR-1 2.6D/C105, sTNFR-1 2.6D/C106, sTNFR-1 2.6D/N105, sTNFR-1 2.3D/d8, sTNFR-1 2.3D/d18, sTNFR-1 2.3D/d15, enten metionylerte eller ikke-metionylerte, og varianter og derivater av disse. Visse eksempler på trunkerte sTNFR-I er beskrevet for eksempel i publisert PCT-søknad nr. WO 98/01555.

Slik det brukes her, representerer "R₃-[Cys³²-Cys¹¹⁵]-R₄" ett eller flere proteiner hvor [Cys³²-Cys¹¹⁵] er residuaene Cys³² til og med Cys¹¹⁵ i sTNFR-II, og hvis sekvens er gitt på figur 8 i WO 98/01555; og hvor R₃ representerer en metionylert eller ikke-metionylert amingruppe av Cys³² eller en eller flere aminoterminala

5 aminosyreresidua valgt fra Cys³¹ til Leu¹; og hvor R₄ representerer en karboksygruppe av Cys¹¹⁵ eller en eller flere karboksyterminale aminosyreresidua valgt fra Ala¹¹⁶ til Arg¹²².

Heri beskrives terapier som omfatter et antistoff til OPGL og minst én serinproteaseinhibitor, og fremgangsmåter for behandling hvor man anvender slike

10 terapier. Terapien vil omfatte et antistoff til OPGL og en serinproteaseinhibitor og minst ett ytterligere molekyl som beskrevet her.

Endogene proteolytiske enzymer kan bryte ned invaderende organismer, antigen-antistoffkomplekser og visse vevsproteiner som ikke lenger er nødvendige eller brukbare. Infiserende midler kan innføre ytterligere proteolytiske enzymer i

15 organismen. Proteaseinhibitorer kan regulere både endogene og invaderende proteolytiske enzymer.

Naturlig forekommende proteaseinhibitorer vil tjene til å kontrollere endogene proteaser ved å begrense deres reaksjoner lokalt og temporært. Proteaseinhibitorer vil kunne hemme proteaser som er ført inn i kroppen av infiserende organismer. I

20 visse tilfeller er vev som er spesielt utsatt for proteolytiske angrep og infeksjon inklusive, men ikke begrenset til, de i luftveiene, rike på proteaseinhibitorer.

Proteaseinhibitorer omfatter ca 10% av proteinene i humant plasma. Minst åtte inhibitorer er blitt isolert fra denne kilden og karakterisert i litteraturen. Disse innbefatter, men er ikke begrenset til, alfa 2-makroglobulin (alfa 2M), alfa 1-proteaseinhibitor (alfa 1PI), alfa 1-antichymotrypsin (alfa 1Achy), alfa 1-anticollagenase (alfa 1AC) og inter-alfa-trypsininhibitor (I-alfa-I).

25

I visse tilfeller vil en forstyrrelse av protease/proteaseinhibitorbalansen føre til en proteasestyrte vevsdestruksjon som inkluderer, men ikke er begrenset til, emfysem, artritt, glomerulonefritt, periodontitt, muskulær dystrofi, tumorinvasjon og

30 forskjellige andre patologiske tilstander. I visse situasjoner, for eksempel under alvorlige patologiske prosesser så som sepsis eller blodforgiftning eller akutt leukemi, vil mengden av frie proteolytiske enzymer kunne øke på grunn av at enzymet frigjøres fra sekretoriske celler.

En svekket regulering av organismens inhibitor kapasitet kan videre i visse tilfeller også endre protease/proteaseinhibitorbalansen. Et ikke-begrensende eksempel på en slik svekket regulerende inhibitor kapasitet er en alfa 1-proteaseinhibitorsvikt som er korrelert med utviklingen av lungeemfysem.

- 5 I visse tilfeller kan organismen skades alvorlig når slike avvikende tilstander er tilstede hvis det ikke tas forholdsregler for å kontrollere de proteolytiske enzymene. Det er derfor ønskelig å kunne tilveiebringe proteaseinhibitorer som kan administreres en organisme for å kontrollere proteolytiske enzymer.

- 10 Leukocytlastase, trypsin, katepsin G og pankreatisk elastase er ikke-begrensende eksempler på en gruppe av proteaser som er kjent som serinproteaser.

- I visse tilfeller kan leukocytlastase, når det frigjøres ekstracellulært, bryte ned bindevev og andre verdifulle proteiner. Mens en normalt fungerende organisme bryter ned en viss mengde bindevev og andre proteiner, så vil et nærvær av forhøyede mengder av leukocytlastase kunne være assosiert med forskjellige
15 patologiske tilstander som inkluderer, men ikke er begrenset til, emfysem og reumatisk artritt. For å motvirke effektene av leukocytlastase når dette enzymet er tilstede i større mengder enn det som er normalt, vil det være ønskelig å kunne tilveiebringe en proteaseinhibitor som er spesifikk for leukocytlastase. En slik proteaseinhibitor kan være verdifull hvis den er i stand til å kunne isoleres og
20 fremstilles i en renset form og i tilstrekkelige mengder til å kunne brukes farmasøytisk.

- Visse leukocytlastaseinhibitorer er beskrevet, for eksempel i Schiessler et al., "Acid-Stable Inhibitors of Granulocyte Neutral Proteases in Human Mucous Secretions: Biochemistry and Possible Biological Function", i Neutral Proteases of
25 Human Polymorphonuclear Leucocytes, Havemann et al. (red), Urban and Schwarzenberg, Inc. (1978) og i Travis og Salvesen, Ann. Rev. Biochem. 52: 655-709 (1983).

- I visse tilfeller vil trypsin starte en nedbrytning av visse typer mykt organvev så som pankreasvev under en rekke forskjellige akutte tilstander som innbefatter, men
30 ikke er begrenset til, apkreatitt. En trypsininhibitor kan således være verdifull hvis den kan isoleres og fremstilles i en renset form og i tilstrekkelige mengder til å kunne brukes farmasøytisk.

- Kathepsin G er en annen protease som er tilstede i leukocytter. Kathepsin G vil være i stand til å bryte ned en rekke proteiner *in vitro*, inklusive de i
35 komplementreaksjonsveien. Pankreatisk elastase er en annen protease som kan spille en rolle i pankreatitt. Inhibitorer av disse proteasene vil således også være av farmasøytisk verdi.

Det er antatt at substratspesifiteten og sensitiviteten for de forskjellige inhibitorene av serinproteaser er et resultat av forandringer i bare noen få aminosyreresidua eller

grupper. Ved analogi er det mulig å forestille seg en klasse eller gruppe av serinproteaseinhibitorer hvor en forandring av relativt få aminosyrer vil resultere i en inhibering av forskjellige proteaser. Et enzym vil i denne gruppen eller klassen kunne hemme hver eneste serinprotease.

- 5 Et eksempel på en serinproteaseinhibitor er sekretorisk leukocytproteaseinhibitor (SLPI) og fragmenter og analoger av denne. Eksempler på serinproteaseinhibitorer innbefatter også, men er ikke begrenset til, antileukoprotease (ALO), slimhinneproteaseinhibitor (MPI), human seminal plasmainhibitor-I (HUSI-I),
 10 bronkieslimhinneinhibitor (BMI) og cervical slimhinneinhibitor (CUSH). En serinproteaseinhibitor kan også være en LPS-modulator. Se for eksempel Jin et al. (1997), Cell 88(3): 417-26. Disse molekylerne er godt egnet for bruk i tilstander som fører til bentap, ettersom de preferensielt er rettet inn mot brusken.

- Eksempler på serinproteaseinhibitorer er blant annet beskrevet i U.S. patent nr. 4,760,130; U.S. patent nr. 5,900,400; og U.S. patent nr. 5,633,227. De molekyler
 15 som er beskrevet i de forannevnte referanser så vel som eventuelle varianter eller analoger av disse, er kollektivt betegnet "serinproteaseinhibitorer".

- IL-18 er et proinflammatorisk cytokin som har vist seg å indusere interferon- γ og som tidligere ble betegnet interferon gammainduserende faktor (IGIF). I visse
 20 tilfeller har det vist seg at IL-1 oppregulerer IL-18-produksjon, og IL-18 induserer produksjon av en rekke proinflammatoriske cytokiner inklusive IL-6 og MMP-1. Se for eksempel Dinarello et al. (1998), J. Leukocyte Biol. 63: 658-64. I visse tilfeller er kaspase I også viktig for IL-18-produksjon. Eksperimenter antyder at TNF- α regulerer IL-18-produksjon og at en samtidig inhibering av TNF- α og IL-18 beskytter mot levertoksitet. Se for eksempel Faggioni et al. (2000), PNAS 97: 2367-
 25 72.

- IL-18 virker *in vivo* gjennom et reseptorsystem som minner om IL-1-systemet. IL-18 virker sammen med en celleoverflatereseptor (IL-18R) som virker sammen med et assessorisk protein (IL-18RAcP). IL-18 styrer signalet som fører opp til dannelsen
 30 av komplekset av IL-18, IL-18R og IL-18RAcP. En naturlig inhibitor for IL-18 er IL-18bp. IL-18bp vil virke som en "avledende reseptor" ved å binde seg til IL-18-molekyler og derved hindre interaksjonen med IL-18R.

- Heri beskrivesteraipier som omfatter et antistoff til OPGL og minst én IL-18-inhibitor foruten fremgangsmåter for behandling hvor man anvender slike terapier. En terapi vil omfatte et antistoff til OPGL og en IL-18-inhibitor og minst ett
 35 ytterligere molekyl som beskrevet her. Eksempler på tilstander som kan behandles innbefatter, men er ikke begrenset til, inflammasjon, autoimmune sykdommer, IL-1-medierte sykdommer og TNF-medierte sykdommer. Eksempler på tilstander som kan behandles med et antistoff til OPGL og minst én IL-18-inhibitor innbefatter, men er ikke begrenset til, artritt, inklusive, men ikke begrenset til, reumatisk artritt;

systemisk lupus erytematose (SLE); transplanterte organer versus vertssykdommer (GvHD); hepatitt, sepsis; og tap av ben og brusk som følger disse sykdommene.

Eksempler på IL-18-inhibitorer innbefatter, men er ikke begrenset til, antistoffer som binder seg til IL-18; antistoffer som binder seg til IL-18R; antistoffer som binder seg til IL-18RAcP; IL-18bp; IL-18R-fragmenter (for eksempel et løseliggjort ekstracellulært domene av IL-18-reseptoren); peptider som binder seg til IL-18 og reduserer eller hindrer dets interaksjon med IL-18R; peptider som binder seg til IL-18R og derved reduserer eller hindrer dets interaksjon med IL-18 eller med IL-18RAcP; peptider som binder seg til IL-18RAcP og reduserer eller hindrer dets interaksjon med IL-18R; foruten små molekyler som reduserer eller hindrer IL-18-produksjon eller interaksjonen med enhver av IL-18, IL-18R og IL-18RAcP.

Visse IL-18-inhibitorer er for eksempel beskrevet i US patent nr. 5,912,324 utstedt 14. juli 1994; EP 0 962 531 publisert 8. desember 1999; EP 712 931 publisert 15. november 1994; US patent nr. 5,914,253 utstedt 14. juli 1994; WO 97/24441 publisert 10. juli 1997; US patent nr. 6,060,283 utstedt 9. mai 2000; EP 850 952 publisert 26. desember 1996; EP 864 585 publisert 16. september 1998; WO 98/41232 publisert 24. september 1998; US patent nr. 6,054,487 utstedt 25. april 2000; WO 99/09063 publisert 14. august 1997; WO 99/22760 publisert 3. november 1997; WO 99/37772 publisert 23. januar 1998; WO 99/37773 publisert 20. mars 1998; EP 0 974 600 publisert 26. januar 2000; WO 00/12555 publisert 9. mars 2000; japansk patentsøknad JP 111,399/94 publisert 31. oktober 1997; israelsk patentsøknad IL 121554 A0 publisert 8. februar 1998.

Et antistoff til OPGL kan brukes sammen med minst ett terapeutisk middel for inflammasjon. Et antistoff kan til OPGL brukes sammen med minst ett terapeutisk middel for behandling av en immunlidelse. Eksempler på terapeutiske midler for inflammasjon og immunlidelser og sykdommer innbefatter, men er ikke begrenset til, kortikosteroider inklusive, men ikke begrenset til, prednisolon; ikke-steroidale antiinflammatoriske medikamenter (NSAID) som inkluderer, men ikke er begrenset til, syklooksygenase type 1 (COX-1) og syklooksygenase type 2 (COX-2) inhibitorer; sykdomsmodifiserende antirevmatiske medikamenter (DMARD) som inkluderer, men ikke er begrenset til, metotreksat, hydroksyklorkin, klorkin, syklosporin, gullforbindelser (så som auranofin, aurotiomalat og aurotioglukose) og leflunomid; type IV fosfodiesteraseinhibitorer inklusive, men ikke begrenset til, rolipram og pentoksifyllin; takrolimus (FK-506); sirolimus (rapamycin); mykofenolinsyre; 5-lipoksygenaseinhibitorer inklusive, men ikke begrenset til, zileuton; modulatorer av interleukin-6 (IL-6); små molekyllmodulatorer av 38 kDa mitogenaktivert proteinkinase (p38-MAPK); små molekyllmodulatorer av intracellulære molekyler som inngår i inflammasjonsreaksjonsveier hvor slike intracellulære molekyler innbefatter, men ikke er begrenset til, jnk, IKK, NF- κ B, ZAP70 og I κ B. Visse eksempler på terapeutiske midler for behandling av inflammasjon er blant annet beskrevet i C.A. Dinarello og L.L. Moldawer

- Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in Rheumatoid Arthritis: A Primer for Clinicians 3. utgave (2001) Amgen Inc. Thousand Oaks, CA. Visse eksempler på terapeutiske midler for inflammasjon og autoimmune sykdommer innbefatter, men er ikke begrenset til, interferon gamma (IFN- γ)-modulatorer;
- 5 modulatorer av OX40/OX40L (inklusive løselige former av OX40); modulatorer av 4-1BB/4-1BB-ligand (inklusive løselige former av 4-1BB); og modulatorer av B-celle-T-celle samstimulerende reaksjonsveier som innbefatter, men ikke er begrenset til, modulatorer av reseptorligandparene CD28/B7, CD40/CD40L, ICOS/B7RP1 og AGP-3/TACI/BAFFR (AGP-3 binder seg både til TACI- og
- 10 BAFFR-reseptorene). Visse eksempler på modulatorer av B-celle-T-celle samstimulerende reaksjonsveier innbefatter, men er ikke begrenset til, inhibitorer av CD28, B7.1 og B7.2 (inklusive løselige former av B7.1 eller B7.2 og løselige former av CTLA4 som begge kan være fusjonert til et heterologt peptid eller protein som reduserer eller hindrer nedbrytningen og/eller en økning av halvlivet, reduserer
- 15 toksisitet, reduserer immunogenisitet eller øker den biologiske aktiviteten til et terapeutisk protein ved å øke løseligheten eller det sirkulerende halvlivet); inhibitorer av CD40 og CD40L (inklusive løselige former av CD40 som kan være fusjonert til et heterologt peptid eller protein); inhibitorer av ICOS og B7RP1 (inklusive løselige former av ICOS som kan være fusjonert til et heterologt peptid
- 20 eller protein) og inhibitorer av AGP-3, TACI og BAFFR (inklusive løselige former av TACI og BAFFR). ICOS, B7RP1 og inhibitorer av disse er blant annet beskrevet i WO00/46240. AGP-3, TACI og BAFFR og inhibitorer av disse er blant annet beskrevet i WO00/47740, WO01/85872, WO02/15273, WO98/39361 og von Bulow og Bram (1997) Science 278: 138-140.
- 25 Heri beskrives et antistoff til OPGL brukt for å behandle bentap som innbefatter, men som ikke er begrenset til, bentap som er et resultat av en osteolytisk destruksjon av benet forårsaket av ondartede eller metastatiske tumorer. Et antistoff til OPGL kan brukes for å behandle bentap som er assosiert med cancer. Eksempler på cancere innbefatter, men er ikke begrenset til, cancer i bryst, prostata,
- 30 skjoldbruskkjertelen, nyrer, lunger, svelge, endetarmen, urinblæren, livmoren, eggstokker og lever, så vel som cancer i tarmkanalen. Et antistoff til OPGL kan brukes for å behandle bentap som er assosiert for eksempel med visse hematologiske ondartede lidelser som innbefatter, men ikke er begrenset til, multippelt myelom og lymfom inklusive Hodgkins sykdom.
- 35 Et antistoff av OPGL blir administrert alene. Et antistoff til OPGL blir administrert sammen med minst ett annet terapeutisk middel inklusive, men ikke begrenset til, minst ett annet cancerterapimiddel. Eksempler på cancerterapimidler innbefatter, men er ikke begrenset til, strålingsterapi og kjemoterapi. En kjemoterapi vil innbefatte en behandling med en eller flere av de følgende: Antrasykliner, taksol,
- 40 tamoksifen, doksorubicin, 5-fluoruracil og andre medikamenter som er kjente innenfor cancerbehandlingen. Et cancerterapimiddel vil være en luteiniserende

hormonfrigjørende hormon (LHRH) antagonist. En LHRH-antagonist er en peptidantagonist.

En LHRH-antagonist vil omfatte peptidet: Ac-D-Nal-4-Cl-Phe-D-Pal-Ser-N-Me-Tyr-D-Asn-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala-NH₂ (SEKV.ID. NR. 20) hvor Nal er 3-(2-naftyl)alaninyl; 4-Cl-Phe er (4'-klorfenyl)alaninyl; Pal er 3-(3'-pyridyl)alaninyl; og Lys(iPr) er N-epsilon-2-propyllysinyll.

En LHRH-antagonist er et LHRH-antagonist dekaeptid. Visse eksempler på dekaeptider er blant annet beskrevet i U.S. patent nr. 5,843,901.

Eksempler på terapeutiske antistoffer innbefatter, men er ikke begrenset til, muse, musehumane kimæriske, CDR-podede, humaniserte og hele humane antistoffer og syntetiske antistoffer som innbefatter, men ikke er begrenset til, de som er valgt ut ved å screene antistoffbiblioteker. Eksempler på antistoffer innbefatter, men er ikke begrenset til, de som binder seg til celleoverflateproteinene Her2, CDC20, CDC33, mucinlignende glykoprotein og den epidermale vekstfaktorreseptoren (EGFR) som er tilstede på tumorceller og som eventuelt induserer en cytostatisk og/eller cytotoxisk effekt på tumorceller som fremviser disse proteinene. Eksempler på antistoffer innbefatter også HERCEPTINTM (trastuzumab) som kan brukes for å behandle brystkreft eller andre former av cancer og RITUXANTM (rituksimab), ZEVALINTM (ibritumomab tiuksetan) og LYMPHOCIDETM (epratuzumab) som brukes for å behandle ikke-Hodgkins lymfom og andre former for cancer. Visse eksempler på antistoffer innbefatter også ERBITUXTM (IMC-C225), BEXXARTM (jod 131 tositumomab) og Campath.

Cancerterapimidlene er polypeptider som selektivt induserer apoptose i tumorceller og som inkluderer, men som ikke er begrenset til, det TNF-relaterte polypeptidet TRAIL. Et antistoff til OPGL vil kunne administreres minst en gang før, sammen med eller etter en behandling med et cancerterapimiddel. Et antistoff til OPGL vil kunne administreres profylaktisk for å hindre eller å svekke utviklingen av bentap som skyldes metastatisk cancer. Et antistoff til OPGL vil kunne administreres for å behandle en eksisterende tilstand av bentap som skyldes metastase.

Et antistoff til OPGL vil kunne brukes for å hindre og/eller å behandle bentap som er assosiert med multippelt myelom og/eller for å hindre og/eller behandle sykdommen som sådan. Multippelt myelom er en B-celleavledet tumor som kan resultere i signifikant morbiditet og/eller mortalitet. I visse tilfeller vil en klinisk manifestasjon av multippelt myelom være fokalt bentap som kan skyldes en økt osteoklastaktivisering i lokaliserte områder. Mange myelompasienter har bensår som er synlige ved hjelp av radiologisk analyse og lider dessuten av skjelettsmerter. I visse tilfeller vil pasienter med myelom være utsatt for patologiske brudd i de angrepne knokler eller ben, noe som enten kan opptre spontant eller skyldes annen skade. I visse tilfeller vil de skjelettsår som opptre under myelom ikke bare føre til benbrudd, men også til deformiteter og eventuelt nervekompresjon, spesielt i

ryggraden. Hos enkelte pasienter vil man kunne observere en patologisk økning av serumkalsium (hyperkalsemi) og dette kan forårsake signifikante og alvorlige problemer under sykdomsbehandlingen. Et antistoff til OPGL vil kunne administreres pasienter for å redusere eller blokkere benresorpsjon og frigjøring av kalsium, noe som vil redusere risikoen for brudd og ryggradsdeformitet.

I visse tilfeller vil myelomcellene ikke direkte delta i bendestruksjonen, men i stedet gi ekstracellulære signaler som fører til osteoklastdifferensiering og aktivering. I visse tilfeller vil osteoklastene gi høye nivåer av cytokin IL-6, spesielt når de blir aktivert. IL-6 er en B-celle vekstfaktor som bidrar til veksten av ben både hos muse og humane myelomceller *in vitro*. Myelomceller kan også enten direkte eller indirekte produsere OPGL, noe som kan resultere i en lokal benoppløsning som omgir de myelomcellene som er innleiret i hulrom i benmargen. I visse tilfeller vil de normale osteoklastene som ligger inntil myelomcellene så igjen produsere IL-6 som så igjen kan føre til en lokal ekspansjon av tumorcellene. Myelomcellene vil således utvikle seg på en klonaktig måte og kan fylle de benhulrommene som skapes ved en for sterk benresorpsjon.

Det er blitt observert at OPG-administrering i gnagere induserer en rask død av osteoklastpopulasjonen (se for eksempel Lacey et al. (2000) Am. J. Pathol. 157: 435-448). En reduksjon av antallet osteoklaster kan motvirke effekten av den forøkte IL-6-produksjonen av disse cellene, og vil derved kunne påvirke veksten og overlevelse av myelomceller innenfor trabekulært ben. Således vil en administrering av et antistoff til OPGL til en myelompasient ikke bare blokkere hyperresorpsjonen av ben, men kan også påvirke ekspansjonen og overlevelsen til selve tumoren.

B-celler uttrykker reseptoren for OPGL, ODAR. Myelomceller uttrykker også ODAR og kan i tillegg produsere OPGL. I visse tilfeller vil ekspresjonen av både OPGL og ODAR i den samme cellepopulasjonen skape en autokrin stimulans som påvirker overlevelsen til myelomcellene. Således vil en administrering av et antistoff til OPGL kunne redusere tumorcelleoverlevelsen og derved nedsette eller eliminere den tumorbelastning som ofte ses hos myelompasienter.

Heri beskrives farmasøytiske sammensetninger som omfatter en terapeutisk effektiv mengde av et antistoff til OPGL sammen med et farmasøytisk akseptabelt fortynningsmiddel, bærerstoff, løselighetsgjørende stoff, emulgeringsmiddel, konserveringsmiddel og/eller adjuvant.

Heri beskrives farmasøytiske sammensetninger som omfatter en terapeutisk effektiv mengde av et antistoff til OPGL og en terapeutisk effektiv mengde av minst ett ytterligere terapeutisk middel sammen med et farmasøytisk akseptabelt fortynningsmiddel, bærerstoff, løselighetsgjørende stoff, emulgeringsmiddel, konserveringsmiddel og/eller adjuvant. Minst ett ytterligere terapeutisk middel er valgt fra benmorfogene faktorer som er betegnet BMP-1 til og med BMP-12;

- transformerende vekstfaktor- β (TGF- β) og TGF- β -gruppestoffer eller forbindelser; interleukin-1 (IL-1) inhibitorer som innbefatter, men ikke er begrenset til, IL-1ra og derivater av denne og KineretTM; TNF α -inhibitorer som inkluderer, men ikke er begrenset til, en løselig TNF α -reseptor, EnbrelTM, anti-TNF α -antistoffer, 5 RemicadeTM og D2E7-antistoff; paratyroid hormon og analoger av dette, paratyroidrelatert protein og analoger av dette; E-serier av prostaglandiner; bisfosfonater (så som alendronat og andre); benforbedrende mineraler så som fluorid og kalsium; ikke-steroidale antiinflammatoriske medikamenter (NSAID) inklusive COX-2-inhibitorer så som CelebrexTM og VioxxTM; 10 immunundertrykkende midler så som metotreksat og leflunomid; serinprotaseinhibitorer så som sekretorisk leukocytteproteaseinhibitor (SLPI); IL-6-inhibitorer (for eksempel antistoffer til IL-6), IL-8-inhibitorer (for eksempel antistoffer til IL-8); IL-18-inhibitorer (for eksempel IL-18-bindende protein eller IL-18-antistoffer); interleukin-1-omdannende enzym (ICE) modulatorer; 15 fibroblastvekstfaktorer FGF-1 til og med FGF-10 og FGF-modulatorer; PAF-antagonister; kartinocyttevekstfaktor (KGF), KGF-relaterte molekyler eller KGF-modulatorer; matrise metalloproteinase (MMP) modulatorer; nitrittoksidsyntase (NOS) modulatorer, heri inngår modulatorer av induserbart NOS; modulatorer av glukokortikoidreseptor; modulatorer av glutamatreseptor; modulatorer av 20 lipopolysakkarid (LPS) nivåer; og noradrenalin og modulatorer og mimetika av dette.

Akseptable preparatmaterialer vil fortrinnsvis være ikke-toksiske for mottakeren ved de doser og konsentrasjoner som blir anvendt.

Den farmasøytiske sammensetningen vil kunne inneholde stoffer eller materialer for å modifisere, opprettholde eller bevare for eksempel pH, osmolaritet, viskositet, klarhet, farge, isotonisitet, lukt, sterilitet, stabilitet, oppløsningshastighet eller frigjøringshastighet, absorpsjon eller inntrengning av sammensetningen. Egnede sammensetningsmaterialer eller stoffer vil innbefatte, men ikke være begrenset til, aminosyrer (så som glysin, glutamin, asparagin, arginin eller lysin); antimikrobielle stoffer; antioksidanter (så som askorbinsyre, natriumsulfitt eller natriumhydrogensulfitt); buffere (så som borat, bikarbonat, Tris-HCl, citrater, fosfater eller andre organiske syrer); volumgivende midler (så som mannitol eller glysin); gelateringsmidler (så som etylendiamintetraeddiksyre (EDTA)); kompleksdannende midler (så som kaffein, polyvinylpyrrolidon, beta-syklodekstrin eller hydroksypropyl-beta-syklodekstrin); fyllstoffer; monosakkarider; disakkarider; og andre karbohydrater (så som glukose, mannose eller dekstriner); proteiner (så som serum albumin, gelatin eller immunoglobuliner); fargestoffer; smaksstoffer og fortynningsmidler; emulgeringsmidler; hydrofile polymerer (så som polyvinylpyrrolidon); polypeptider med lav molekylvekt; saltdannende motioner (så som natrium); konserveringsmidler (så som benzalkoniumklorid, benzosyre, salisylsyre, timerosal, fenetylalkohol, metylparaben, propylparaben, klorheksidin, sorbinsyre eller hydrogenperoksid); løsemidler (så som glyserin, propylenglykol eller polyetylenglykol); sukkeralkoholer (så som mannitol eller sorbitol); suspenderingsmidler; overflateaktive midler eller fuktemidler (så som pluronics, PEG, sorbitanestere, polysorbater så som polysorbat 20, polysorbat 80, triton, trometamin, lecitin, kolesterol, tyloksapal); stabilitetsforbedrende midler (så som sukrose eller sorbitol); tonisitetsforbedrende midler (så som alkalimetallhalogenider, fortrinnsvis natrium- eller kaliumklorid, mannitol, sorbitol); tilførende væsker; faste eller flytende fortynningsmidler; eksipienter og/eller farmasøytiske adjuvanter. (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18. utgave, A.R. Gennaro, red., Mack Publishing Company (1999)).

Et antistoff til OPGL og/eller et terapeutisk molekyl er forbundet til en halvlivforlengende bærervæske av velkjent type. Slike bærervæsker innbefatter, men er ikke begrenset til, Fc-domener, polyetylenglykol og dekstran. Slike bærervæsker er for eksempel beskrevet i U.S. søknad serienr. 09/428,082 og publisert PCT-søknad nr. WO 99/25044.

Den optimale farmasøytiske sammensetningen vil kunne bestemmes av en dyktig fagperson avhengig av for eksempel den påtenkte administreringsveien, tilførselsformatet og den forønskede dosen. Se for eksempel *Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*. Slike sammensetninger vil kunne påvirke den fysiske tilstanden, stabiliteten, hastigheten med hensyn til *in vivo* frigjøring og hastigheten med hensyn til *in vivo* eliminering av antistoffene som beskrevet heri.

Den primære bærervæsken eller bærerstoffet i en farmasøytisk sammensetning vil enten være vandig eller ikke-vandig av natur. For eksempel vil en egnet bærervæske eller bærerstoff være vann for injeksjon, en fysiologisk saltløsning eller en kunstig ryggradsvæske, eventuelt supplert med andre stoffer eller materialer som er velkjente i sammensetninger for parenteral administrering. En nøytral bufret saltløsning eller saltløsning vil blandet med serum albumin være eksempler på slike bærervæsker. De farmasøytiske sammensetningene vil omfatte en Tris-buffer ved pH 7,0-8,5, eller acetatbuffer ved pH 4,0-5,5, som videre kan innbefatte sorbitol eller en egnet erstatning for denne. En sammensetning som vil omfatte et antistoff til OPGL med eller uten minst ett ytterligere terapeutisk middel vil fremstilles for lagring ved å blande den valgte sammensetningen med den forønskede grad av renhet sammen med eventuelle andre tilsetningsstoffer og midler (*Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*) i form av en frysetørket kake eller en vandig oppløsning. En sammensetning som omfatter et antistoff til OPGL, med eller uten minst ett ytterligere terapeutisk middel, kan videre opparbeides som et frysetørket preparat ved å bruke passende fortynningsmidler så som sukrose.

Farmasøytiske sammensetninger kan opparbeides for parenteral administrering. Sammensetningene kan opparbeides for inhalering eller administrering gjennom fordøyelseskanalen, for eksempel oralt. Fremstillingen av slike farmasøytisk akseptable sammensetninger er velkjente innenfor den farmasøytiske industrien.

Komponentene i preparatene vil være tilstede i konsentrasjoner som er akseptable for administreringsstedet. Man kan anvende buffere for å holde sammensetningen på en fysiologisk pH eller ved en noe lavere pH, typisk i et pH-område fra ca 5 til ca 8.

I forbindelse med parenteral administrering, kan en terapeutisk sammensetning være i form av en pyrogenfri, parenteralt akseptabel vandig løsning som omfatter det forønskede antistoffet til OPGL, med eller uten ytterligere terapeutiske midler i en farmasøytisk akseptabel bærervæske. En bærervæske vil for en parenteral injeksjon være sterilt destillert vann hvor antistoffet til OPGL, med eller uten minst ett ytterligere terapeutisk middel, er opparbeidet som en steril isoton løsning og passende konserveret. Fremstillingen vil innbefatte en opparbeiding av det forønskede molekylet med et middel så som injiserbare mikrokuler, bionedbrytbare partikler, polymere forbindelser (så som polyeddiksyre eller polyglykolsyre), perler eller liposomer som kan gi en kontrollert eller vedvarende frigjøring av produktet som så kan tilføres eller administreres via en depotinjeksjon. Man kan også bruke hyaluronsyre som effektivt fremmer en vedvarende varighet av preparatet i sirkulasjonen. Det er også mulig å anvende implanterbare medikamenttilføringsanordninger for å tilføre det forønskede molekylet.

En farmasøytisk sammensetning kan opparbeides for inhalering. Et antistoff til OPGL med eller uten minst ett ytterligere terapeutisk middel vil opparbeides som et

tørt pulver for inhalering. En inhaleringsløsning vil omfatte et antistoff til OPGL, med eller uten minst ett ytterligere terapeutisk middel, være opparbeidet sammen med et drivstoff for aerosol bruk. Løsningene kan forstøves. Lungeadministrering er videre beskrevet i PCT-søknad nr. PCT/US94/001875 som beskriver lungetilførsel av kjemisk modifiserte proteiner.

Preparater kan administreres oralt. Således vil et antistoff til OPGL, med eller uten minst ett ytterligere terapeutisk middel, bli administrert på denne måten og kan da opparbeides med eller uten de bærerstoffene som vanligvis brukes for opparbeiding av faste doseringsformer så som tabletter og kapsler. En kapsel kan være utformet slik at den frigjør den aktive delen av preparatet på det punktet i fordøyelseskanalen hvor biotilgjengeligheten er maksimal og den presystemiske degraderingen er minimal. Minst ett ytterligere middel kan inkluderes for å lette absorpsjon av antistoffet til OPGL og/eller eventuelle andre terapeutiske midler. Det er også mulig å anvende fortynningsmidler, smaksstoffer, vokstyper med lavt smeltepunkt, vegetabiliske oljer, smøremidler, suspenderingsmidler, tablettnedbrytningsmidler og bindemidler.

En farmasøytisk sammensetning kan innbefatte en effektiv mengde av antistoffer til OPGL, med eller uten minst ett ytterligere terapeutisk middel, i en blanding med ikke-toksiske fortynningsmidler som er egnet for fremstillingen av tabletter. Man kan ved å løse tablettene i steril vann eller annen passende bærer væske fremstille løsninger i enhetsdoseform. Egnede fortynningsmidler vil innbefatte, men ikke være begrenset til, inerte fortynningsmidler slik som kalsiumkarbonat, natriumkarbonat eller bikarbonat, laktose eller kalsiumfosfat; eller bindemidler så som stivelse, gelatin eller akasia; eller smøremidler så som magnesiumstearat, stearinsyre og talkum.

Ytterligere farmasøytiske sammensetninger vil være innlysende for fagfolk innenfor den farmasøytiske industrien, og slike innbefatter preparater som inneholder antistoffer til OPGL, med eller uten minst ett ytterligere terapeutisk middel, så som preparater for vedvarende eller kontrollert frigjøring av de aktive bestanddelene.

Teknikker er for å opparbeide en rekke forskjellige andre anordninger for vedvarende eller kontrollert tilførsel av aktive bestanddeler så som liposombærerstoffene, bionedbrytbare mikropartikler eller porøse perler eller depotinjeksjoner, velkjente innenfor den farmasøytiske industrien. Se for eksempel PCT-søknad nr. PCT/US93/00829 som beskriver den kontrollerte frigjøringen av porøse polymere mikropartikler for tilførsel av farmasøytiske sammensetninger. Preparatene for vedvarende frigjøring vil innbefatte semipermeable polymermatriser i form av formede artikler, for eksempel filmer eller mikrokapsler. Matriser for vedvarende frigjøring kan innbefatte polyestere, hydrogeler, polyaktider (U.S. 3,773,919 og EP 058,481), sampolymerer av L-glutaminsyre og gamma etyl-L-glutama (Sidman *et al.*, *Biopolymers*, 22: 547-556 (1983)), poly (2-hydroksyetylmetakrylat) (Langer *et al.*, *J. Biomed Mater. Res.*, 15: 167-227 (1981))

og Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982)), etylenvinylacetat (Langer *et al.*, *supra*) eller poly-D(-)-3-hydroksysmørsyre (EP 133,988). Preparatene eller sammensetningene for vedvarende frigjøring vil også innbefatte liposomer som kan fremstilles ved flere kjente fremgangsmåter. Se for eksempel Eppstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688-3692 (1985); EP 036,676; EP 088,046 og EP 143,949.

Den farmasøytiske sammensetningen som skal brukes for *in vivo* administrering vil typisk være steril. Dette kan oppnås ved filtrering gjennom sterile filtreringsmembraner. Når sammensetningen er fremstilt ved frysetørring, så kan sterilisering ved å bruke denne fremgangsmåten utføres enten før eller etter frysetørringen og en eventuell rekonstituering. Sammensetningen vil for parenteral administrering kunne lagres i frysetørket form eller i en løsning. De parenterale sammensetningene vil generelt bli plassert i en beholder som har en steril inngangsåpning, for eksempel en intravenøs oppløsningspose eller ampulle med en forsegling som lar seg gjennomstikke av en hypodermisk injeksjonsnål.

Den farmasøytiske sammensetningen vil, så snart den er opparbeidet, kunne lagres i sterile ampuller som en løsning, suspensjon, gel, emulsjon, som fast stoff eller som et dehydrert eller frysetørket pulver. Slike preparater vil kunne lagres enten i en form som er klar for bruk, eller i en form (for eksempel frysetørket) som må rekonstitueres før administrering.

Heri beskrives sett for å fremstille en enkeltdose administreringsenhet. Settene vil hvert kunne inneholde en første beholder som inneholder et tørket protein og en andre beholder som inneholder et vandig preparat. Disse settene vil inneholde enkle eller flerkamrede på forhånd fylte sprøyter (for eksempel væskesprøyter og såkalte lyosprøyter).

Den effektive mengden av en farmasøytisk sammensetning som omfatter et antistoff til OPGL vil, med eller uten minst ett ytterligere terapeutisk middel, som anvendes terapeutisk vil for eksempel være avhengig av den terapeutiske sammenhengen og hensiktene. En medisinsk innsiktsfull person vil lett kunne fastslå passende dosenivåer for behandling vil således disse nivåene være avhengige, delvis av det molekyl som skal levers, den indikasjon for hvilken antistoffet til OPGL med eller uten minst ett ytterligere terapeutisk middel skal brukes, administrasjonsveien og størrelsen (kroppsvekt, kroppsoverflate eller organstørrelse) og/eller tilstand (alder og generell helse) til pasienten. Legen vil lett kunne justere dosen og modifisere administrasjonsmåten for derved å oppnå den optimale terapeutiske effekten.

Typiske doser vil variere fra ca 0,1 µg/kg til omtrent 100 mg/kg eller mer, avhengig av de faktorer som er nevnt ovenfor. Dosen vil variere fra 0,1 µg/kg og opp til 100 mg/kg; eller 1 µg/kg og opp til 100 mg/kg; eller 5 µg/kg og opp til 100 mg/kg.

Doseringsfrekvensen vil måtte ta hensyn til de farmakokinetiske parametrene for antistoffet til OPGL og/eller eventuelle andre terapeutiske midler som anvendes. En

klinisk lege vil administrere sammensetningen inntil man når et dosenivå som gir den forønskede effekten. Derfor kan sammensetningen administreres som en enkelt dose eller som to eller flere doser (som kan eller ikke kan inneholde den samme mengden av det forønskede molekylet) over tid, enten som en kontinuerlig infusjon via en implantert anordning eller et kateter. Ytterligere finjustering av passende doser ligger rutinemessig innenfor det som legen til enhver tid kan bestemme. Passende doser vil kunne oppnås ved å bruke passende doseresponsdata.

Administrasjonsveien vil av den farmasøytiske sammensetningen være i overensstemmelse med kjente fremgangsmåter, for eksempel oralt, gjennom injeksjon ved intravenøse-, intraperitoneale-, intracerebrale- (intraparenchymale), intracerebroventrikulære-, intramuskulære-, intraokulære-, intraarterielle-, intraportale- eller intralesjonale veier; ved systemer for vedvarende frigjøring eller ved hjelp av implanterte anordninger. Sammensetningene vil kunne administreres ved en bolusinjeksjon eller kontinuerlig ved infusjon eller ved hjelp av implantert anordning.

Sammensetningen vil kunne administreres lokalt via en implantering av en membran, svamp eller et annet passende materiale, i hvilket det forønskede molekylet er blitt absorbert eller innkapslet. Når det anvendes en implantert anordning, så kan denne implanteres i ethvert egnet vev eller organ og tilførselen av det forønskede molekylet kan skje via diffusjon, tidsfrigjort bolus eller en kontinuerlig administrering.

Det kan være ønskelig å bruke en farmasøytisk sammensetning som omfatter et antistoff til OPGL, med eller uten minst ett ytterligere terapeutisk middel, på en *ex vivo* måte. Celler, vev og/eller organer som er fjernet fra pasienten vil bli eksponert for en farmasøytisk sammensetning som omfatter et antistoff til OPGL, med eller uten minst ett ytterligere terapeutisk middel, hvorefter cellene, vevet og/eller organet deretter implanteres tilbake i pasienten.

Et antistoff til OPGL og/eller eventuelle andre terapeutiske midler kan tilføres ved å implantere visse celler som er genetisk manipulert eller behandlet ved å bruke fremgangsmåter av den type som er beskrevet her for deretter å kunne uttrykke og utskille polypeptidene. Slike celler kan være animalske eller humane celler, og kan være autologe, heterologe eller xenogene. Cellene kan være såkalt immortaliserte. For å øke sjansen for en immunologisk respons eller reaksjon, kan cellene være innkapslet for å unngå infiltrering i det omkringliggende vevet.

Innkapslingsmaterialene vil være typisk bioforenlige semipermeable polymere materialer eller membraner som muliggjør frigjøringen av proteinproduktene, men hindrer destruksjonen av cellene på grunn av pasientens immunsystem eller andre skadelige faktorer fra det omkringliggende vev

EKSEMPLER

De følgende eksemplene som innbefatter eksperimenter som ble utført og de oppnådde resultatene, er utelukkende tilveiebrakt for illustrerende formål og kan som sådan ikke anses å være begrensende for den foreliggende oppfinnelsen.

Eksempel 1

5 Kloning av de α OPGL-1 tunge og lette kjedene

CHO-celler som uttrykker det fullengde humane OPGL cDNA ble brukt for å immunisere transgene mus som inneholdt humane immunoglobulingener. Lymfekjertler fra de immuniserte musene ble fusjonert til musemyelomceller for å utvikle hybridomer. Supernatantene fra hybridomlinjene ble testet i en ELISA-prøve for antistoffer som reagerer med humant OPGL. Anti-OPGL-uttrykkende hybridomlinjer AMG 6.5, AMG 6.4 og AMG 6.1 viste seg å uttrykke antistoffer med høy affinitet for OPGL (Kd på henholdsvis 0,28 nM, 0,29 nM og 0,23 nM), og AMG 6.5 ble valgt ut for kloning. Tung- og lettkjedede cDNA-kloner fra AMG 6.5 og AMG 6.4 er identiske, og AMG 6.5 ble brukt for å klone det α OPGL-1 lettkjedede cDNA, mens AMG 6.4 ble brukt for å klone det α OPGL-1 tungkjedede cDNA.

Kloning av den α OPGL-1 lette kjeden

Det α OPGL-1 kappa lettkjedede variable området ble oppnådd ved å bruke PCR amplifiseringsmetoder fra første tråds cDNA fremstilt fra AMG 6.5 totalt RNA. Første tråds cDNA ble fremstilt fra AMG 6.5 totalt RNA ved å bruke en vilkårlig primer med en forlenget 5'-adapter (5'-GGCCGGATAGGCCTCACNNNNNT-3' (SEKV.ID. NR. 15)) og de materialer og fremgangsmåter som var tilveiebrakt av Gibco SuperScript IITM Preamplification System for første tråds cDNA syntesesett (katalog nr. 18089-011). De nedenfor angitte oligonukleotidene ble brukt for PCR-reaksjonen:

10 5' kappa RACE-primer:

5'-GAT GAC CCA TGC TCC AGC CAC CCT G-3' (SEKV.ID. NR. 5)

3' kappa RACE-primer:

5'-AAG GGT CAG AGG CCA AAG GAT GG-3' (SEKV.ID. NR. 6)

15 De amplifiserte DNA ble klonet inn i pCRII-TOPO (Invitrogen) og de resulterende plasmidene ble så sekvensert. Kappakjede konsensussekvensen ble brukt for å utforme primere for PCR-amplifisering av fullengde α OPGL-1 kappakjeden. 5' α OPGL-1 kappaprimeren inkorporerer et *Xba*I-sete (TCTAGA) for kloning, og en "CCACC" Kozaksekvens foran initiator Met-kodonet. 3' α OPGL-1 kappaprimeren inkorporerer et *Sal*I-sete (GTCGAC) etter stoppkodonet for kloning.

20 5' α OPGL-1 kappaprimer:

5'-CAA CTC TAG A CC ACC ATG GAA ACC CCA GCG-3' (SEKV.ID. NR. 7)

*Xba*I-sete Kozak M E T P A (SEKV.ID. NR. 16)

3' α OPGL-1 kappaprimer:

25 5'-TTT GAC GTC GAC TTA TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA G-3' (SEKV.ID. NR. 8)

*Sal*I-sete * * C E G R N F (SEKV.ID. NR. 17)

Fullengde α OPGL-1 kappakjede cDNA-klonen ble oppnådd ved å bruke AMG 6.5 første tråds cDNA slik dette er beskrevet ovenfor ved en PCR-amplifisering med nevnte 5' og 3' α OPGL-1 kappaprimerer. PCR-reaksjonen utvikler et 738 bp fragment som koder 235 aminosyreresidua (inklusive den 20 aminosyrer kappakjede signalsekvensen) i α OPGL-1 kappakjeden (figur 4, SEKV.ID. NR. 4). Etter rensing ved å bruke et QIAquick PCR-rensesett (Qiagen katalognr. 28104), ble dette fragmentet brukt for å konstruere den kappa lettkjedede ekspresjonsvektoren.

35 Det 738 bp fullengde kappafragmentet utviklet som beskrevet ovenfor ble kuttet med *Xba*I og *Sal*I, ble så rensset ved å bruke Promega Wizard DNA rensesystem (Promega katalognr. A7100) og ble så klonet inn i pDSR α 19 for å utvikle plasmid

α OPGL-1-kappa/pDSR α 19 (figur 5). pDSR α 19 er tidligere beskrevet (se WO 90/14363 (se for eksempel figur 12)). Kort beskrevet, for å fremstille pDSR α 19, ble pDSR α 2 modifisert på følgende måter: FSH polyA ble forkortet med ca 1400 basepar til ca 885 basepar, hvorefter man fjernet now-endene ved NdeI-setet; dihydrofolatreduktase (DHFR) promotoren som nå inneholder 209 basepar etter å ha blitt forkortet fra 5'-enden med ca 1 kilobase; og et omtrentlig 550 basepar BgIII-fragment fra DHFR polyA-sekvensen.

Den α OPGL-1 kappa lettkjedede ekspresjonsklonen ble sekvensert for å bekrefte at den kodet det samme peptidet som var identifisert i AMG 6.5-hybridomet. Den endelige ekspresjonsvektoren, α OPGL-1-kappa/pDSR α 19, inneholder 5476 basepar og inneholder 7 funksjonelle områder som vist i tabell 2.

Tabell 2: Karakteristiske trekk for α OPGL-1-kappa/pDSR α 19

*Plasmidbase-
parnummer:*

2 til 881	Et transkripsjonsterminerings/polyadenyleringssignal fra α -underenheten av det storfehypofyse glykoproteinhormonet (α -FSH) (Goodwin, et al, <i>Nucleic Acids Res.</i> 1983 11 : 6873-82; Genbank tilvekstnummer X00004)
882 til 2027	Et muse dihydrofolatreduktase (DHFR) minigen som inneholder den endogene muse DHFR-promotoren, de cDNA-kodende sekvensene og DHFR-transkripsjonsterminerings/polyadenyleringssignalene (Gasser et al, <i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i> 1982 79 : 6522-6; Nunberg et al, <i>Cell</i> 1980 19 : 355-64; Setzer et al, <i>J Biol Chem.</i> 1982 257 : 5143-7; McGrogan et al, <i>J Biol Chem.</i> 1985 260 : 2307-14)
2031 til 3947	pBR322-sekvenser som inneholder ampicillinresistensmarkørgenet og replikasjonsorigo for plasmidet i E. coli (Genbank tilvekstnummer J01749)
3949 til 4292	En SV40 tidlig promotor, forsterker og replikasjonsorigo (Takebe et al, <i>Mol Cell Biol.</i> 1988 8 : 466-72., Genbank tilvekstnummer J02400)

- 4299 til 4565 Et translokerende forsterkende element fra HTLV-1 LTR-domenet (Seiki et al, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 **80**: 3618-22, Genbank tilvekstnummer J02029)
- 4574 til 4730 Et intron fra SV40 16 S, 19S spleise donor/akseptorsignalene (Okayama og Berg, *Mol Cell Biol.* 1983 **3**: 280-9, Genbank tilvekstnummer J02400)
- 4750 til 5476 Det α OPGL-1 kappa lettkjedede cDNA mellom *XbaI*- og *SalI*-setene.

Et sirkulært plasmidkart av vektoren er vist på figur 5.

Kloning av den α OPGL-1 tunge kjeden

- 5 Den α OPGL-1 IgG2 tunge kjeden ble klonet fra AMG 6.4 hybridom dobbeltrådet cDNA fremstilt med Clontech MarathonTM cDNA amplifiseringssettet (katalognr. K1802-1). Amplifisering av AMG 6.4 tungkjedet cDNA ble utført med 5' og 3' rask amplifisering av cDNA-ender (RACE) teknikk utført med de humane germlinje IgG2 tungkjedede konstante områdespesifikke primerne (vist nedenfor) og RACE-primere og andre materialer og fremgangsmåter tilveiebrakt i nevnte MarathonTM cDNA amplifiseringssett.

5' IgG2 RACE-primer

5'-GGC ACG GTC ACC ACG CTG CTG AG-3' (SEKV.ID. NR. 9)

3' IgG2 RACE-primer

- 15 5'-CCT CCA CCA AGG GCC CAT CGG TCT-3' (SEKV.ID. NR. 10)

- 20 Det 600 bp 5' RACE-produktet og 1200 bp 3' RACE-produktet ble klonet inn i pCR2.1 (Invitrogen) og ble så sekvensert. Denne sekvensinformasjonen ble så brukt for å utforme α OPGL-1 tungkjedede spesifikke primere for kloning av hele sekvensen. Den tungkjedede 5'-primeren (5' α OPGL-1 IgG2-primer) ble rettet inn mot senstråden og har et HindIII-sete og en konsensus Kozaksekvens før det naturlige startsetet. Den tungkjedede 3'-primeren (3' α OPGL-1 IgG2-primer) er en antisensprimer som inneholder et *SalI*-sete og stoppkodon etter den siste aminosyren i den tungkjedede IgG2-sekvensen.

5' α OPGL-1 IgG2-primer:

- 25 5'-CAGAAGCTTGACCACC ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG CTT TTT CTT GTG GC-3' (SEKV.ID. NR. 11)

HindIII Kozak M E R G L S W L F L V A
(SEKV.ID. NR 18)

3' α OPGL-1 IgG2-primer:

5'-GCA TGTCGAC TTA TCA TTT ACC CGG AGA CAG GGA GAG-3'
(SEKV.ID. NR. 12)

SalI * * K G P S L S L (SEKV.ID. NR. 19)

- 5 Det dobbelttrådede cDNA som er beskrevet ovenfor ble brukt for å utvikle fullengde tungkjedet cDNA ved PCR-amplifisering med nevnte 5'- og 3'- α OPGL-1 IgG2-primere. PCR utvikler et 1433 bp fragment som koder de 467 aminosyreresiduaene eller gruppene (inklusive den 19 aminosyrer lange IgG signalsekvensen) i det α OPGL-1 IgG2 tungkjededede proteinet (figur 2, SEKV.ID. NR. 2). Etter rensing ved å bruke et QIAquick PCR-rensesett (Qiagen katalognr. 28104), ble dette fragmentet brukt for å konstruere en tungkjedet ekspresjonsvektor som følger.

- 15 DNA som koder det hele IgG2 tunge fragmentet utvikles som beskrevet ovenfor ble kuttet med *HindIII* og *SalI*, renses ved å bruke et QIAquick gelekstraksjonssett (Qiagen katalognr. 28704), og dette fragmentet ble så klonet inn i pDSR α 19. Det resulterende ekspresjonsplasmidet fikk så betegnelsen α OPGL-1-IgG2/pDSR α 19 (figur 6). Alle vektorkomponentene er identiske til α OPGL-1-kappa/pDSR α 19-vektoren som er beskrevet ovenfor, bortsett fra at det α OPGL-1 IgG2 tungkjededede cDNA er erstattet med det α OPGL-1 kappa lett kjededede cDNA mellom *XbaI*- og *SalI*-setene. Den α OPGL-1 IgG2 tungkjededede ekspresjonsklonen ble sekvensert for å bekrefte at den kodet for det samme polypeptidet som ble identifisert i AMG 6.4-hybridomet.

Eksempel 2

α OPGL-1-ekspresjon i CHO-celler

- 25 Stabil ekspresjon av α OPGL-1-antistoff ble oppnådd ved en kotransfeksjon av α OPGL-1-kappa/pDSR α 19- og α OPGL-1-IgG2/pDSR α 19-plasmider i de hydrofolatreduktasesviktende (DHFR⁻) kinesiske hamstereggstokkcellene (CHO AM-1/D, U.S. patent nr. 6,210,924) etter isolering og testing av individuelle kloner.
- 30 En 100 mm vevskulturplate ble utplatet med $1,5 \times 10^6$ AM-1/D-celler dyrket i CHO d⁻-medium (DMEM høy glukose, 10% storfeforesterserum, 1% penicillin/streptomycin/glutamin, 1X NaPyruvat, 1% ikke-essensielle aminosyrer (NEAA)) (Gibco®) og 1% ht-supplement (Gibco®) dagen før transfeksjoner (dag 0). På dag en ble 400 μ l serumfritt RPMI 1640-medium (Gibco®) porsjonert over i 12 $\times$ 75 mm polypropylenrør. 24 μ l av *TransIT*®-LT1-reagens (Mirus Corporation)
- 35 ble dråpevis tilsatt mediet, og blandingen ble hensatt for innkubering ved romtemperatur i 10 minutter. Totalt 15 μ g linearisert plasmid DNA (7m5 μ g av α OPGL-1-kappa/pDSR α 19 og 7,5 μ g av α OPGL-1-IgG2/pDSR α 19 ble kuttet med

Pvu1), ble så dråpevis tilsatt blandingen og denne ble så innkubert ved romtemperatur i 10 minutter.

CHO d-mediet ble fjernet fra cellene som så ble vasket med 10 ml Dulbeccos fosfatbufret saltløsning (Gibco®). 6 ml serumfritt MEM-medium supplert med NT, L-glu, NEAA og Na pyruvat (Gibco®) ble tilsatt cellene. DNA/LT1-komplekset ble dråpevis tilsatt platene som så forsiktig ble beveget frem og tilbake for å fordele nevnte DNA jevnt utover cellene. Etter 6 timer i en vevskulturinnkubator, ble mediet erstattet med friskt CHO d-medium. 48 timer senere ble cellene splittet og overført til 10 100 mm kulturplater i CHO-utvalgt medium (DMEM høyglukose, 10% dialysert storfosterserum (FBS), 1% penicillin/streptomycin/glutamin, 1% ikke-essensielle aminosyrer og 1X Na pyruvat) (Gibco®). Mediet ble forandret to ganger i uken inntil koloniene var synlige.

Etter 10-14 dager ble koloniene tatt ut ved å bruke 5 mm kloningsskiver (Labcore®) dynket med 1 × trypsin-EDTA (Gibco®) og så dyrket i 24 brønners vevsdyrkningsplater med CHO-valgt medium. Da cellene ble sammenflytende, ble serumfritt medium (CHO-valgt medium minus FBS) tilsatt, og dette ble så oppsamlet 48 timer senere. Dette kondisjonerte mediet ble analysert for antistoffekspresjon ved hjelp av Western blot med pepperrotperoksidase (HRP)-konjugert geite antihumant IgG Fc-antistoff (Pierce, Rockford, IL) for å påvise nevnte α OPGL-1 tunge kjede og geite antihumant kappakjede antistoff (Pierce, Rockford, IL) fulgt av HRP-konjugert kanin antigeit IgG(H+L) antistoff (Pierce, Rockford, IL) for å påvise den α OPGL-1 lette kjeden. Klonene med den høyeste ekspresjonen ble utvidet og lagret i flytende nitrogen.

Eksempel 3

25 Produksjon av α OPGL-1

Fremstilling og dannelsen av cellelinje 125Q

CHO-celler som produserte α OPGL-1 ble klonet ved to runder av begrensende fortynning i 96 brønners plater under serumfrie betingelser. Klonene ble så valgt ut basert på produksjon og vekstegenskaper i forskjellige suspensjonskar. EIA ble utført for å velge den klonen som produserte det høyeste nivået av α OPGL-1. Vekstegenskaper, heri inngår doblingstider og tettheter, ble så målt ved å dyrke klonene i 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 l og 3 l kolber, så vel som i 3 l Applikon bioreaktorer. Klonen med den raskeste doblingstiden som gir den høyeste tettheten i kultur ble så valgt ut og betegnet cellelinje 125Q. Når klonen var utvidet til å gi tilstrekkelige celler til at det var mulig å fryse 360 ampuller som hver inneholdt ca 1×10^7 celler/ml, ble cellene resuspendert i et kryokonserverende, serumfritt medium (90% VM-Soy Batch Medium (se tabell 3 for detaljer) supplert med 10 ml/l ikke-essensielle aminosyrer og 10 ml/l L-glutamin (Gibco/LTI/Invitrogen) og 10% dimetylsulfoksid (JT Baker)) og så frosset. Ampullene ble lagret i en enhet med

begrenset tilgang og nedsenket i flytende nitrogen i beholdere med flytende nitrogen.

Basert på vekst og produksjon i småskalacentrifuger og storskala bioreaktorer, ble cellelinje 125Q valgt ut som cellelinjen for produksjon av α OPGL-1.

5 Cellekultur

α OPGL-1 blir produsert ved ekspresjon i cellelinje 125Q, en klonal linje av CHO-celler som uttrykker α OPGL-1 fra plasmidene α OPGL-1-kappa/pDSR α 19 og α OPGL-1-IgG2/pDSR α 19. Celledyrkningsprosessen for α OPGL-1 er vist på figur 19. For hver produksjonsrunde ble celler fra en ampulle av cellelinje 125Q først dyrket i 50 ml VM-Soy Batch Medium (se tabell 3 for sammensetning) supplert med 10 ml/l ikke-essensielle aminosyrer og 10 ml/l L-glutamin (Gibco/LTI/Invitrogen) (VM-Soy Supp) i 125 ml erlenmeyerkolber ved 100 rpm i 5 dager. Hele kulturen ble så brukt for å inokulere VM-Soy Supp i en 500 ml sentrifugekolbe til 3×10^5 synlige celler/ml ($3E5$ vc/ml) og så dyrket med 70 rpm sentrifugering i 3-4 dager. Hele kulturen fra 500 ml sentrifugekolbene ble så anvendt for å inokulere VM-Soy Supp i en 3 liters sentrifugekolbe til $3E5$ vc/ml og ble dyrket med 70 rpm sentrifugering i 3-4 dager.

Kulturen fra nevnte 3 liters sentrifugekolbe ble så delt i to og plassert i 3 liters sentrifugekolber ved $3E5$ vc/ml i VN-Soy Supp uten fenolrødt og dyrket under de samme betingelsene. Disse sentrifugekolbekulturene ble så brukt for å inokulere fire ytterligere kolber av samme type ved $3E5$ vc/ml i VM-Soy Supp uten fenolrødt og dyrket under samme betingelser. 4 liter av kulturen fra disse fire 3 liters sentrifugekolbene ble brukt for å inokulere 10 l VM-Soy Supp uten fenolrødt i en 20 liters bioreaktor, hvorefter bioreaktoren ble kjørt på en porsjonsvis måte i 7-10 dager. I denne metoden blir en næringstilførsel som inneholder konsentrerte mediekomponenter ("tilførsel" som angitt nedenfor i tabell 3) tilsatt for å opprettholde cellevekst og kulturlevedyktighet.

Hele kulturen fra nevnte 20 l bioreaktor ble så brukt for å inokulere 70 l VM-Soy Supp uten fenolrødt i en 150 l bioreaktor, og denne ble så kjørt på nevnte porsjonsmåte i 9-10 dager. Endelig ble hele kulturen fra den nevnte 150 l bioreaktoren brukt for å inokulere ca 880 l VM-Soy (uten supplement eller fenolrødt) i en 2000 l bioreaktor, og denne ble kjørt på en porsjonsvis måte. Tilførselen av næringsstoffer i denne fremgangsmåten bestemmes slik at glukosenivået i kulturen holdes på 0,6 g/l i hver bioreaktor. Celletetthet og glukosekonsentrasjon ble målt daglig, og tilførselen av næringsstoffer ble justert tilsvarende.

Produksjon i nevnte 2000 l bioreaktor varer i ca 2 uker og i dette tidsrommet ble α OPGL-1 konstitutivt produsert av cellene og skilt ut i celledyrkningsmediet.

Produksjonsreaktoren ble kontrollert ved en fast pH, temperatur og oppløst oksygen: pH er 7,0 og dette ble kontrollert ved hjelp av karbondioksidgass og tilsetning av natriumkarbonat; oppløst oksygen er 120 mmHg og blir kontrollert ved gjennomstrømning av luft, nitrogen- og oksyngengass. Cellene ble holdt på 37°C under hele prosessen. Alle gassene ble ført gjennom membranfiltre med porestørrelse på 0,22 µm eller mindre.

Ved slutten av produksjonen, ble cellemediet ført inn i en såkalt lagdelt skivesentrifuge og kultursupernatanten ble skilt fra cellene. Supernatanten ble ytterligere rensed gjennom et Cuno 90SP dybdefilter fulgt av et 0,2 µm Posidynfilter (Pall Co.). Det rensede kondisjonerte mediet ble så konsentrert ved tangentiell strøm ultrafiltrering (UF) ved å bruke 50 kD NMWL-membraner (Millipore Biomax 50). Det kondisjonerte mediet ble konsentrert 15 til 30 ganger. Det resulterende konsentrerte kondisjonerte medium (CCM) ble enten bearbeidet ved rensing eller frosset for rensing på et senere tidspunkt. Produksjonsprosessen er vist på figur 19.

15 Celledyrkningsmedium

Det celledyrkningsmediet som ble brukt i hele celledyrkningsprosessen er basert på Dulbeccos modifiserte Eagles medium/Hams Nutrient F-12 (DMEM/F-12, 1:1) og inneholder supplerende nivåer av aminosyrer, ytterligere næringsstoffer og salter, et soyahydrolysat og rekombinant humant insulin (Nucellin®Zn, Eli Lilly). Komponentene er angitt i tabell 3. Dette mediet er betegnet som VM-Soy. Medieløsningene ble filtrert gjennom membranfiltrere med en porestørrelse på 0,2 µm før bruk.

Tabell 3. Komponenter i celledyrkningsmedia
KOMPONENTER FOR BASALT media og TILFØRT media

KOMPONENT	VMsøyporsjonsvis medium (mg/l)	Tilført medium (mg/l)
DMEM/F12-KOMPONENTER		
Uorganiske salter		
CaCl ₂ (vannfritt)	116,60	233,2
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0026	0,0052
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0,1000	0,2
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,8340	1,668
KCl	311,80	623,6
MgCl ₂ (vannfritt)	57,280	114,56
MgSO ₄ (vannfritt)	97,680	195,36
NaCl	905,990	1811,98
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	125,00	250
Na ₂ HPO ₄	142,040	284,08
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,8640	1,728
Andre komponenter		
D-glukose	3151,00	12302
Na hypoxantin	5,40	10,8
Linolsyre	0,090	0,18
Lipoinsyre	0,2060	0,412
Fenolrødt	8,10	16,2
Putrescin·2HCl	0,1620	0,324
Natriumpyruvat	110,00	220

Aminosyrer		
L-alanin	26,70	53,4
L-arginin HCl	295,00	590
L-asparagin.H ₂ O	45,00	90
L-aspartinsyre	39,90	79,8
L-cystein.HCl.H ₂ O	35,120	70,24
L-cystein.2HCl	62,580	125,16
L-glutaminsyre	44,10	88,2
L-glutamin	657,00	1314
Glysin	52,50	105
L-histidin.HCl.H ₂ O	62,950	125,9
L-isoleukin	108,940	217,88
L-leukin	118,10	236,2
L-lysin HCl	182,50	365
L-metionin	34,480	68,96
L-fenylalanin	70,960	141,92
L-prolin	57,50	115
L-serin	73,50	147
L-treonin	106,90	213,8
L-tryptofan	18,040	36,08
L-tyrosin-2Na.2H ₂ O	111,580	223,16
L-valin	105,70	211,4
Vitaminer		
Biotin	0,0073	0,0146
D-Ca pantotenat	4,480	8,96
Cholinklorid	17,960	35,92
Folinsyre	5,30	10,6
i-inositol	25,20	50,4
Niacinamid	4,040	8,08
Pyridoksal HCl	4,00	8

Pyridoksin HCl	0,0620	0,124
Riboflavin	0,4380	0,876
Tiamin HCl	4,340	8,68
Tymidin	0,3635	0,727
Vitamin B12	1,360	2,72
Ytterligere komponenter		
Nycellin Zn, (rhu-insulin)	5,00	15
Selensyre	0,0050	0,015
Etanolamin	0,0012	0,0037
Trijodtyronin	0,000040	0,00012
Hydrokortison	0,020	0,06
Treverdig jerncitrat	122,450	122,450
Pluronic F-68	1000,00	500
Soyahydrolysat	6000,00	6000,00
NaHCO ₃	3000,00	3000,00
NaCl	3500,00	

Renseprosess

5 α OPGL-1 som ble uttrykt i CHO-celler ble skilt ut i det ekstracellulære mediet. En serie trinn kan brukes for å fremstille rent produkt. Prosessen bruker hydrofob ladningsinduksjon, kationutbytting og hydrofob interaksjonskromatografi sammen med et lavt pH-trinn og viralt filter. Disse prosedyrene er beskrevet i det etterfølgende.

A. Hydrofob ladningsinduksjonskromatografi (HCIC)

10 Dette kromatografitrinnet fjerner hovedmengden av vertscelleproteinene og DNA. Det konsentrerte kondisjonerte mediet (CCM) ble filtrert gjennom et Cuno 30SP-filter og så gjennom et Cuno VR07-ladet cellulosebasert filtrert og så påsatt en MEP HyperCel harpiks. Etter ladningen ble kolonnen vasket med en ekvibreringsbuffer (20 mM Tris pH 7,2). Antistoffet ble eluert fra harpiksen ved å bruke en lav pH-buffer (20 mM natriumacetat, pH 5,0). Etter hvert som det ble eluert fra kolonnen, 15 ble produktet oppsamlet basert på absorpsjonen ved 280 nm i kolonneulatet.

B. Viral inaktivering

MEP eluatet fra harpikskolonnen ble titrert til pH 3,7 og holdt på denne verdien i ca 60 minutter for å inaktivere mulige forurensende retrovirus. Etter dette trinnet, ble pH justert til ca 6,0.

C. Viral filtrering

- 5 Det pH-justerte eluatet ble filtrert gjennom et Millipore Viresolve NFR-filter eller tilsvarende. Antistoffet vil da strømme gjennom filteret, mens mulige forurensende virus ≥ 50 nm vil bli holdt tilbake.

D. Kationutbyttingskromatografi (CEX)

- 10 Antistoffet ble ytterligere rensset ved kationutbyttingskromatografi ved å bruke SP Sepharose HP (Amersham Pharmacia) eller tilsvarende.
Kationutbyttingskromatografitrinnet fjerner ytterligere CHO-celleproteiner, DNA, lavmolekylære proteiner og aggregerte former av α OPGL-1. Det viralfiltrerte eluatet ble påsatt kationutbyttingsharpiksen. Etter påsetting, ble kolonnen vasket med ekvibreringsbuffer (20 mM NaMES pH 6,2). Antistoffet ble så eluert med en
15 lineær gradient med økende saltkonsentrasjon (20 mM NAMES pH 6,2, 0 M NaCl til 20 mM NaMES pH 6,2, 0,3 M NaCl). Etter hvert som produktet ble eluert fra kolonnen, ble det oppsamlet basert på absorpsjonen ved 280 nm i kolonneeluatet.

E. Hydrofob interaksjonskromatografi (HIC)

- 20 Antistoffet ble ytterligere rensset ved hydrofob interaksjonskromatografi ved å bruke fenyl Toyapearly 650S (Tosoh Biosep) eller tilsvarende. Det hydrofobe interaksjonskromatografitrinnet blir brukt som et avsluttende trinn for å fjerne ytterligere CHO-celleproteiner, DNA, lavmolekylære proteiner og aggregerte former av α OPGL-1. Kationutbyttingseluatet ble kondisjonert før det ble påsatt kolonnen ved å tilsette ammoniumsulfat til en ledningsevne på > 105 mS/cm ved
25 15-25°C. Etter påsetting ble kolonnen vasket med ekvibreringsbufferen (1 M kaliumfosfat pH 8). Antistoffet ble så eluert med en lineær gradient med synkende saltkonsentrasjon (1 M kaliumfosfat, 0 mM Tris pH 8 til 0 M kaliumfosfat, 20 mM Tris pH 8). Etter hvert som det ble eluert fra kolonnen, ble produktet oppsamlet basert på absorpsjonen ved 280 nm i kolonneeluatet.

- 30 F. Konsentrasjon og diafiltrering.

HIC-kolonneeluatet ble konsentrert og diafiltrert i en sammensetningsbuffer ved tangentiell strøm ultrafiltrering ved å bruke 50 kD NMWL-membraner (Millipore Biomax 50). Sammensetningsbufferen inneholder 10 mM acetat, 5% sorbitol, pH 5,2 og α OPGL-1 er ved 30 mg/ml.

- 35 Endelig filtrering og lagring

Det rensede og samlede volumet ble ført gjennom et 0,22 μ m PVDF-filter (Millipore), oppsamlet og lagret ved ca -30°C i en sikret fryser.

Eksempel 4

Bindingsspesifitet for α OPGL-1

Antistoffer som er produsert i CHO-celler ble transfektert med de to ekspresjonsvektorene som er beskrevet i eksemplene 1 og 2, kan brukes som angitt i de følgende eksemplene 4, 5 og 6.

Humant OPG binder og nøytraliserer OPGL i rotter, mus og cynomolgusaper så vel som i mennesker. α OPGL-1 binder humant OPGL med høy affinitet, men binder seg ikke signifikant til muse OPGL (tabell 4).

Tabell 4: Affinitet for α OPGL-1 til cellemembranuttrykt OPGL fra mennesker, cynomolgusaper eller musesekvens

OPGL-arter	α OPGL-1 ED ₅₀ (ng/ml)
Menneske	16
Cynomolgus	19
Mus	Ingen spesifikk binding

OPGL fra disse artene blir uttrykt i CHO-celler som fullengde, membranbundet protein. Binding av α OPGL-1 til celleoverflateuttrykt OPGL ble bedømt ved FACS-analyse av celler innkubert med α OPGL-1 og et FITC-merket sekundært antistoff til humant IgG2. α OPGL-1 binder humant og cynomolgus OPGL, men det er ingen spesifikk binding til muse OPGL.

I tillegg er det blitt rapportert at humant OPG viser svak binding til tumornekrosefaktorrelatert apoptoseinduserende ligand (TRAIL) (Truneh et al, 2000), som er nærstående til TNF-gruppen, som viser DNA og aminosyresekvenshomologi til OPGL (Lacey et al., 1998). OPG binder seg imidlertid ikke påvisbart til andre TNF-relaterte proteiner som TNF α , TNF β eller CD40-ligand.

α OPGL-1 binder seg spesifikt til OPGL på EIA-plater (figur 7). Rekombinant løselig OPGL (2 μ g/ml) ble pålagt 96 brønners EIA-plater ved romtemperatur i fra 16 til 24 timer. Etter blokkering med 1% BSA i PBS, så ble brønnene tilsatt varierende konsentrasjoner av α OPGL-1 (ca 2 ng/ml til 1000 ng/ml) fortynnet i 1% BSA/PBS og platene ble innkubert i 2 timer ved romtemperatur. Bundet antistoff ble påvist ved hjelp av geit antihumant IgG (Fab')-HRP ved å bruke TMB-H₂O₂ (tetrametylbenzidin og hydrogenperoksid) substratblanding. Absorpsjonen ble avlest ved 450 nm og 650 nm.

α OPGL-1 binder seg spesifikt til OPGL som er uttrykt på overflaten av transfekterte celler (figur 8). α OPGL-1 (100 ng/ml) fortynnet i FACS-buffer (PBS, 0,1% BSA, 0,01% natriumazid) som var preinnkubert med varierende

konsentrasjoner av OPGL, TNF α , TNF β , TRAIL eller CD40-ligand (fra ca 0,1 ng/ml til 1000 ng/ml), og ble så tilsatt ca 200000 CHO REN 218-9-celler som er CHO-celler som stabilt uttrykker membranbundet OPGL på celleoverflaten. Etter 1 time ved 2-8°C ble ubundet antistoff fjernet ved sentrifugering og vasking. Cellene ble så innkubert i 30 minutter i 2-8°C med FITC-merket F(ab')₂ geit antihumant IgG (Fc γ fragmentspesifikt). Etter sentrifugering og vasking, ble celleoverflatefluorescensen målt ved hjelp av flowcytometri. Figur 8 viser at bindingen av α OPGL-1 til CHO REN 218-9-celler er spesifikk og blir kompetitivt redusert ved å tilsette løselige OPGL, men ikke ved en tilsetning av TNF α , TNF β , TRAIL eller CD40-ligand.

I konkurranseeksperimenter blir α OPGL-1-binding til OPGL på EIA-plater hemmet ved å tilsette eksogent OPGL (figur 9), men ikke ved å tilsette TNF α , TNF β , TRAIL eller CD40-ligand (figur 10). Fremgangsmåten ble i alt vesentlig utført på samme måte som beskrevet ovenfor for binding av α OPGL-1 til OPGL på EIA-plater, bortsett fra at en konstant konsentrasjon av α OPGL-1 (100 ng/ml) var preinnkubert med varierende konsentrasjoner av løselig OPGL eller andre ligander (ca 1 ng/ml til 1000 ng/ml for hver av dem) før tilsetning til de OPGL-belagte platene.

Eksempel 5

α OPGL-1-nøytraliserende aktivitet

Inhibering av osteoklastdannelse

RAW 264.7 (ATCC nr. TIB-71, Manassas, VA) er en musemakrofagcellelinje som er avledet fra en Abelson museleukemi virusindusert tumor. RAW 264.7-celler vil differensiere seg til osteoklastlignende celler i nærværet av OPGL. Den grunnleggende prøven for utvikling av osteoklaster i kultur fra RAW-celler i nærværet av OPGL er detaljert beskrevet i Simonet et al (1997) *Cell* **89** side 309 og Lacey et al (1998) *Cell* **93** side 165.

Ved hjelp av ligander blir RAW-cellene stimulert til å differensiere seg til osteoklastlignende celler, og denne differensieringen kan måles ved TRAP-aktivitet, en egenskap ved osteoklaster. Effekten av α OPGL-1 på osteoklastgenesen kan således måles.

RAW-celler ble innkubert i 4 dager i nærværet av en konstant mengde av OPGL (40 ng/ml) og varierende mengder av α OPGL-1 (6.3 ng/ml til 200 ng/ml) i et celledyrkningsmedium (DMEM, 10% FBS, 0,292 mg/ml L-Glut, 100 enheter/ml penicillin G, 100 μ g/ml streptomycinsulfat). Etter perioden på 4 døgn ble cellene farget for tartratresistent syrefosfatase (TRAP) aktivitet ved permeabilisering og surgjøring fulgt av en behandling med para-nitrofenylfosfat i 5 minutter. Kort beskrevet ble medium suget av cellene og hver brønn ble tilsatt 100 μ l citratbuffer (410 ml 0,1 M sitronsyre, 590 ml 0,1 M citrat, trinatriumsalt, 1 ml triton X-100) og platene ble innkubert i fra 3 til 5 minutter ved romtemperatur. 100 μ l av PNPP-løsning ble så tilsatt (157,8 mg sur fosfatasereagens (Sigma 104-100), 7,2 ml tartratløsning (Sigma katalognr. 387-3) og 22,8 ml citratbuffer) og platene ble innkubert i fra 3 til 5 minutter ved romtemperatur. Reaksjonen ble avsluttet ved å tilsette 50 μ l 0,5 M NaOH-løsning.

TRAP vil omdanne para-nitrofenylfosfat til para-nitrofenol som kan kvantifiseres ved en måling av den optiske tettheten ved 405 nm. TRAP-aktiviteten som er en erstatningsmarkør for osteoklastutvikling vil derfor være korrelert med den optiske tettheten ved 405 nm. Et diagram som viser optisk tetthet i forhold til α OPGL-1-konsentrasjonen er vist på figur 11, og viser at α OPGL-1 hemmer osteoklastdannelse i denne prøven.

Inhibering av OPGL-binding til dens reseptor

α OPGL-1 sine evner og muligheter ble vist ved dets evne til å blokkere bindingen av OPG-ligand til dens tilhørende reseptor, det vil si osteoklastdifferensiering og aktiverende reseptor (ODAR, også kjent som RANK). Denne prøven bruker homogeniseringstidsoppløs fluorescensresonans (HTRF) for å påvise binding av α OPGL-1 til europiumkonjugert osteoprotegerinligand (Eu-OPGL). Hvis α OPGL-1

hemmer Eu-OPGL-binding til ODAR, så vil fluorescensstyrken avta og mengden av tilstedeværende α OPGL-1 vil således være inverst relatert til styrken eller mengden av fluorescens.

5 OPGL ble merket med europium som emitterer lys ved 620 nm når det blir eksitert ved lys med en bølgelengde på 337 nm. ODAR ble fusjonert til FLAG og Fc, og Fc-ODAR-FLAG-fusjonsproteinet ble merket med et anti-FLAG-antistoff forbundet med allofykocyanin (APC), en fluorofor som emitterer lys ved 665 nm når det blir eksitert med lys ved en bølgelengde på 620 nm. Når Eu-merket OPG-ligand binder seg til det nevnte Fc-ODAR-FLAG/anti-FLAG-APC-komplekset, så vil derfor det
10 tertiære komplekset emittere lys ved 665 nm når det eksiteres med lys ved en bølgelengde på 337 nm.

Eu-OPGL ved en konsentrasjon på 0,05 μ g/ml ble preinnkubert med forskjellige konsentrasjoner (fra 0,1 til 150 ng/ml) av α OPGL-1 i en prøvebuffer (50 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 0,05% NaN₃, 0,1% BSA og 0,05% Tween 20) ved
15 romtemperatur i ca 1 time (preinnkuberingsblanding). En blanding av Fc-ODAR-FLAG (1 μ g/ml) og anti-FLAG-APC (2,5 μ g/ml) ble også fremstilt i prøvebuffer og innkubert ved romtemperatur i 1 time (fluorokromblanding). Like volumer av preinnkuberingsblandingen og fluorokromblandingen ble så blandet, og innkubert ved romtemperatur i 3 timer. Fluorescensen ble målt ved å lese platene i et Packard
20 Discovery HTRF mikroplateanalyseapparat ved å bruke en eksitasjonslengde på 337 nm og en emisjonsbølgelengde på 665 nm.

Når α OPGL-1 ble preinnkubert med Eu-OPG-ligand og så blandet med Fc-ODAR-FLAG/anti-FLAG-APC, så synker fluorescensintensiteten ved 665 nm på en doseavhengig måte slik dette er vist på figur 12, og som viser at α OPGL162
25 effektivt kan hemme OPGL-binding til ODAR.

Eksempel 6

Farmakokinetikk i cynomolgusaper

Seks hannlige og seks hunnlige cynomolgusaper, ikke eldre enn 4,5 år og med en kroppsvekt på fra 2 til 4 kg, ble fordelt i 4 dosegrupper. Gruppe 1 besto av 3 hanner
30 og 3 hunner. Gruppene 2, 3 og 4 besto hver av 1 hann og 1 hunn. Dyrene i gruppe 1 ble administrert en enkelt subkutan dose av 1 mg/kg α OPGL-1, mens dyrene i gruppene 2, 3 og 4 ble administrert enkle intravenøse doser av henholdsvis 0,1, 1,0 eller 10,0 mg/kg α OPGL-1.

Dyrene ble dosert med α OPGL-1 uttrykt fra transfekterte kinesiske
35 hamstereggstokkceller (CHO). Det ble så tatt serumprøver for å bestemme nivået av α OPGL-1, analyse av antistoffer og analyse av benomsetningsmarkøren N-telopeptid i serum (serum N-Tx), alkalisk fosfatase (ALP) og serumkalsium (serum Ca). Urin ble også oppsamlet for analyse av N-telopeptid (urin N-Tx) og kreatinin.

Tidsprofilene for serumkonsentrasjonen etter IV-administrering er karakterisert ved en trefaset fordeling (figur 13). Først er det en rask fordelingsfase fulgt av en signifikant langsommere platåfase som synes å være konsentrasjonsavhengig. Den tredje observerte fasen er en rask elimineringsfase.

- 5 Det ble brukt en ikke-kompartemental analyse av fullstendige serumkonsentrasjons-
tidsprofiler ved å bruke WinNonlin Professional (v1.5) foruten en eksponentiell
analyse av data opp til 14 dager etter at testforbindelsene var administrert og ved
10000 ng/ml ved å bruke SAAM II (v.1.1.2) for å undersøke farmakokinetikkene for
 α OPGL-1 i aper. Det opprinnelige fordelingsvolumet for alle IV-dosene er i
10 gjennomsnitt 28,9 ml/kg, noe som tilsvarer plasmavolumet. Stabilt tilstandsvolum
(V_{ss}) for fordeling er i gjennomsnitt 39 ml/kg for alle IV-dosene. Eksponentiell
analyse indikerer at α OPGL-1 har et midlere fordelingshalvliv ($t_{1/2\alpha}$) på 6,02 timer,
og en forlenget sekundær fase med et halvliv ($t_{1/2\beta}$) som øker med dosen fra 86,9
timer ved en dose på 0,1 mg/kg til et maksimum på 444 timer ved en dose på 10,0
15 mg/kg. Endelig elimineringshalvliv ($t_{1/2z}$) beregnet ikke-kompartementalt, er i
gjennomsnitt 31 timer for alle IV-dosegruppene. Elimineringen (Cl , Cl/F) for
 α OPGL-1 viste seg å være ikke-lineær, og hvor dyrene som fikk IV-doser på 10
mg/kg hadde en midlere eliminasjon (0,120 ml/time/kg) som er 3,3 ganger lavere
enn de som fikk 0,1 mg/kg (0,401 ml/time/kg).
- 20 Etter en subkutan administrering, er absorpsjonen langsom med en midlere
toppkonsentrasjon (C_{max}) på 11600 ng/ml etter 132 timer. Det er stor variabilitet
med hensyn til eksponeringen etter SC-administrering, noe som resulterer i en
midlere eliminasjon på $0,387 \pm 0,281$ ml/time/kg og en midlere oppholdstid på $202 \pm 80,1$ timer. Midlere biotilgjengelighet er 89%.
- 25 De foregående data er oppsummert i tabell 5.

Tabell 5: Gjennomsnitt ($\pm$ SD) for ikke-kompartementale farmakokinetiske parametere^a i cynomolgusaper etter administrering av en enkelt dose av α OPGL-1 IV og SC

Beregninger av ikke-kompartementale parametere						
Parameter	Enhet	1,0 mg/kg		0,1 mg/kg	1,0 mg/kg	10 mg/kg
		SC (n = 6)		IV (n=2)	IV (n=2)	IV (n=2)
		Middel	SD	Middel	Middel	Middel
T _{max}	time	132	60,2	0	0	0
C _{max}	ng/ml	11600	3410	4330	38200	326000
T _{1/2,z}	time	34,9	11,1	30,7	31,4	ND ^b
AUC _(0-∞)	μg*time/ml	3520	1750	253	3950	99900
CL, CL/F	ml/time/kg	0,387	0,281	0,401	0,256	0,120
MRT	time	202	80,1	84,8	124	519
V _{ss}	ml/kg	N/A ^c	N/A	33,7	31,7	55,9

^a Verdier angitt i forhold til 3 signifikante tall

^b Ikke bestemt, PK-prøvene endte under platå (β) fasen, følgelig ble den terminale fasen ikke observert

^c Ikke anvendbart

- 5 α OPGL-1 forårsaker en rask senkning av serum N-Tx-nivåene i løpet av 24 timer
- 10 etter dosering (figur 14). Den midlere tiden for maksimal effekt opptrer mellom 12 timer og 7 dager etter dosering ettersom IV-dosene øker fra 0,1 til 10 mg/kg, og mellom 12 timer og 11 dager i dyr som mottar en SC-dose på 1,0 mg/kg. Maksimal effekt øker med dosen fra ca 80 til 91% i et doseområde fra 0,1 til 1 mg/kg. Ved
- 15 høyere doser ble det imidlertid ikke observert noen ytterligere suppresjon med en maksimal inhibering på 91%. Midlere nivåer av serum N-Tx gikk tilbake til basislinjen på dag 28 etter administrering av 0,1 mg/kg intravenøst og på dag 70 etter administrering av 1 mg/kg subkutant. Urin N-Tx viser tilsvarende utvikling som for serum N-Tx, bortsett fra at alle gruppene gikk tilbake til basislinjeverdier på dag 105 (figur 15).
- 20 Suppresjon av serum Ca øker med en dose en midlere nadir på 31,6% under basisgjennomsnittet syv dager etter IV-administrering av en dose på 10,0 mg/kg. Alle andre dosegrupper har en midlere senkning av serum Ca på mindre enn 26,4% fra deres basismiddelverdier. På dag 17 var nivået av serum Ca i alle de behandlede dyrene returnert til verdier som ligger 10% innenfor deres basislinjemiddelverdier
- 25 (figur 20).

Ettersom benresorpsjon og -dannelse er intimt forbundet, ble det også observert forandringer i bendannelsesmarkører (ALP) med en langt lavere senkning av ALP-nivåene og en mer forlenget suppresjon enn for dannelsesmarkøren N-Tx (figur 21). Observasjoner viser at benresorpsjonsmarkørene synker før bendannelsesmarkørene (ALP) etter dosering med α OPGL-1, bekrefter at α OPGL-1 er et benantiresorptivt middel.

Flesteparten av dyrene (9 av 12) utvikler antistoffer til α OPGL-1. Forekomsten av antistoffer til α OPGL-1 er ikke dose- eller administrasjonsveiavhengig. Det er ikke mulig å bedømme effekten av antistoffene til α OPGL-1 på α OPGL-1-farmakokinetikkene over en dose på 0,1 mg/kg når ingen dosegruppe har både antistoffnegative og -positive dyr. Ved 0,1 mg/kg IV var mesteparten av α OPGL-1 eliminert før antistoffutvikling, og det var følgelig ikke mulig å observere effektene på en α OPGL-1-disposisjon (figur 16).

PATENTKRAV

1. Antistoff,
karakterisert ved å omfatte en tung kjede og en lett kjede, og hvor den
tunge kjeden omfatter en aminosyresekvens som angitt i SEKV.ID. NR. 13, og hvor
5 den lette kjeden omfatter en aminosyresekvens som angitt i SEKV.ID. NR. 14, og
hvor antistoffet binder seg til osteoprotegerinligand (OPGL) og hemmer binding av
OPGL til en osteoklastdifferensierings og -aktiveringsreseptor (ODAR).
2. Antistoff ifølge krav 1,
karakterisert ved at den tunge kjeden og den lette kjeden er forbundet
10 med en fleksibel linker og derved danner et enkeltkjedet antistoff.
3. Antistoff ifølge krav 2,
karakterisert ved å være et enkeltkjedet Fv-antistoff.
4. Antistoff ifølge krav 1,
karakterisert ved å være et Fab-antistoff.
- 15 5. Antistoff ifølge krav 1,
karakterisert ved å være et Fab'-antistoff.
6. Antistoff ifølge krav 1,
karakterisert ved å være et (Fab')₂-antistoff.
7. Antistoff ifølge krav 1,
20 karakterisert ved å være fullt ut humant.
8. Antistoff ifølge krav 1,
karakterisert ved å omfatte en tung kjede og en lett kjede, og hvor den
tunge kjeden omfatter en aminosyresekvens som angitt i SEKV.ID. NR. 2 fra
residua 20 til residua 467, og hvor den lette kjeden omfatter en aminosyresekvens
25 som angitt i SEKV.ID. NR. 4 fra residua 21 til residua 235.
9. Antistoff ifølge krav 1,
karakterisert ved å omfatte en tung kjede og en lett kjede, og hvor den
tunge kjeden består av en aminosyresekvens som angitt i SEKV.ID. NR. 2 fra
residua 20 til residua 467, og hvor den lette kjeden består av en aminosyresekvens
30 som angitt i SEKV.ID. NR. 4 fra residua 21 til residua 235.
10. Farmasøytisk sammensetning,
karakterisert ved å omfatte et antistoff ifølge ethvert av kravene 1 til 9.

ANTISTOFFER TIL OPGL SEKV.LISTER

SEKVENSLISTER

<110> Boyle, William J

Martin, Francis H

Corvalan, Jose R

Davis, C. Geoffrey

<120> Antistoffer til OPGL

<130> 06843.0049-00000

<150> 60/301,172

<151> 2001-06-26

<160> 20

<170> PatentIn versjon 3.1

<210> 1

<211> 1426

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

```

aagcttgacc accatggagt ttgggctgag cgggcttttt cttgtggcta ttttaaaagg      60
tgtccagtgt gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc      120
cctgagactc tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgcca tgagctgggt      180
ccgccaggct ccaggaaggg ggctggagtg ggtctcaggt attactggga gtgggtggtag      240
tacatactac gcagactccg tgaagggcog gttcaccatc tccagagaca attccaagaa      300
cacgctgtat ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc      360
gaaagatcca gggactacgg tgattatgag ttgggtcgac cctgggggcc aggggaaccct      420
ggtcaccgtc tctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc tccccctgg cgccctgctc      480
caggagcacc tccgagagca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga      540
accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc tctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccagc      600
tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcaa      660
cttcggcacc cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga      720
caagacagtt gagcgcaaat gttgtgtcga gtgccaccg tgcccagcac cacctgtggc      780

```

```

aggacogtca gtcttctctt tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac      840
ccctgaggtc acgtgctggt tgggtggacgt gagccacgaa gaccccgagg tccagttcaa      900
ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt      960
caacagcacg ttccgtgtgg tcaçcgttct caccgttggt caccaggact ggctgaacgg      1020
caaggagtac aagtgaagg tctccaacaa aggcctccca gcccccatcg agaaaacat      1080
ctccaaaacc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga      1140
ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggt aaaggcttct accccagcga      1200
catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacacctcc      1260
catgctggac tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag      1320
gtggcagcag gggaaogtct tctcatgtct cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta      1380
cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatgataa gtcgac                      1426

```

<210> 2
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 2

```

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1           5           10           15

```

```

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
          20           25           30

```

```

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
          35           40           45

```

```

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

```

```

Glu Trp Val Ser Gly Ile Thr Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
65           70           75           80

```

```

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
          85           90           95

```

```

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
          100          105          110

```

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Pro Gly Thr Thr Val Ile Met Ser Trp Phe
 115 120 125

Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

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

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

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

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

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

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

Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
 245 250 255

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 728

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

tctagaccac catggaaacc ccagcgcagc ttctcttcct cctgctactc tgggtcccag	60
ataccaccgg agaaattgtg ttgacgcagt ctccaggcac cctgtctttg tctccagggg	120
aaagagccac cctctcctgt agggccagtc agagtgttcg cggcaggtac ttagcctggt	180
accagcagaa acctggccag gctcccaggc tctcatcta tgggtcatcc agcagggcca	240
ctggcatccc agacaggttc agtggcagtg ggtctgggac agacttcact ctcaccatca	300
gcagactgga gcctgaagat ttgacagtgt ttactgtca gcagtatggt agttcacctc	360
ggacgttcgg ccaagggacc aaggtggaaa tcaaacgaac tgtggctgca ccatctgtct	420
tcatcttccc gccatctgat gagcagttga aatctggaac tgccctctgtt gtgtgcctgc	480
tgaataactt ctatcccaga gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac gccctccaat	540

```

cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca      600
gcagcaccct gacgctgagc aaagcagact acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag      660
tcaccccatca gggcctgagc tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgttgat      720
aagtcgac                                          728

```

```

<210> 4
<211> 235
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 4

```

```

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1          5          10          15

```

```

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
          20          25          30

```

```

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
          35          40          45

```

```

Val Arg Gly Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
          50          55          60

```

```

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
65          70          75          80

```

```

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
          85          90          95

```

```

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Phe Tyr Cys Gln Gln Tyr
          100          105          110

```

```

Gly Ser Ser Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          115          120          125

```

```

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

```

```

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145          150          155          160

```

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

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180 185 190

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
210 215 220

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

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Kunstig sekvens

 $\langle 220 \rangle$

<223> 5' kappa RACE-primer

<400> 5

gatgaccag tctccagcca ccctg

25

 $\langle 210 \rangle$ 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Kunstig sekvens

 $\langle 220 \rangle$

<223> 3' kappa RACE-primer

<400> 5

aagggtcaga ggccaaagga tgg

23

<210> 7
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Kunstig sekvens

<220>
 <223> 5' anti-OPGL-1 kappa-primer

<400> 7

30

caactctaga ccaccatgga aaccccagcg

<210> 8
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Kunstig sekvens

<220>
 <223> 3' anti-OPGL-1 kappa-primer

<400> 8

37

tttgacgtcg acttatcaac actctcccct gttgaag

<210> 9
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Kunstig sekvens

<220>
 <223> 5' IgG2 RACE-primer

<400> 9

23

ggcacgggtca ccacgctgct gag

<210> 10
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Kunstig sekvens

<220>
 <223> 3' IgG2 RACE-primer

<400> 10

24

cctccaccaa gggcccatcg gtct

<210> 11
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Kunstig sekvens

<220>
 <223> 5' anti-OPGL-1 IgG2-primer
 <400> 11

cagaagcttg accaccatgg agtttgggct gagctggctt tttcttgtgg c 51

<210> 12
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Kunstig sekvens

<220>
 <223> 3' anti-OPGL-1 IgG2-primer
 <400> 12

gcattgtcgac ttctcattta cccggagaca gggagag 37

<210> 13
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 13

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

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

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

Ser Gly Ile Thr Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Pro Gly Thr Thr Val Ile Met Ser Trp Phe Asp Pro Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 14

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

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

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

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Phe Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

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

<210> 15
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Kunstig sekvens
 <220>
 <223> vilkårlig primer
 <220>
 <221> div_trekk
 <222> (18)..(23)
 <223> N er A, C, G eller T
 <400> 15

ggccgtag gcctcacnnn nnnt

24

<210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Kunstig sekvens
 <220>
 <223> translatering av del av 5' anti-OPGL-1 kappaprimer
 <400> 16

Met Glu Thr Pro Ala
1 5

<210> 17
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Kunstig sekvens

<220>
 <223> translatering av del av 3' anti-OPGL-1 kappaprimer
 <400> 17

Cys Glu Gly Arg Asn Phe
1 5

<210> 18
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Kunstig sekvens
 <220>
 <223> translatering av del av 5' anti-OPGL-1 IgG2-primer
 <400> 18

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala
 1 5 10

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Kunstig sekvens
 <220>
 <223> translatering av del av 3' anti-OPGL-1 IgG2-primer
 <400> 19

Lys Gly Pro Ser Leu Ser Leu
 1 5

<210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Kunstig sekvens
 <220>
 <223> LHRH-antagonistpeptid
 <220>
 <221> DIV_TREKK
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa er Ac-D-Nal, hvor Nal er 3-(2-naftyl)alaninyl
 <220>
 <221> DIV_TREKK
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa er (4'-klorfenyl)alaninyl

<220>
 <221> DIV_TREKK
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa er D-Pal, hvor Pal er 3-(3'-pyridyl)alaninyl

<220>
 <221> DIV_TREKK
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa er N-metyltyrosin

<220>
 <221> DIV_TREKK
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa er D-asparagin

<220>
 <221> DIV_TREKK
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa er N-epsilon-2-propyllysinyll

<220>
 <221> DIV_TREKK
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa er D-alanin-NH2

<400> 20

Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Leu Xaa Pro Xaa
 1 5 10

FIGUR 1

 α OPGL-1 tungkjede cDNA

DNA-sekvensen for tungkjede ekspresjonsplasmidet som begynner ved HindIII-setet til og med SalI-setet. Startkodonet begynner ved nt 14, mens stoppkodonet begynner ved nt 1415.

```

1  AAGCTTGACC ACCATGGAGT TTGGGCTGAG CTGGCTTTTT CTTGTGGCTA TTTTAAAAGG
61  TGTCCAGTGT GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC
121 CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGC AGCTATGCCA TGAGCTGGGT
181 CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGGT ATTACTGGGA GTGGTGGTAG
241 TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA
301 CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTAT ATTACTGTGC
361 GAAAGATCCA GGGACTACGG TGATTATGAG TTGGTTCGAC CCCTGGGGCC AGGGAACCTT
421 GGTCAACGTC TCCTCAGCCT CCACCAAGGG CCCATCGGTC TTCCCCCTGG CGCCCTGCTC
481 CAGGAGCACC TCCGAGAGCA CAGCGGCCCT GGGCTGCCTG GTCAAGGACT ACTTCCCCGA
541 ACCGGTGACG GTGTCGTGGA ACTCAGGCGC TCTGACCAGC GGCCTGCACA CCTTCCCAGC
601 TGTCTTACAG TCCTCAGGAC TCTACTCCCT CAGCAGCGTG GTGACCGTGC CCTCCAGCAA
661 CTTCCGGCACC CAGACCTACA CCTGCAACGT AGATCACAAG CCCAGCAACA CCAAGGTGGA
721 CAAGACAGTT GAGCGCAAAT GTTGTGTCTGA GTGCCCACC GTCCTCAGCAC CACCTGTGGC
781 AGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC
841 CCCTGAGGTC ACGTGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCCGAGG TCCAGTTCAA
901 CTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCACGGG AGGAGCAGTT
961 CAACAGCACG TTCCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTTGTG CACCAGGACT GGCTGAACGG
1021 CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGGCCTCCCA GCCCCCATCG AGAAAACCAT
1081 CTCCAAAACC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA
1141 GGAGATGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ACCCCAGCGA
1201 CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACACCTCC
1261 CATGCTGGAC TCCGACGGCT CTTTCTTCT CTACAGCAAG CTCACCGTGG ACAAGAGCAG
1321 GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA
1381 CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAATGATAA GTCGAC (SEQ ID NO: 1)

```


FIGUR 2

 α OPGL-1 tungkjede aminosyresekvens

IgG2 signalpeptidet er understreket, det variable området er angitt med blokkbokstaver og er ikke understreket, mens det konstante området er angitt med vanlig skrift.

```

1  MEFGLSWLFL VAILKGVOCE VQLLESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSS YAMSWVRQAP
61  GKGLEWVSGI TGSGGSTYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCAKDPG
121 TTVIMSWFDP WGQGTlTVS Sastkgpsvf plapcsrsts estaalgclv kdyfpepvtv
181 swnsгалтsg vhtfpavlqs sglyslssvv tvpssnfgtq tytcnvdhkp sntkvdkve
241 rkccvecppc pappvagpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvshed pevqfnwyvd
301 gvevhnaatk preeqfnstf rvvsvltvvh qdwlngkeyk ckvsnkgipa piektisktk
361 gqprepvyt lppsreemtk nqvsltclvk gfypsdiave wesngqpenn ykttppmls
421 dgsfflyskl tvdksrwqqg nvfscsvmhe alnhytqks lslspgk (SEQ ID NO: 2)

```

FIGUR 3 **α OPGL-1 kappa lettkjede cDNA**

DNA-sekvensen for kappakjede ekspresjonsplasmidsekvensen fra XbaI-setet til og med SalI-setet. Startkodonet begynner ved nt 12 mens stoppkodonet begynner ved nt 717

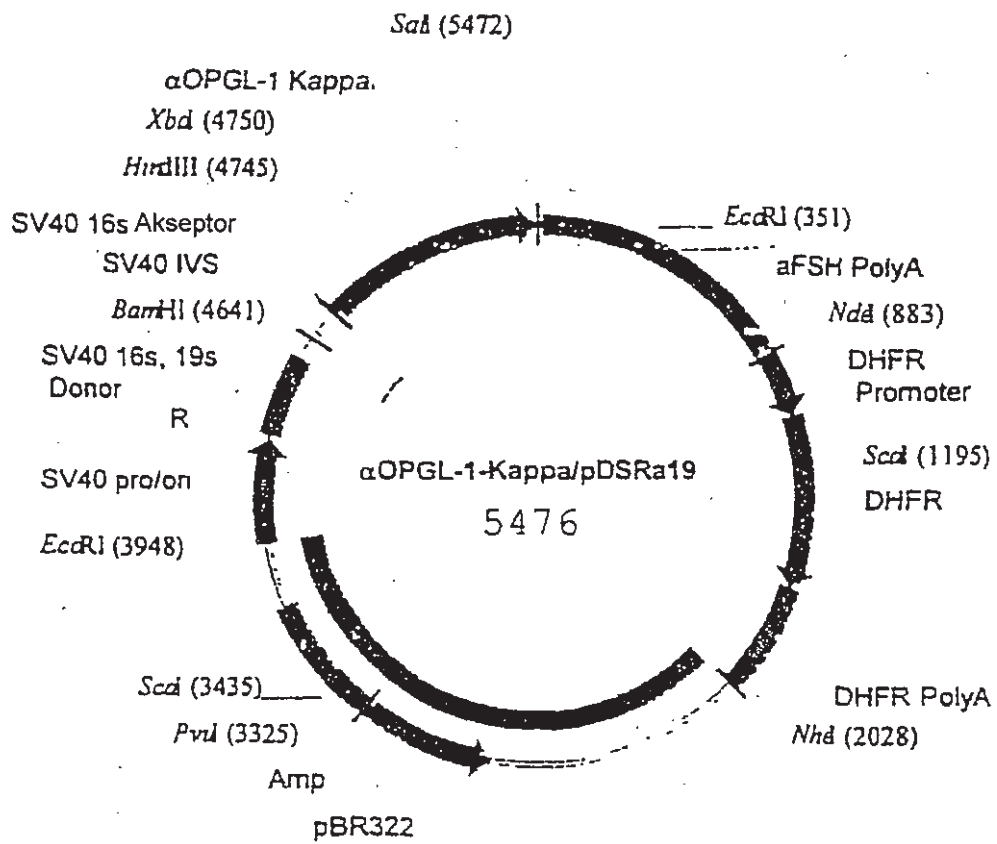
```
1  TCTAGACCAC CATGGAAACC CCAGCGCAGC TTCTCTTCCT CCTGCTACTC TGGCTCCCAG
61 ATACCACCGG AGAAATTGTG TTGACGCAGT CTCCAGGCAC CCTGTCTTTG TCTCCAGGGG
121 AAAGAGCCAC CCTCTCCTGT AGGGCCAGTC AGAGTGTTCT CGGCAGGTAC TTAGCCTGGT
181 ACCAGCAGAA ACCTGGCCAG GCTCCCAGGC TCCTCATCTA TGGTGCATCC AGCAGGGCCA
241 CTGGCATCCC AGACAGGTTT AGTGGCAGTG GGTCTGGGAC AGACTTCACT CTCACCATCA
301 GCAGACTGGA GCCTGAAGAT TTTGCAGTGT TTTACTGTCA GCAGTATGGT AGTTCACCTC
361 GGACGTTTCGG CCAAGGGACC AAGGTGGAAA TCAAACGAAC TGTGGCTGCA CCATCTGTCT
421 TCATCTTCCC GCCATCTGAT GAGCAGTTGA AATCTGGAAC TGCCTCTGTT GTGTGCCTGC
481 TGAATAACTT CTATCCCAGA GAGGCCAAAG TACAGTGGAA GGTGGATAAC GCCCTCCAAT
541 CGGGTAACTC CCAGGAGAGT GTCACAGAGC AGGACAGCAA GGACAGCACC TACAGCCTCA
601 GCAGCACCCCT GACGCTGAGC AAAGCAGACT ACGAGAAACA CAAAGTCTAC GCCTGCGAAG
661 TCACCCATCA GGGCCTGAGC TCGCCCGTCA CAAAGAGCTT CAACAGGGGA GAGTGTGAT
721 AAGTCGAC (SEQ ID NO: 3)
```

FIGUR 4 **α OPGL-1 kappa lettkjede aminosyresekvens**

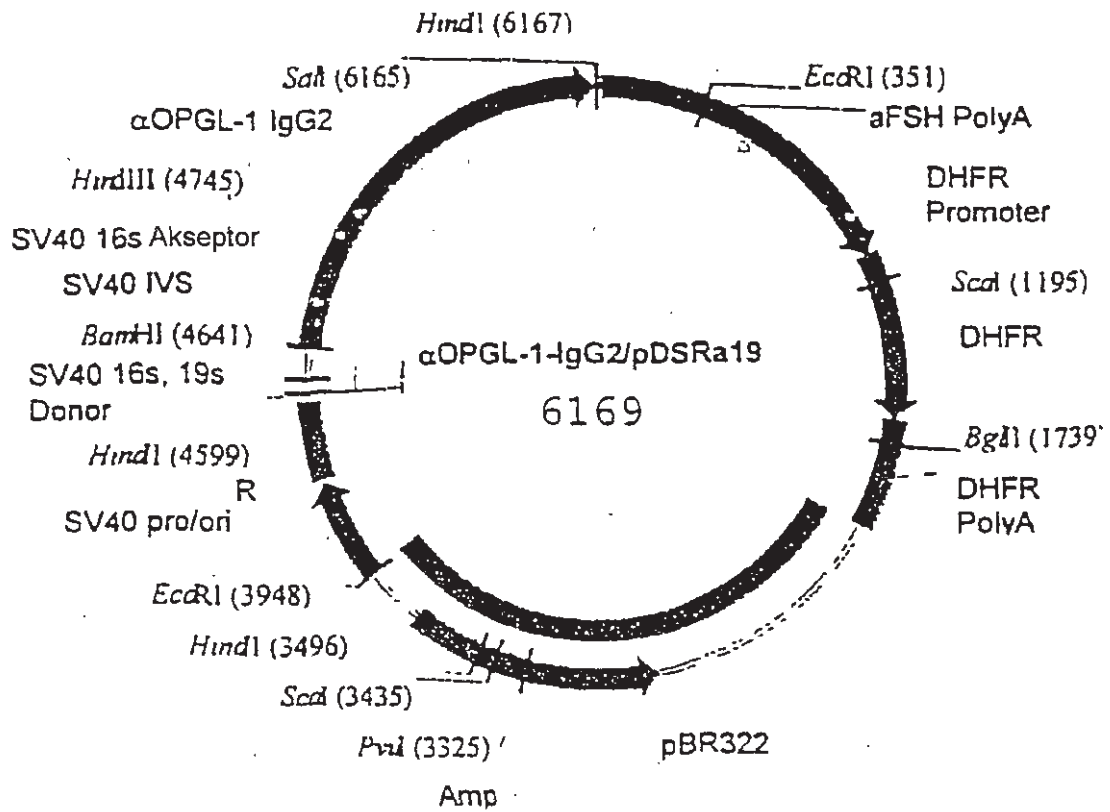
Kappasignalpeptidet er understreket, det variable området er angitt med blokkbokstaver og er ikke understreket, mens det konstante området er angitt med vanlig skrift.

```
1 METPAQLLFLLLLWLPDTTG EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVR
51 GRYLAWYQQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE
101 PEDFAVFYCQ QYGSSPRTFG QGTKVEIKrt vaapsvfifp psdeqlksgt
151 asvvcllnnf ypreakvqwk vdnalqsgns qesvteqdsK dstyslsstl
201 tlskadyekh kvyacevthq glsspvtksf nrgec (SEQ ID NO: 4)
```

FIGUR 5

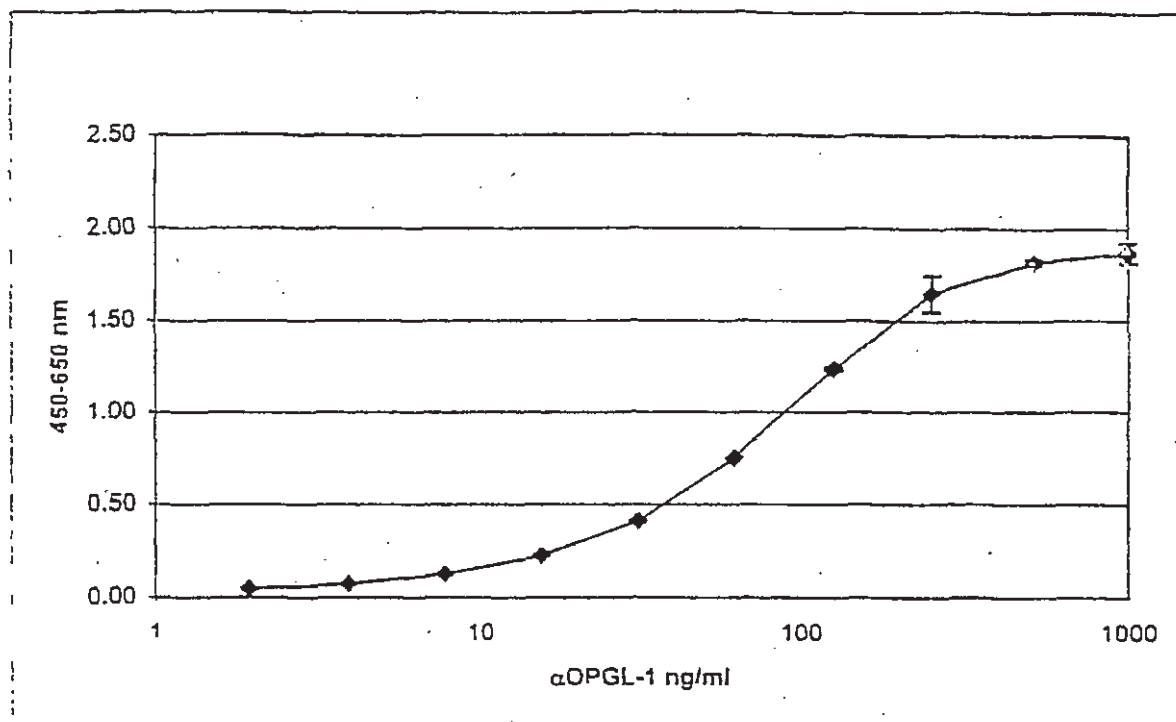
Sirkulært plasmidkart for α OPGL-1-kappa/pDSRa19

FIGUR 6

Sirkulært plasmidkart for α OPGL-1-IgG2/pDSRa19

FIGUR 7

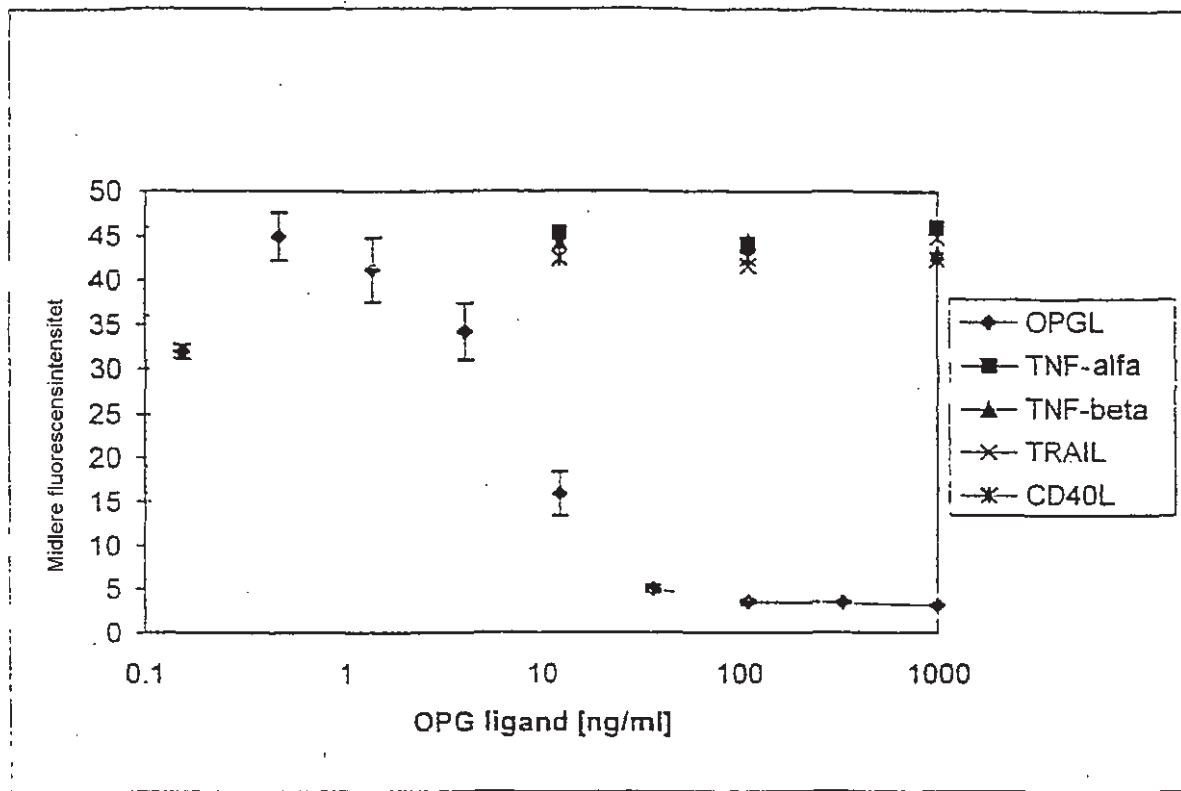
α -OPGL-1 binder seg til løselig OPG-ligand belagt på EIA-platen på en doseavhengig måte



96-brønners EIA-plater ble belagt med rekombinant løselig OPGL. Varierende konsentrasjoner av α OPGL-1 ble tilsatt brønnene og platene ble innkubert i 2 timer ved romtemperatur. Bundet antistoff ble påvist ved hjelp av geit anti-humant IgG (Fab')-pepperrotperoksidase. Absorpsjonen ble avlest ved 450 nm og 650 nm.

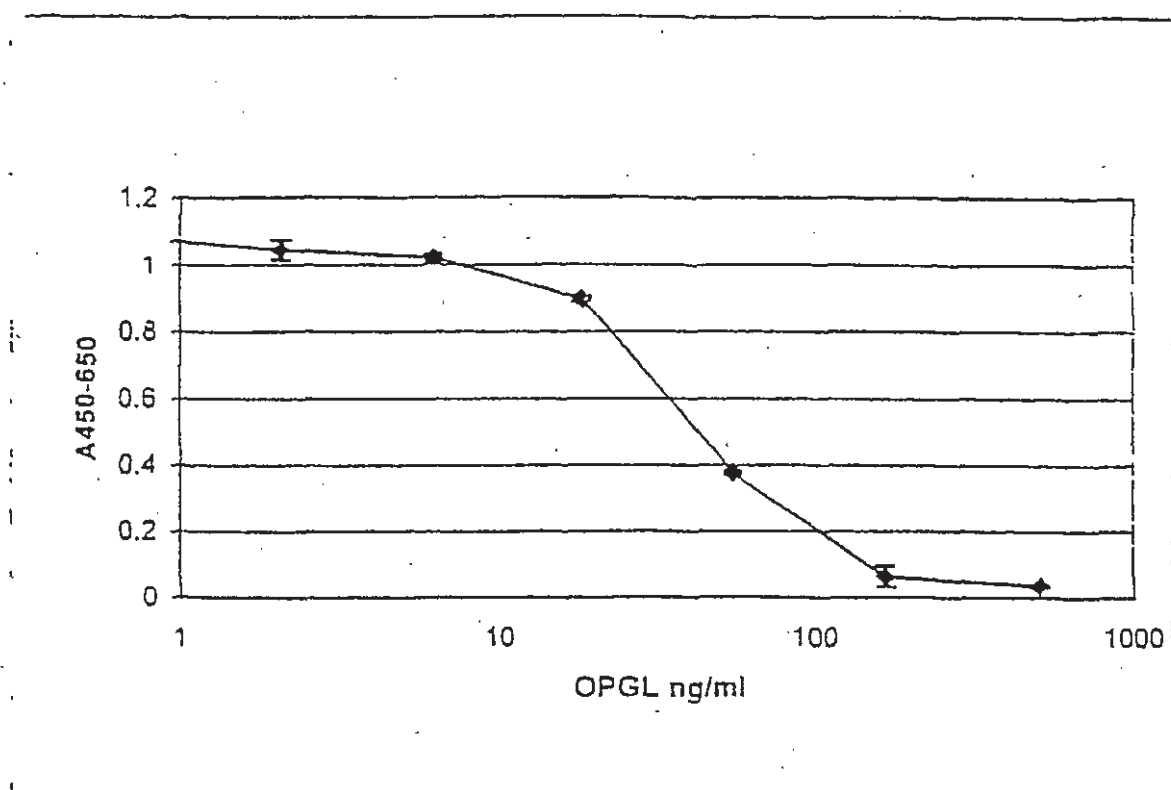
FIGUR 8

α OPGL-1 binder seg spesifikt til membranbundet OPGL



α OPGL-1 binder seg til OPGL uttrykt på en celleoverflate av transfekterte CHO REN 218-9-celler på en doseavhengig måte. Denne bindingen konkurrerer med eksogent tilsatt humant OPGL, men ikke med TNF- α , TNF- β , TRAIL eller CD40-ligand. α OPGL-1 (100 ng/ml) ble preinnkubert med varierende konsentrasjoner av løselig OPGL eller andre ligander og så innkubert med CHO REN 218-9-celler som uttrykte OPGL på overflaten. Cellene ble så innkubert i 30 minutter ved 2-8°C med FITC-merket F(ab')₂ geit antihumant IgG, Fcy fragmentspesifikk. Etter sentrifugering og vasking ble celleoverflatefluorescensen målt ved å bruke flowcytometri.

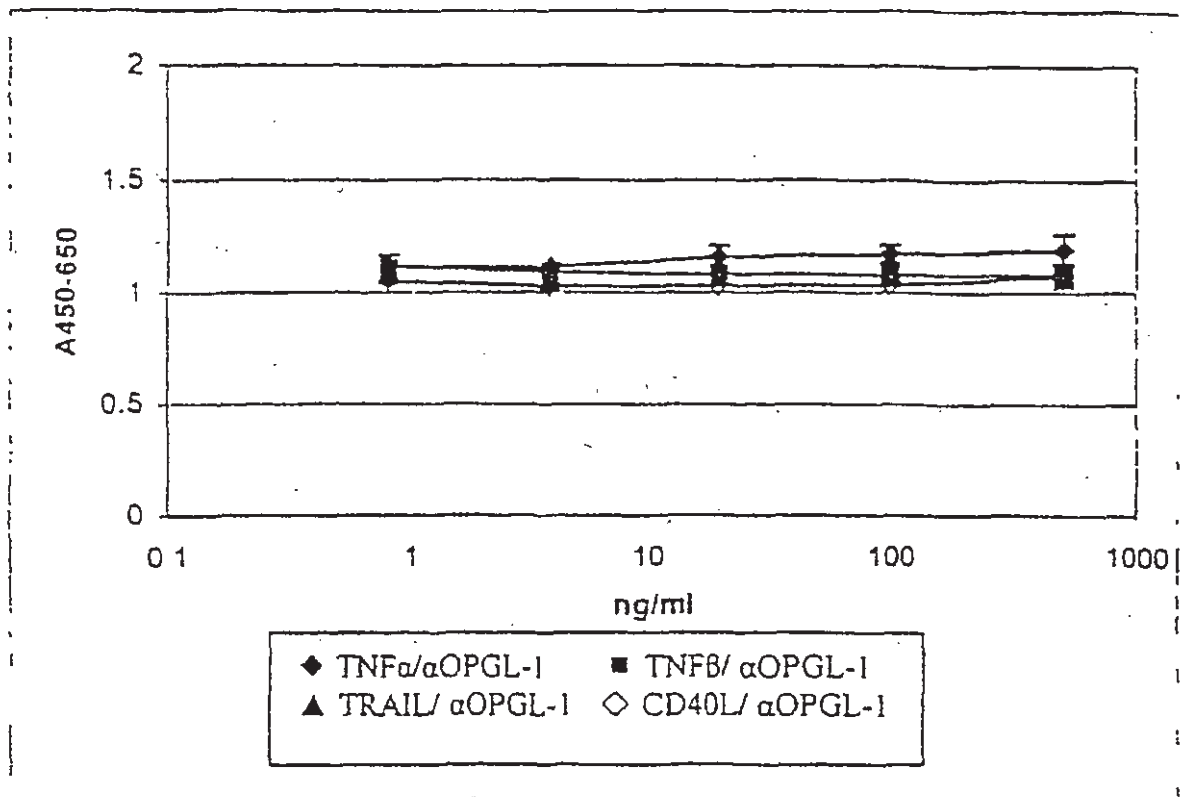
FIGUR 9

 α OPGL-1 binder seg til løselig OPGL

α OPGL-1-binding til OPGL på en EIA-plate blir redusert ved konkurranse med eksogent tilsatt løselig OPGL.

FIGUR 10

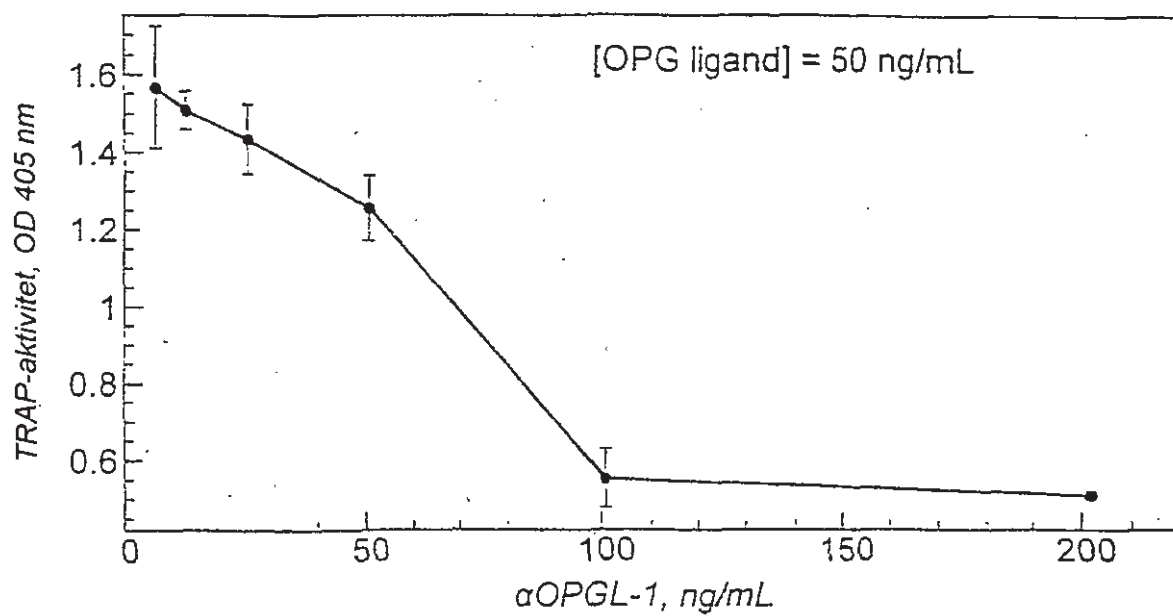
α OPGL-1 binder seg ikke til $\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\beta$, TRAIL eller CD40-ligand fra TNF-gruppen



α OPGL-1-binding til OPGL på en EIA-plate ble ikke redusert ved eksogent tilsatt $\text{TNF-}\alpha$, $\text{TNF-}\beta$, TRAIL eller CD40-ligand.

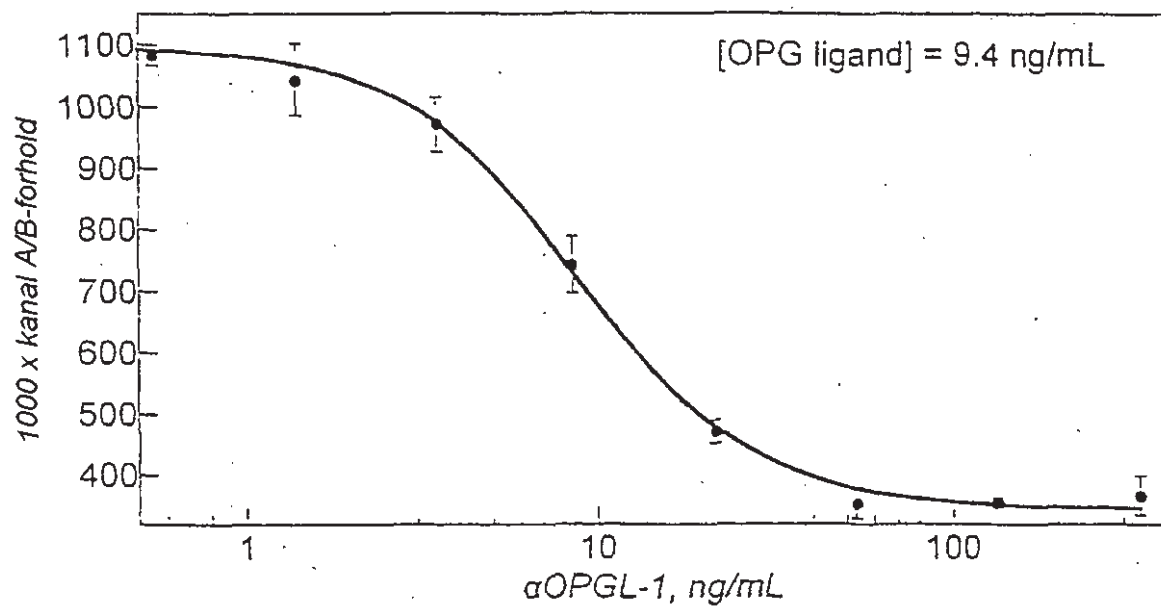
FIGUR 11

Doseavhengig inhibering ved hjelp av α OPGL-1 på OPG-ligandindusert TRAP-aktivitet
i RAW 264.7-celler



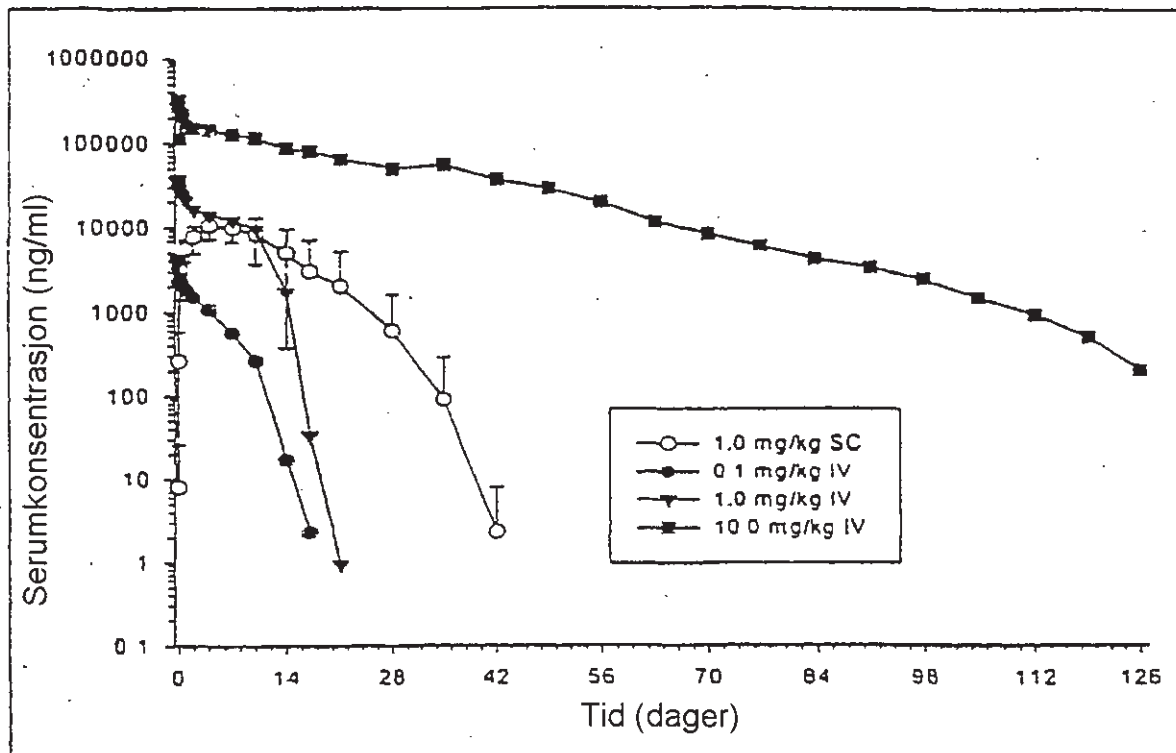
FIGUR 12

Doseavhengig inhibering av α OPGL-1 på europiummerket OPG-ligandbinding til
ODAR-FLAG/anti-FLAG-APC



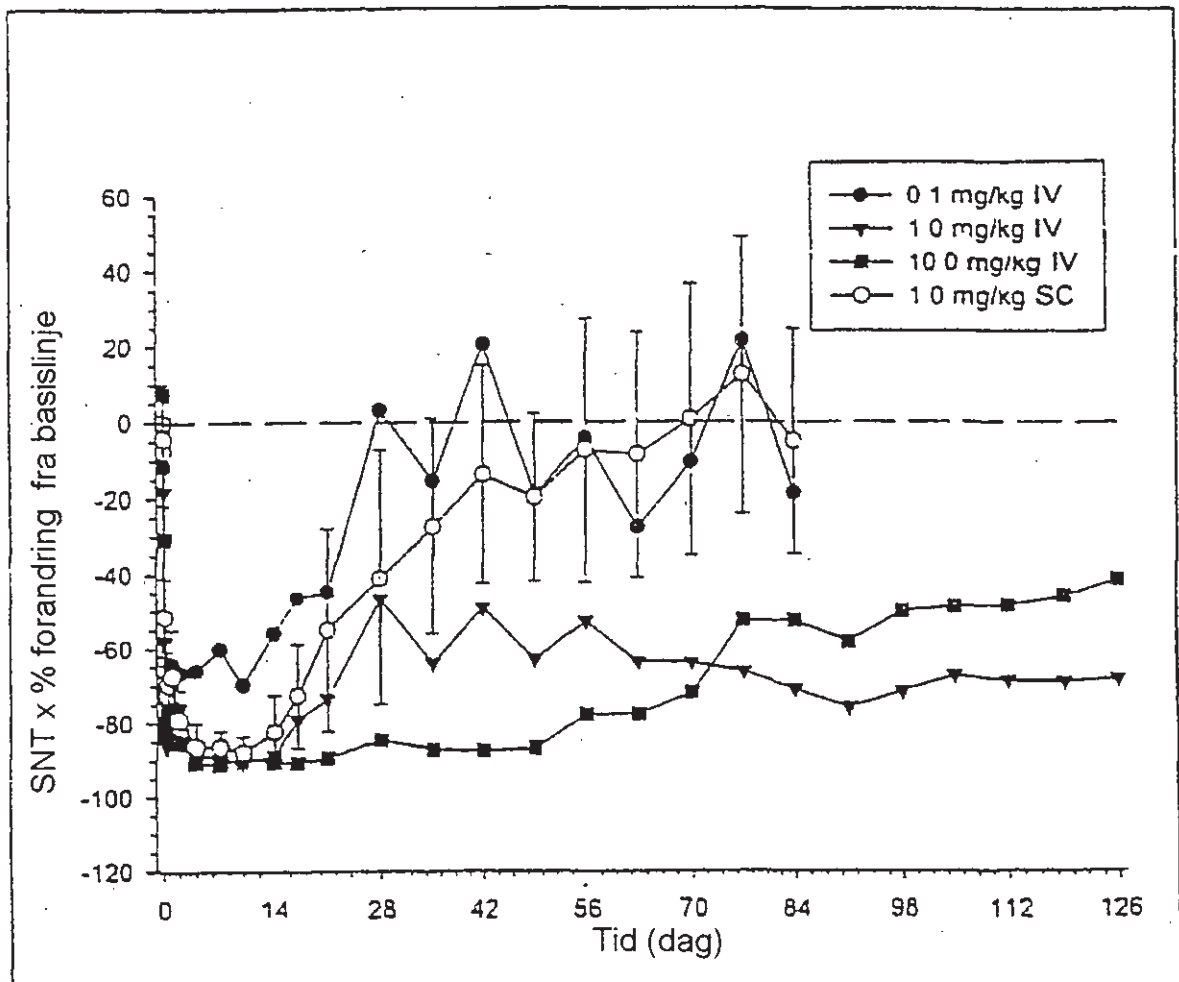
FIGUR 13

Midlere ($\pm$ SD) serumkonsentrasjonstidsprofiler etter enkeltdoseadministrering av α OPGL-1 til cynomolgusaper i doser på 0,1, 1 og 10,0 mg/kg IV (n = 2/dose) og 1,0 mg/kg SC (n = 6/dose)



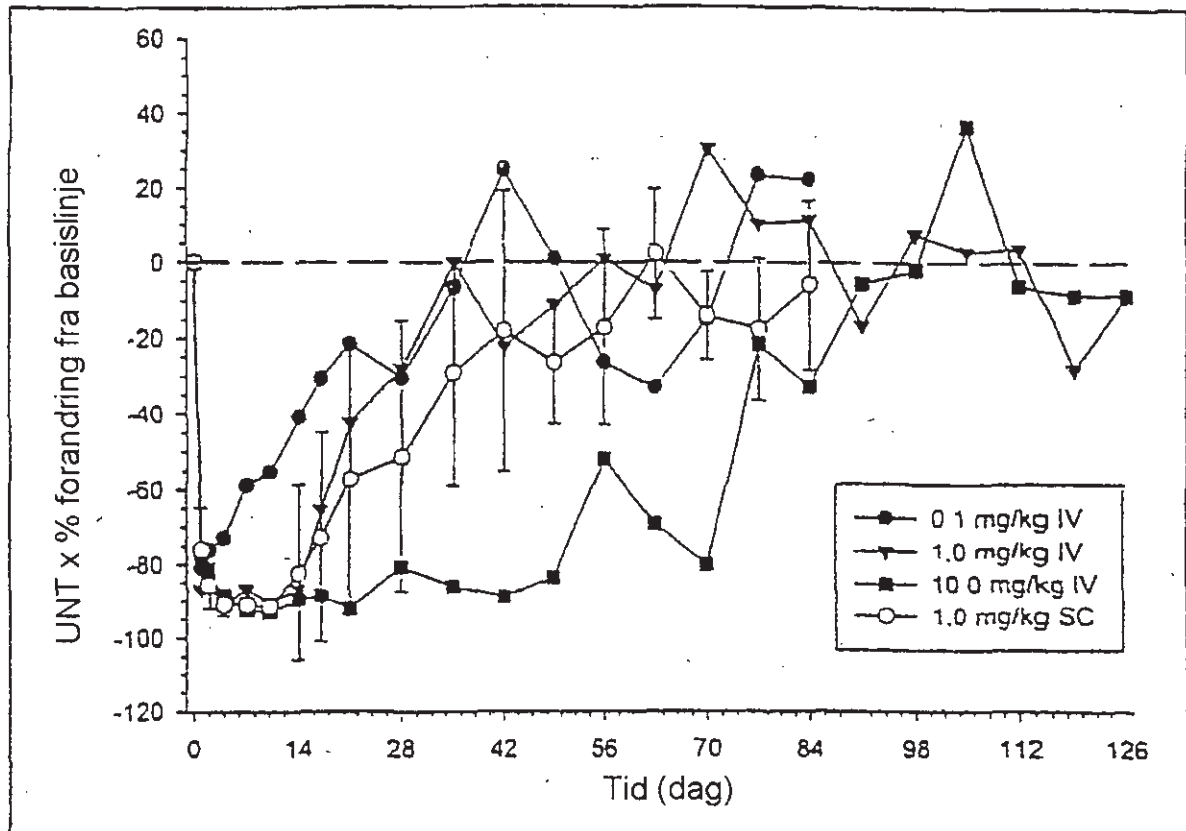
FIGUR 14

Midlere ($\pm$ SD) prosentvis forandring i serum N-Tx-konsentrasjon etter administrering av en enkelt dose av α OPGL-1 intravenøst ($n = 2/\text{dose}$) eller subkutan (n = 6) til cynomolgusaper i doser på 0,1, 1 og 10,0 mg/kg



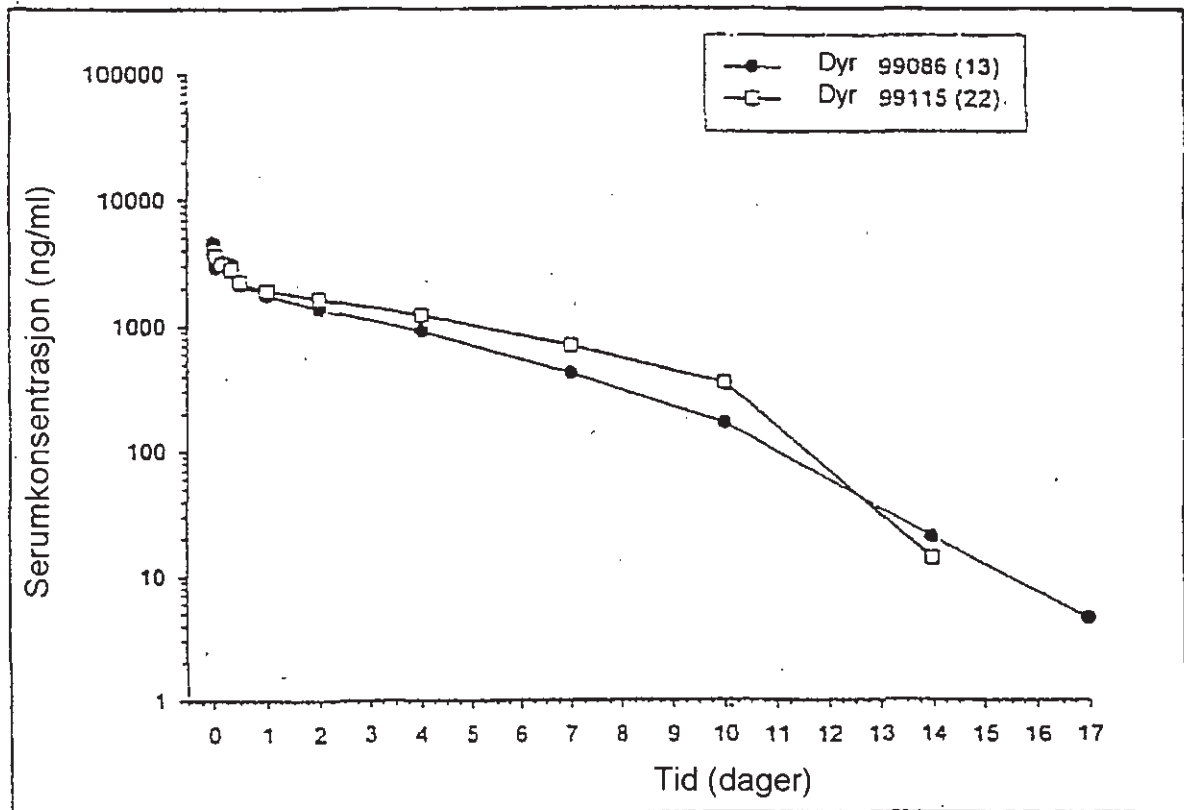
FIGUR 15

Midlere ($\pm$ SD) prosentvis forandring i urin N-Tx-konsentrasjon etter enkelt dose IV (n = 2/dose) eller SC (n = 6) administrering av α OPGL-1 til cynomolgusaper i doser på 0,1, 1 og 10,0 mg/kg



FIGUR 16

Antistoffpositive (åpne svarte symboler) og negative (lukkede røde symboler) for dyreserum konsentrasjonstidsprofiler etter administrering av en enkelt dose av α OPGL-1 IV til cynomolgusaper ved en dose på 0,1 mg/kg



FIGUR 17

Aminosyresekvensen for α OPGL-1 tungkjede variabelt område

1 EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA
41 PGKGLEWVSG ITGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY
81 LQMNSLRAED TAVYYCAKDP GTTVIMSWFD PWGQGTLVTV
121 SS (SEQ ID NO: 13)

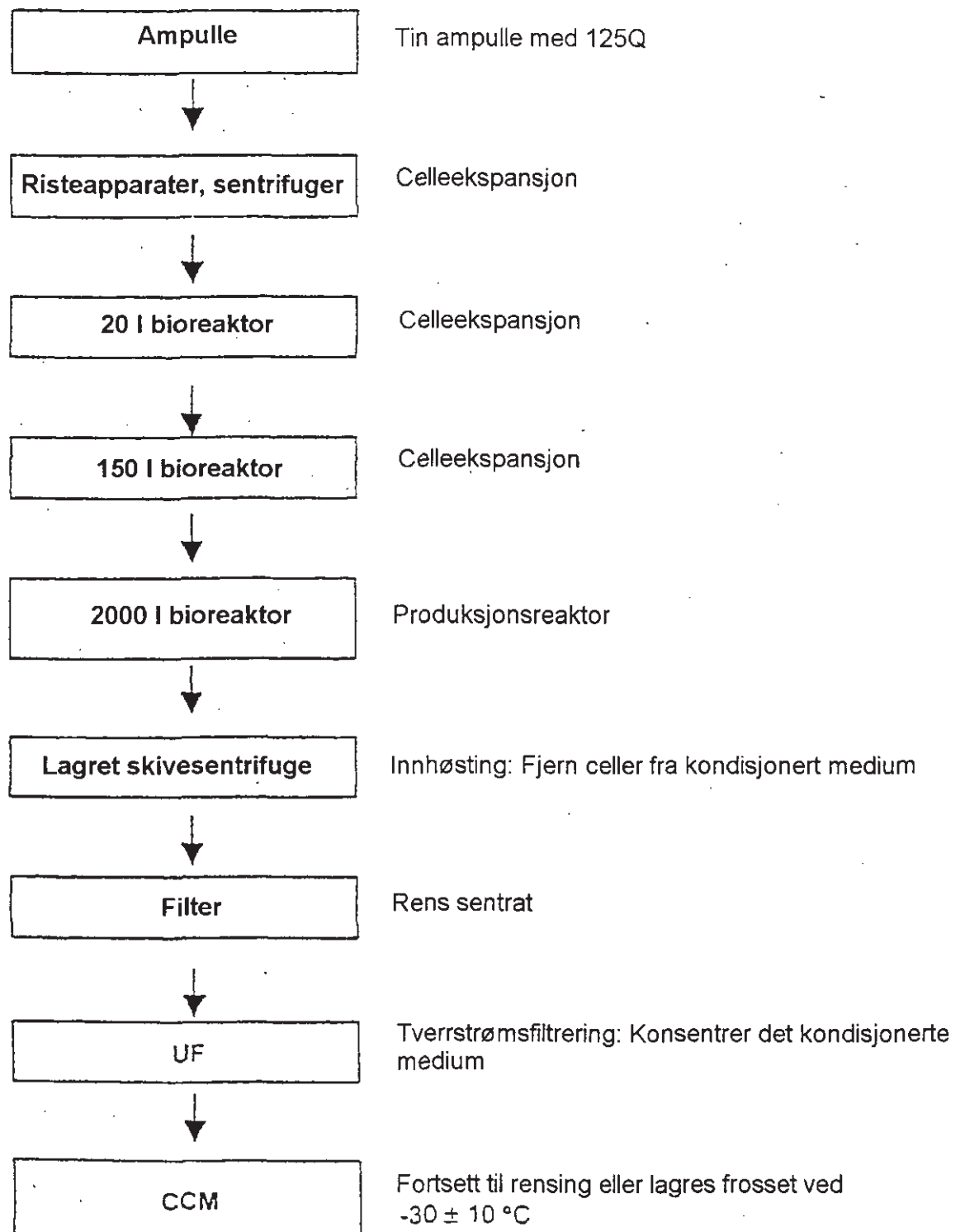
FIGUR 18

Aminosyresekvensen for α OPGL-1 lettkjede variabelt område

1 EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVR GRYLAWYQQK
41 PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE
81 PEDFAVFYCQ QYGSSPRTEG QGTKVEIK (SEQ ID NO: 14)

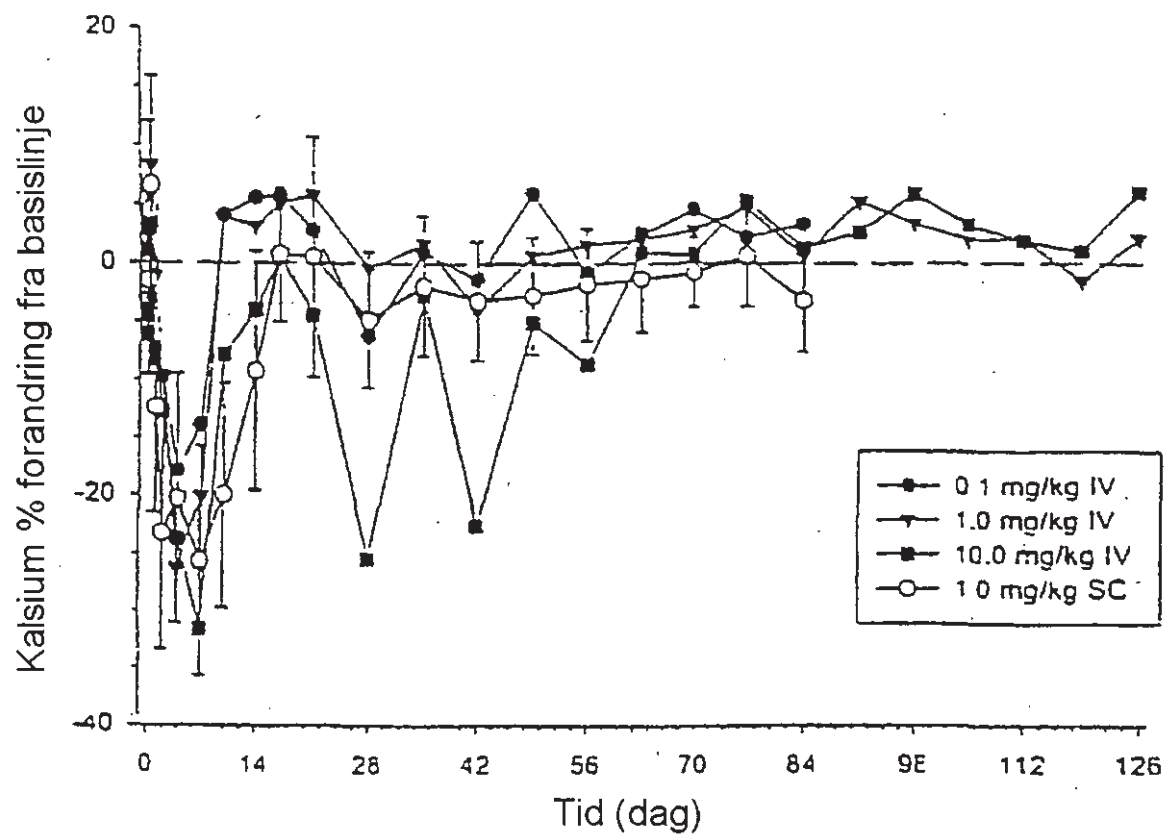
FIGUR 19

Flytskjema for celledyrkningsprosess



FIGUR 20

Midlere prosentvis forandring av serum kalsium fra basislinjeverdier etter administrering av en enkeltdose av α OPGL-1 til cynomolgusaper



FIGUR 21

Midlere prosentvis forandring av serum alkalisk fosfatase fra basislinjeverdier etter administrering av en enkeltdose av α OPGL-1 til cynomolgusaper

