



(12) **PATENT**

(11) **345566**

(13) **B1**

NORGE

(19) **NO**

(51) **Int Cl.**

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20200535	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.06.25 PCT/US2002/020181
(22)	Inng.dag	2020.05.06	(85)	Videreføringsdag	2020.05.06
(24)	Løpedag	2002.06.25	(30)	Prioritet	2001.06.26, US, 60/301,172
(41)	Alm.tilgj	2004.03.10			
(45)	Meddelt	2021.04.19			
(62)	Avdelt fra	20190456, 2019.04.04			
(73)	Innehaver	Amgen Inc., One Amgen Center Drive, CA91320 THOUSAND OAKS, USA			
(72)	Oppfinner	Amgen Fremont Inc., One Amgen Center Drive, CA91320-1799 THOUSAND OAKS, USA			
		Francis H Martin, 865 Ferhill Court, CA91320 NEWBURY PARK, USA			
		William J Boyle, 1910 Lauralwood 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, Vik, 0123 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	OPGL bindende antistoff, farmasøytisk sammensetning samt anvendelse derav			
(56)	Anførte publikasjoner				
		Tsukii K. et al., Osteoclast Differentiation Factor Mediates an Essential Signal for Bone Resorption Induced by 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D ₃ , Prostaglandin E ₂ , or Parathyroid Hormone in the Microenvironment of Bone, Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, Vol. 246 (2), p. 337-341			
		Nagai M. et al., Cancer Cells Responsible for Humoral Hypercalcemia Express mRNA Encoding a Secreted Form of ODF/TRANCE That Induces Osteoclast Formation, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, Vol. 269 (2), p. 532-536			
(57)	Sammendrag				

Det er beskrevet antistoffer som virker sammen med osteoprotegerinligand (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 induert 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.

Fra eksperimenter der rekombinant oppløselig OPGL (betegnet 'sODF') fremkalte benresorpsjon på en konsentrasjonsavhengig måte, konkluderte Tsukii et al. at OPGL (betegnet 'ODF') spiller en kritisk rolle i benresorpsjon i benmikromiljøet. Eksperimentene viste at OPGL-aktivitet kunne hemmes av enten osteoprotegerin ('OPG'; betegnet 'OCIF') eller et polyklonalt anti-ODF-antistoff, og at både OCIF og det polyklonale anti-ODF-antistoffet kunne blokkere benresorpsjon induert av hvilket som helst av 1α , 25-dihydroksyvitamin D₃, paratyroidhormon eller prostaglandin E₂ (Tsukii, K. et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, Vol. 246 (2), side 337-341).

Nagai et al. isolerte et nytt cDNA som koder for en utskilt, C-terminal form av OPLG (betegnet sODF / TRANCE) fra tre plateepitelcellekarsinom-cellelinjer der det parentale maligne vevet hadde forårsaket alvorlig humoral hyperkalsemi. Medium kondisjonert av disse kreftcellene inneholdt proteinet som reagerer med polyklonalt kaninantistoff spesifikt for det ekstracellulære domenet til humant ODF / TRANCE, og når det dyrkes i dette kondisjonerte mediet, differensierte HL60-celler (humane promyeloblastiske leukemiceller) seg til osteoklastlignende celler. Denne differensieringen ble hemmet av det polyklonale kaninantistoffet, noe som antyder at sODF / TRANCE spiller en viktig rolle i forbedret benresorpsjon ved

humoral malign hyperkalsemi. (Nagai M. et al., Cancer Cells Responsible for Humoral Hypercalcemia Express mRNA Encoding a Secreted Form of ODF/TRANCE That Induces Osteoclast Formation, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, Vol. 269 (2), p. 532-536). 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.

10 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 f r ca 40 rsalderen. Mellom 40- og 50 rsalderen vil

15 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

20 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

25  kende 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-, l r-, 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.

30 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

35 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  strogenreseptormodifiserende forbindelser (SERM) for å

40 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.

SAMMENDRAG AV OPPFINNELSEN

Oppfinnelsen er definert i kravene.

- 5 Visse utførelsesformer som er angitt og/eller krevd heri tilveiebringer 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 eller et fragment av denne, mens den lette kjeden omfatter en aminosyresekvens som angitt i SEKV.ID. NR. 4 eller fragment av denne.
- 10 Visse utførelsesformer som er angitt og/eller krevd heri tilveiebringer 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, og hvor den lette kjeden omfatter et variabelt område som omfatter en aminosyresekvens som angitt i SEKV.ID. NR. 14 eller et fragment av denne.
- 15 Visse utførelsesformer som er angitt og/eller krevd heri 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. 2 eller et fragment av denne.
- 20 Visse utførelsesformer som er angitt og/eller krevd heri tilveiebringer 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.
- 25 Visse utførelsesformer som er angitt og/eller krevd heri tilveiebringer 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.
- 30 Visse utførelsesformer som er angitt og/eller krevd heri tilveiebringer 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.
- 35 I visse utførelser tilveiebringer oppfinnelsen 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 aminosyresekvensen som er angitt i SEKV.ID. NR. 14, og (c) hvor antistoffet binder til en osteoprotegerinligand (OPGL). I visse slike

utførelsesformer binder antistoffet til OPLG og inhiberer binding av OPLG til en osteoklast differensiering- og aktiveringsreseptor (ODAR), der et overskudd av antistoffer reduserer bindingen med i det minste 20% som målt i en in vitro kompetitiv bindings analyse.

- 5 I visse slike utførelser omfatter det første variable området 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 aminosyresekvensen som angitt i SEKV.ID. NR. 14.
- 10 I visse slike utførelser omfatter det første variable området 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.
- 15 I visse utførelser av beskrivelsen tilveiebringes en tung kjede som omfatter en aminosyresekvens som angitt i SEKV.ID. NR. 2 eller et fragment av denne. I visse utførelser av beskrivelsen tilveiebringes 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.
- 20 I visse utførelser av beskrivelsen tilveiebringes en lett kjede som omfatter en aminosyresekvens som angitt i SEKV.ID. NR. 4 eller et fragment av denne. I visse utførelser av beskrivelsen tilveiebringes en lett kjede som omfatter en aminosyresekvens som angitt i SEKV.ID. NR. 14 eller et fragment av denne.
- 25 I enkelte utførelser som er angitt og/eller krevd heri er det tilveiebrakt enkeltkjedede antistoffer. I enkelte utførelser som er angitt og/eller krevd heri er det tilveiebrakt enkeltkjedede Fv-antistoffer. I enkelte utførelser som er angitt og/eller krevd heri er det tilveiebrakt Fab-antistoffer. I enkelte utførelser som er angitt og/eller krevd heri er det tilveiebrakt Fab'-antistoffer. I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri er det tilveiebrakt (Fab')₂-antistoffer.
- 30 I enkelte utførelser som er angitt og/eller krevd heri er det tilveiebrakt en farmasøytisk sammensetning som omfatter et antistoff angitt og/eller krevd heri . I visse utførelser er det tilveiebrakt en farmasøytisk sammensetning som omfatter et antistoff til OPGL som er angitt og/eller krevd heri .
- 35 I visse utførelser angitt og/eller krevd heri er det tilveiebrakt 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, anakinra, en TNF α -inhibitor, en løselig TNF α -reseptor, EnbrelTM, etanercept, et anti-TNF α -antistoff, RemicadeTM, infliximab, et D2E7-antistoff, et paratyroidhormon, en analog av et

- 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, celecoxib, VioxxTM, rofecoxib, et immunosuppressivt middel, metotreksat, leflunomid, en serinproteaseinhibitor, en sekretorisk leukocytproteaseinhibitor (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 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.
- 15 I visse aspekter av beskrivelsen er det tilveiebrakt en fremgangsmåte for å behandle en osteopenisk lidelse som omfatter en administrering av en farmasøytisk effektiv mengde av et antistoff. I visse aspekter av beskrivelsen er det tilveiebrakt en fremgangsmåte for å behandle en osteopenisk lidelse som omfatter en administrering av en farmasøytisk sammensetning.
- 20 I visse aspekter av beskrivelsen er det tilveiebrakt en fremgangsmåte for å behandle en inflammatorisk tilstand med medfølgende bentap hos en pasient, som omfatter en administrering av en farmasøytisk sammensetning.
- I visse aspekter av beskrivelsen er det tilveiebrakt en fremgangsmåte for å behandle en autoimmun tilstand med medfølgende bentap hos en pasient, som omfatter en administrering av en farmasøytisk sammensetning.
- 25 I visse aspekter av beskrivelsen er det tilveiebrakt en fremgangsmåte for å behandle en reumatisk artritt i en pasient, som omfatter en administrering av en farmasøytisk sammensetning.
- I visse aspekter av beskrivelsen er det tilveiebrakt en fremgangsmåte for å påvise nivået av OPGL i en biologisk prøve, som omfatter at prøven kontaktes et antistoff.
- 30

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).
- 35

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).

- 5 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.

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

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.

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

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.

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

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.

- 25 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),
- 5 eller sekvenser med delesjoner, adderinger og/eller substitusjoner av en eller flere aminosyrer i α OPGL-1. Visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri omfatter det humane tungkjede 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) eller fragmenter eller analoger av disse.
- 10 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 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.
- 15 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 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.
- 20 Begrepet "kontrollsekvens" slik det brukes her, refererer seg til polynukleotidsekvenser som kan utføre ekspresjonen og bearbeidingen av de kodende sekvensene til hvilke de er ligert. Typen av slike kontrollsekvenser kan være forskjellig avhengig av vertsorganismen. Kontrollsekvenser for prokaryoter innbefatte promotorer, ribosomale bindingssteder og
- 25 transkripsjonstermineringssekvenser, kontrollsekvenser for eukaryoter innbefatte promotorer og transkripsjonstermineringssekvenser, "kontrollsekvenser" innbefatte ledersekvenser og/eller fusjonspartnersekvenser.
- Begrepet "polynukleotid" slik det brukes her, betyr en polymer form av nukleotider med en lengde på minst 10 baser. I visse utførelser kan basene være ribonukleotider
- 30 eller deoksyribonukleotider eller en modifisert form av begge disse typer nukleotider. Begrepet innbefatter både enkelt- og dobbeltrådede 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
- 35 polynukleotidundersett som generelt omfatter en lengde på 200 baser eller færre. I visse aspekter av denne beskrivelsen har oligonukleotidene en lengde på fra 10 til 60 baser, eller oligonukleotidene har en lengde på 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 eller 20 til 40 baser. Oligonukleotidene kan være enkeltrådede eller dobbeltrådede, for

eksempel for anvendelse under konstruksjonen av en genmutant. Oligonukleotidene som er angitt heri 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 slektenskap 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 (aligning) 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. I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri vil følgelig den valgte parallellsammenligningsmetoden (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). I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri 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. I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri vil algoritmen 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.

I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri vil parametrene for en polypeptidsekvenssammenligning innbefatte følgende:

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

GAP-programmet kan brukes med de ovennevnte parametrene. I visse utførelser vil de forannevnte parametrene 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 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 som er angitt og/eller krevd heri. Eksempler på uvanlige aminosyrer innbefatter: 4-hydroksyprolin, γ -karboksyglutamat, ϵ -N,N,N-trimetyllysin, ϵ -N-acetyllysin, O-fosfoserin, N-acetylserin, N-formylmetionin, 3-metylhistidin, 5-hydroksylysin, 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 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 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".

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;
- 3) sure: Asp, Glu;
- 4) basiske: His, Lys, Arg;
- 5) residua som påvirker kildeorientering: Gly, Pro; og
- 6) aromatiske: Trp, Tyr, Phe.

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.

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:

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

10

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 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 i visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri en substitusjon av aminosyrer hvis hydropatiske indekser er innenfor ± 2 . I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri inngår de som ligger innenfor ± 1 , og i visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri inngår de som ligger innenfor $\pm 0,5$.

15

Det er også underforstått at substitusjonen av like aminosyrer effektivt kan utføres 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. I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri vil et proteins største lokale midlere hydrofilisitet, slik denne styres av hydrofilisiteten til de tilstøtende aminosyrene, være korrelert med dets immunogenitet og antigenitet, det vil si en biologisk egenskap for proteinet.

20

25

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 visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri en substitusjon av aminosyrer hvis hydrofilisitetsverdier ligger innenfor ± 2 , i visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri inngår de som ligger innenfor ± 1 og i visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri inngår de som 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".

30

35

Eksempler på aminosyresubstitusjoner er gitt i tabell 1.

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-diamino-smørsyre, 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 som er angitt og/eller krevd heri er det mulig å identifisere egnede områder av molekylet som kan forandres uten derved å ødelegge aktiviteten ved å gjøre dette i områder som ikke anses å være viktige for aktivitet. I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri er det mulig å identifisere residua eller deler av molekylet som er konserverte blant like polypeptider. I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri kan selv områder som er viktige for biologisk aktivitet eller struktur underkastes konservative aminosyresubstitusjoner uten 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 tilsvarer aminosyregrupper eller residua som er 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 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 forutberegnet til å befinne seg på overflaten av proteinet, ettersom slike residua eller grupper kan inngå i viktige interaksjoner med andre molekyler. Videre er det 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 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 Moulton 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)).

I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri vil antistoffvarianter inkludere glykosyleringsvarianter hvor antallet og/eller typen av glykosylerings seter er blitt endret sammenlignet med aminosyresekvensen i det opprinnelige polypeptidet. I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri vil proteinvarianter omfatte et større eller mindre antall av N-koblede eller -forbundne glykosylerings seter enn i det opprinnelige proteinet. Et N-koblet glykosylerings sete 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 glykosylerings seter (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.

Ifølge visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri vil aminosyresubstitusjoner 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. Ifølge visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, så kan enkle eller multiple aminosyresubstitusjoner (i visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, også konservative aminosyresubstitusjoner) utføres i den naturlige forekommende sekvensen (i visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, i den delen av polypeptidet som ligger utenfor det eller de domener som danner de intermolekulære kontaktene). I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, så vil en konservativ aminosyresubstitusjon 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. I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri har fragmentene en lengde på minst fra 5 til 467 aminosyrer. Det er underforstått at i visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri 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 i visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri brukes for å utvikle mer stabile peptider. Videre kan begrensede peptider som omfatter en konsensussekvens eller en i alt

5 vesentlig identisk konsensussekvensvariasjon utvikles ved hjelp av kjente fremgangsmåter (Rizo og Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61: 387 (1992)), ved for eksempel å addere indre cysteingroupper som er i stand til å danne intramolekylære disulfidbroer som sykliserer peptidet.

"Antistoff" eller "antistoffpeptid(er)" refererer seg til et intakt antistoff, eller et

10 bindende fragment av dette som konkurrerer med det intakte antistoffet for spesifikk binding. I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri er bindende fragmenter fremstilt ved hjelp av rekombinante DNA-teknikker. I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri er de bindende fragmentene fremstilt ved enzymatisk eller kjemisk spalting av intakte antistoffer. Bindende fragmenter innbefatter, men er

15 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

20 tre konstante områdedomener C_{H1}, C_{H2} og C_{H3}. V_H-domenet er aminotermus for polypeptidet, mens C_{H3}-domenet er ved karboksyterminus. 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 aminotermus i polypeptidet. Begrepet "lett

25 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

30 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 i visse utførelser å forstå å ha hvert av sine bindings seter 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).

- 5 Begrepet "epitop" innbefatter enhver polypeptiddeterminant som er i stand til spesifikt å binde seg til et immunoglobulin eller en T-cellereseptor. I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri vil epitopdeterminanter innbefatte kjemisk aktive overflategrupper på molekyler så som aminosyrer, sukkersidekjeder, fosforyl eller sulfonyl, og kan ha spesifikke tredimensjonale strukturelle egenskaper
- 10 og/eller spesifikke ladningsegenskaper. En epitop er et område av et antigen som er bundet ved hjelp av et antistoff. I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri er det 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. I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri vil et antistoff
- 15 bli angitt å spesifikt binde seg til et antigen når dissosiasjonskonstanten er $\leq 1 \mu\text{M}$, i visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri når dissosiasjonskonstanten er $\leq 100 \text{ nM}$, og i visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri når dissosiasjonskonstanten er $\leq 10 \text{ nM}$.

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

- 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
- 25 eksempel streptavidin som inneholder en fluorescerende markør eller enzymatisk aktivitet som kan påvises ved hjelp av optiske eller kolorimetriske metoder). I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri kan markøren også være terapeutisk. Det er kjent mange forskjellige fremgangsmåter for merking av polypeptider og glykoproteiner. Eksempler på markører for polypeptider innbefatter, men er ikke
- 30 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, lantanidfosfor), enzymatiske markører (for eksempel pepperrotperoksidase, β -galaktosidase, luciferase, alkalisk fosfatase), kjemiluminescerende forbindelser eller grupper, biotinyllgrupper, forutbestemte
- 35 polypeptidepitoper som gjenkjenner en sekundær reporter (for eksempel leukin glidelås ("zipper") parsekvenser, bindende seter for sekundære antistoffer, metallbindende domener, epitoptagger). I visse utførelser er markørene 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, mus, aper, rotter, kaniner og andre dyr. Slike stoffer innbefatter, men er ikke
 5 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, periodonitt, reumatisk artritt og bentap som skyldes immobilisering. I tillegg til disse bensykdommene og lidelsene,
 10 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 overekspresjon av OPGL i benet, noe som fører til økt antall osteoklaster og økt aktivitet.

Begrepet "farmasøytisk middel eller medikament" slik det brukes her, refererer seg
 15 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
 20 sammenlignet med størrelsen på aktiviteten eller funksjonen som ble observert i fravær av modulatorene. I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri er en modulator en inhibitor som nedsetter størrelsen på minst én aktivitet eller funksjon for et molekyl. Visse eksempler på aktiviteter og funksjoner for molekyler
 25 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
 30 tilstedeværende forbindelsen (for eksempel på en molar basis er mer vanlig eller forekommende enn eventuelle andre individuelle forbindelser i sammensetningen). I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri vil en i alt vesentlig renset fraksjon være en sammensetning hvor den forønskede forbindelsen omfatter minst 50 prosent (på molar basis) av alle de tilstedeværende makromolekylene. I visse utførelser som
 35 er angitt og/eller krevd heri vil en i alt vesentlig ren sammensetning omfatte mer enn 80%, 85%, 90%, 95% eller 99% av alle makromolekylene som er tilstede i sammensetningen. I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri vil den forønskede forbindelsen bli renset 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.

5 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
10 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-
15 aktiviteten vil derfor kunne resultere i nedsatt osteoklastaktivitet og kan derved redusere graden av osteopene lidelser. Ifølge visse utførelser av oppfinnelsen kan antistoffer som er rettet inn mot OPGL brukes for å behandle osteopene lidelser inklusive, men ikke begrenset til, de som er nevnt ovenfor.

I visse utførelser av den foreliggende oppfinnelsen er det tilveiebrakt et helt humant
20 monoklonalt antistoff mot human osteoprotegerinligand (OPGL). Visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri omfatter nukleotidsekvenser som koder det nevnte antistoffet foruten aminosyresekvenser som omfatter tung- og lett kjedede immunoglobulinmolekyler, da spesielt sekvenser som tilsvarer de variable områdene. Visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri omfatter sekvenser som
25 tilsvarer de komplementært bestemmende områdene (CDR), spesifikt fra CDR1 til og med CDR3. I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri blir det også tilveiebrakt en hybridomcellelinje som uttrykker et slikt immunoglobulinmolekyl og monoklonalt antistoff. I visse utførelser blir det videre tilveiebrakt et rensset humant monoklonalt antistoff mot humant OPGL.

30 Evnen til å klonere og rekonstruere megabase store humane loki i gjør kunstige kromosomer (YAC) og føre disse inn i musegermlinjen, gir en fremgangsmåte for å 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
35 ekvivalenter, kunne gi enestående innsyn eller innblikk i ekspresjonen og reguleringen av humane genprodukter under utvikling, deres kommunikasjon med 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 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). I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri er det 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 administrerte antistoffene. Visse utførelser angitt og/eller krevd heri er hele humane antistoffer for anvendelse i 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 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 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.

I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri er det 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. Hver slik tetramer er typisk sammensatt av to identiske par av polypeptidkjeder, og hvor hvert par har en fullengde "lett" (i visse utførelser ca 25 kDa) og en fullengde "tung" kjede (i visse utførelser 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 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 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 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 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, 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 bindingssteder.
- 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
- Visse antistoffer som spesifikt binder seg til OPGL inngår i oppfinnelsen. I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri kan antistoffene fremstilles ved en immunisering av fullengde OPGL, løselige former av OPGL, eller et fragment av disse. I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri kan antistoffene være polyklonale eller monoklonale og/eller de kan være rekombinante antistoffer. I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri vil antistoffene være humane antistoffer, fremstilt for eksempel ved å immunisere transgene dyr som er i stand til å fremstille humane antistoffer (se for eksempel PCT publisert søknad nr. WO 93/12227).

- I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri kan de komplementære bestemmende områdene (CDR) 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. I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri kan nevnte CDR i de variable områdene i de lette og tunge kjedene i α OPGL-1 podes til konsensus humane FR.
- 5 For å skape slike, så kan FR i visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri, fra flere tungkjedede eller lettkjedede aminosyresekvenser, bli parallellsammenlignet (aligned) for å identifisere en konsensussekvens. I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri vil nevnte FR i de α OPGL-1 tunge og lette kjedene bli erstattet med FR fra en annen tung kjede eller lett kjede. I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri vil sjeldne aminosyrer i FR i de tunge og lette kjedene i α OPGL-1 ikke bli erstattet, mens resten av FR-aminosyrene blir erstattet. Sjeldne aminosyrer er spesifikke aminosyrer som er i posisjoner hvor de vanligvis ikke finnes i rammeverksområdene. I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri kan de podede variable områdene fra α OPGL-1 brukes sammen med et konstant område som er forskjellig fra det konstante området i α OPGL-1. I enkelte utførelser som er angitt og/eller krevd heri er de podede variable områdene 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
- 15
- 20 Ifølge visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan antistoffer som er angitt og/eller krevd heri 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
- 25 antistoffer og har 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. I visse utførelser som er angitt og/eller krevd heri kan man 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).
- 30
- Ifølge visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan helt humane monoklonale antistoffer som er spesifikke for OPGL 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 fusjonert med en
- 35 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. I visse utførelser av beskrivelsen er det derfor tilveiebrakt en produksjon av en hybridomcellelinje som fremstiller antistoffer som er spesifikke for OPGL.
- 40

- I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, blir antistoffene fremstilt ved hjelp av hybridomlinjene AMG 6.1, AMG 6.4, AMG 6.5, AMG 7.1 og AMG 7.2. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, blir antistoffene fremstilt ved hjelp av hybridomlinjene AMG 6.1, AMG 6.4 og AMG 6.5. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil antistoffene binde seg til OPGL med en dissosiasjonskonstant (K_d) som ligger omtrent mellom 0,23 og 0,29 nM. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil antistoffene binde seg til OPGL med en K_d på mindre enn 0,23 nM.
- I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er antistoffene av IgG2-isotypen. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil antistoffene omfatte en human kappa lett kjede og en human IgG2 tung kjede. I visse utførelser vil antistoffene, som er angitt og/eller krevd heri, være klonet for ekspresjon i pattedyrceller. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil de variable områdene i antistoffene være ligert til et konstant område som er forskjellig fra det konstante området i IgG2-isotypen.
- I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil konservative modifikasjoner i de tunge og lette kjedene i α OPGL-1 (og 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 effekt ved å opprettholde (a) strukturen på den molekulære 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 av en opprinnelig og naturlige 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".
- Ønskelige aminosyresubstitusjoner (enten disse er konservative eller ikke-konservative) kan lett bestemmes av innsiktsfulle fagpersoner på det tidspunktet hvor slike substitusjoner er ønskelige. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan aminosyresubstitusjoner 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.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan antistoffene uttrykkes i cellelinjer som er forskjellige fra hybridomcellelinjer. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil sekvenser som koder spesielle antistoffer brukes for å transformere en egnet pattedyrvertscelle. Ifølge visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan transformasjonen utføres ved enhver kjent fremgangsmåte for å føre polynukleotider inn i en vertscelle, for eksempel ved å pakke 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. I visse utførelser vil den transformasjonsmetoden som brukes være avhengig av den vert som skal transformeres. Fremgangsmåter for å innføre heterologe polynukleotider i pattedyrceller er velkjente innenfor bioteknologien og innbefatter, men er ikke begrenset til, deksranmediert transfeksjon, kalsiumfosfatutfelling, polybrenmediert transfeksjon, protoplastfusjon, elektroporering, innkapsling av polynukleotider i liposomer og direkte mikroinjeksjon av DNA i kjerner.

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, apenyreceller (COS), humane hepatocellulære karsinomceller (for eksempel Hep G2) og et antall andre lignende cellelinjer. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan cellelinjene velges ut ved å bestemme hvilken cellelinje som har de høyeste ekspresjonsnivåene og produserer antistoffer med konstitutive OPGL-bindende egenskaper.

Antistoffer ifølge visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil kunne brukes for å påvise OPGL i biologiske prøver. Dette muliggjør identifikasjonen av celler eller vev som produserer proteinet. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil antistoffer som binder seg til OPGL og blokkerer interaksjon med andre bindende forbindelser ha terapeutisk anvendelse for å modulere osteoklastdifferensiering og benresorpsjon. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil antistoffer til OPGL kunne blokkere OPGL-binding til ODAR, og dette vil kunne resultere i en blokkering av signaloverføringskaskaden og tap av 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.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er ett antistoff til OPGL for anvendelse i behandling av en benlidelse som omfatter å administrere en terapeutisk effektiv mengde av antistoffet til OPGL tilveiebrakt. I visse utførelser, som er angitt

og/eller krevd heri, er et antistoff til OPGL for anvendelse i behandling av en benlidelse som omfatter å administrere en terapeutisk effektiv mengde av antistoffet til OPGL og et annet terapeutisk middel tilveiebrakt. I visse slike utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil det ytterligere terapeutiske middelet bli administrert i en terapeutisk effektiv mengde. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er benlidelsen en lidelse som er karakterisert ved et netto bentap og innbefatter, men er ikke begrenset til, osteopeni og osteolyse. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, nedsetter eller undertrykker et antistoff til OPGL for anvendelse i behandling av en benlidelse benresorpsjonshastigheten. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan derfor behandlingen redusere hastigheten av benresorpsjon når denne hastigheten ligger over den normale, eller redusere benresorpsjonen til nivåer under det normale for å kompensere for tidligere lave nivåer med hensyn til bendannelse. Antistoffer, som er angitt og/eller krevd heri, kan 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 med antistoffene for anvendelse i behandling ifølge visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, innbefatter, men er ikke begrenset til, de følgende:

- 20 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;
- 25 Pagets sykdom i ben (osteititt deformans) hos voksne og unge personer;
- Osteomyelitt, det vil si et infeksjonssår i ben som fører til bentap;
- 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;
- 30
- 35 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;

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.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan et antistoff til OPGL alene eller sammen med minst ett ytterligere terapeutisk middel anvendes for behandling av benlidelser. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, anvendes et antistoff til OPGL i behandling 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; anakinra, TNF α -inhibitorer som innbefatter, men som ikke er begrenset til, løselige TNF α -reseptorer, EnbrelTM, etanercept, anti-TNF α -antistoffer, RemicadeTM, infliximab, 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 begrenset til, COX-2-inhibitorer så som CelebrexTM, celecoxib, og VioxxTM; rofecoxib, 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 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) 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.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan et antistoff til OPGL for anvendelse sammen med forskjellige terapeutiske midler for behandling av forskjellige inflammatoriske tilstander, autoimmune tilstander eller andre tilstander med et medfølgende bentap. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, på
 5 bakgrunn av tilstanden og det forønskede behandlingsnivået, kan to eller tre eller flere midler administreres. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan slike midler tilveiebringes ved at de inkluderes i det samme preparatet eller sammensetningen. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil slike midler og et antistoff til OPGL bli tilveiebrakt for sammensetning i det samme preparatet. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan slike midler
 10 tilveiebringes ved at de inkluderes i et behandlingssett. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil slike midler og et antistoff til OPGL kunne tilveiebringes sammen for sammensetning i et behandlingssett. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan slike midler tilveiebringes separat. I visse
 15 utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, når de administreres ved genterapi, så kan gener som koder for proteinmidler og/eller et antistoff til OPGL inkluderes i den samme vektoren. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan de gener som koder proteinmidler og/eller et antistoff til OPGL være under kontroll av det samme promotorområdet. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil
 20 de genene som koder proteinmidler og/eller et antistoff til OPGL være i separate vektorer.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er et antistoff til OPGL for anvendelse i terapi i kombinasjon med minst én interleukin-1 (IL-1). I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil en terapi omfatte et antistoff til
 25 OPGL, som er angitt og/eller krevd heri, og en IL-1-inhibitor og minst ett ytterligere molekyl som beskrevet her. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er et antistoff til OPGL, som er angitt og/eller krevd heri, for anvendelse i terapi i kombinasjon med IL-1-inhibitorer og/eller TNF- α -inhibitorer. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil et antistoff til OPGL i kombinasjon
 30 med IL-1-inhibitorer og/eller TNF- α -inhibitorer for behandling av tilstander så som astma, reumatisk artritt og 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
 35 fremstilt i to former: IL-1 alfa (IL-1 α) og IL-1 beta (IL-1 β).

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
 40 av IL-1 i kultur. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil slike

interleukin-1-medierte sykdommer også kunne 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 induisert i eksperimentelle dyremodeller av sykdommen eller den medisinske tilstanden kan hemmes eller fjernes ved behandling av midler som hemmer virkningen av IL-1. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil en eller flere av de ovennevnte tilstandene opptre i en IL-1-mediert sykdom. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil alle tre tilstandene 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 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 (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; 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 hjerneskade som et resultat av for eksempel traume, epilepsi, blødninger eller slag som alle kan føre til nevrodegenerering); Kawasaki sykdom; læringsproblemer; lungesykdommer (som inkluderer, men ikke er begrenset til, akutt respiratorisk stressyndrom eller ARDS); multippel sklerose; myopatii (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 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, infeksjon eller andre sykdomsprosesser.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan en IL-1-inhibitor 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 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, anakinra, 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 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 (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. 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. 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; 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. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan en IL-1-

reseptorantagonist være glykosylert. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil en IL-1-reseptorantagonist være ikke-glykosylert.

- 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 molekyl 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-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 inhibitorer, fremgangsmåter for kloning av disse genene i egnede vektorer foruten en transformering og transfektering av disse genene inn i visse celletyper, og ekspresjon av disse genene for fremstilling av inhibitorer.
- I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan det utføres delesjoner, innsetninger og/eller substitusjoner (individuellt eller samlet betegnet som "variant(er)") i aminosyresekvensene i IL-1ra. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil en IL-1ra-variant være biologisk aktiv (det vil si ha evnen til å hemme IL-1).
- I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er et antistoff til OPGL for anvendelse i terapi i kombinasjon med minst én TNF α -inhibitor tilveiebrakt. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil en terapi omfatte et antistoff til OPGL og en TNF α -inhibitor og minst ett ytterligere molekyl som beskrevet her.
- Visse sykdommer og medisinske tilstander er kontrollert eller medierte av TNF og kan kategoriseres som inflammatoriske tilstander. Slik begrepet brukes her, innbefatter en "TNF-medierte 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 kan være en TNF-medierte sykdom hvis (1) patologiske observasjoner assosiert med sykdommen eller den medisinske 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.
- 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 arterie bypass transplanteringer; depresjon; diabetes som innbefatter, men som ikke er begrenset til, ungdoms type 1 diabetes, diabetes mellitus og insulinresistens (som
 5 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 tarmsykdommer som inkluderer, men ikke er begrenset til, Crohns sykdom og Clostridium difficile-assosierte diaré; ischemi som innbefatter, men ikke er
 10 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 stressyndrom, astma og lungefibrose; multippel sklerose; nevroinflammatoriske sykdommer; øyesykdommer og tilstander som innbefatter, men ikke er begrenset til,
 15 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-bakteriell prostatitt og relaterte tilstander; psoriasis og relaterte tilstander; lungefibrose; reperfusjonsskade; reumatiske sykdommer som innbefatter, men som
 20 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, enteropatisk artritt, polymyositt, dermatomyositt, skleroderma, systemisk sklerose, vaskulitt (for eksempel Kawasakis sykdom), cerebral vaskulitt, Lymes sykdom,
 25 stafylokokkindusert ("septisk") artritt, Sjögrens syndrom, reumatisk feber, polykondritt og polymyalgi reumatika og gigantcelleartritt); septisk sjokk; sideeffekter av strålingsterapi; systemisk lupus erytematose (SLE); temporal mandibular leddsykdom; tyroiditt; og vevstransplantering og/eller en
 30 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.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan TNF-inhibitorene 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-
 35 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; etanercept, antistoffer til TNF som inkluderer, men ikke er
 40 begrenset til, RemicadeTM, infliximab, 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; 5830742; 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 transfektare 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 konservert 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 konservert (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). I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil de 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 karboksylgruppe av Cys¹⁰³, eller en eller flere karboksylterminale aminosyreresidua valgt fra Phe¹⁰⁴ til Leu¹¹⁰.

Eksempler på trunkerte sTNFR-I ifølge den foreliggende oppfinnelsen 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.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er et antistoff til OPGL for anvendelse i terapi i kombinasjon med minst én serinproteaseinhibitor. I visse

10 utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er et antistoff til OPGL for anvendelse i kombinasjon med 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

15 brukbare. Infiserende midler kan innføre ytterligere proteolytiske enzymer i organismen. Proteaseinhibitorer kan regulere både endogene og invaderende proteolytiske enzymer.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil naturlig forekommende proteaseinhibitorer tjene til å kontrollere endogene proteaser ved å begrense deres

20 reaksjoner lokalt og temporært. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil proteaseinhibitorer kunne hemme proteaser som er ført inn i kroppen av infiserende organismer. I 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

25 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-trypsin-inhibitor (I-alfa-I).

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 Human Polymorphonuclear Leucocytes, Havemann et al. (red), Urban and
25 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. I visse utførelser vil kathepsin G 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.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er det antatt at substratspesifisiteten 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. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil et enzym i denne gruppen eller klassen kunne hemme hver eneste serinprotease.

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), bronkieslimhinneinhibitor (BMI) og cervical slimhinneinhibitor (CUSHI). I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan en serinproteaseinhibitor også være en LPS-modulator. Se for eksempel Jin et al. (1997), Cell 88(3): 417-26. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er disse molekylerne 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 som er beskrevet i de forannevnte referanser så vel som eventuelle varianter eller analoger av disse, er kollektivt betegnet "serinproteaseinhibitorer".

IL-18 er et pro-inflammatorisk cytokin som har vist seg å indusere interferon- γ og som tidligere ble betegnet interferon gamma-induserende faktor (IGIF). I visse 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 levertoksite. Se for eksempel Faggioni et al. (2000), PNAS 97: 2367-72.

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 av komplekset av IL-18, IL-18R og IL-18RAcP. En naturlig inhibitor for IL-18 er IL-18bp. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil IL-18bp virke som en "avledende reseptor" ved å binde seg til IL-18-molekyler og derved hindre interaksjonen med IL-18R.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er et antistoff til OPGL for anvendelse i terapi i kombinasjon med minst én IL-18-inhibitor tilveiebrakt. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er et antistoff til OPGL for anvendelse i terapi i kombinasjon med en IL-18-inhibitor og minst ett ytterligere molekyl som
5 beskrevet her tilveiebrakt. Eksempler på tilstander som kan behandles ifølge visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, 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 ifølge visse utførelser, som er angitt og/eller
10 krevd heri, 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
15 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
20 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
25 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
30 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.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er et antistoff til OPGL for
35 anvendelse i terapi i kombinasjon med minst ett terapeutisk middel for inflammasjon tilveiebrakt. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er et antistoff til OPGL for anvendelse i terapi i kombinasjon med minst ett terapeutisk middel for behandling av en immunlidelse tilveiebrakt. Eksempler på terapeutiske midler for inflammasjon og immunlidelser og sykdommer innbefatter, men er ikke
40 begrenset til, kortikosteroider inklusive, men ikke begrenset til, prednisolon; ikke-

steroidale antiinflammatoriske medikamenter (NSAID) som inkluderer, men ikke er begrenset til, syklooksxygenase type 1 (COX-1) og syklooksxygenase 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-lipoksxygenaseinhibitorer inklusive, men ikke begrenset til, zileuton; modulatorer av interleukin-6 (IL-6); små molekylmodulatorer av 38 kDa mitogenaktivert proteinkinase (p38-MAPK); små molekylmodulatorer 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 k. 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; 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 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 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 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.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er et antistoff til OPGL for anvendelse i behandling av 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 tilveiebrakt. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er et antistoff til OPGL for anvendelse i behandling av bentap som er assosiert med cancer tilveiebrakt. Eksempler på cancere innbefatter, men er ikke begrenset til, cancer i bryst, prostata, skjoldbruskkjertelen, nyrer, lunger,
- 5 svelge, endetarmen, urinblæren, livmoren, eggstokker og lever, så vel som cancer i tarmkanalen. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er et antistoff til OPGL for anvendelse i behandling av 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 tilveiebrakt.
- 10 I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, blir et antistoff av OPGL for anvendelse i terapi administrert alene. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, blir et antistoff til OPGL for anvendelse i terapi administrert sammen med minst ett annet terapeutisk middel inklusive, men ikke begrenset til, minst ett annet cancerterapimiddel. Eksempler på cancerterapimidler innbefatter, men er ikke
- 15 begrenset til, strålingsterapi og kjemoterapi. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil en kjemoterapi innbefatte en behandling med en eller flere av de følgende: Antrasykliner, taksol, tamoksifen, doksorubicin, 5-fluoruracil og andre medikamenter som er kjente innenfor cancerbehandlingen. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil et cancerterapimiddel være en luteiniserende
- 20 hormonfrigjørende hormon (LHRH) antagonist. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er en LHRH-antagonist en peptidantagonist.
- I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, omfatter en LHRH-antagonist 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'-
- 25 klorfenyl)alaninyl; Pal er 3-(3'-pyridyl)alaninyl; og Lys(iPr) er N-epsilon-2-propyllysinyll.
- I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er en LHRH-antagonist et LHRH-antagonist decapeptid. Visse eksempler på decapeptider er blant annet beskrevet i U.S. patent nr. 5,843,901.
- 30 Eksempler på terapeutiske antistoffer ifølge visse utførelser 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
- 35 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.

- 5 I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er cancerterapimidlene polypeptider som selektivt induserer apoptose i tumorceller og som inkluderer, men som ikke er begrenset til, det TNF-relaterte polypeptidet TRAIL. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil et antistoff til OPGL kunne administreres minst en gang før, sammen med eller etter en behandling med et cancerterapimiddel. I
- 10 visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil et antistoff til OPGL for anvendelse i terapi kunne administreres profylaktisk for å hindre eller å svekke utviklingen av bentap som skyldes metastatisk cancer. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er et antistoff til OPGL for anvendelse for behandlingen av en eksisterende tilstand av bentap som skyldes metastase tilveiebrakt.
- 15 I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er et antistoff til OPGL for anvendelse 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 tilveiebrakt. Multippelt myelom er en B-celleavledet tumor som kan resultere i signifikant morbiditet og/eller mortalitet. I visse tilfeller vil en klinisk manifestasjon av
- 20 multippelt myelom være fokalt bentap som kan skyldes en økt osteoklastaktivering 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
- 25 skjelettsår som opptrer 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. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er et
- 30 antistoff til OPGL for anvendelse for å redusere eller blokkere benresorpsjon og frigjøring av kalsium, noe som vil redusere risikoen for brudd og ryggradsdeformitet tilveiebrakt.
- I visse tilfeller vil myelomcellene ikke direkte delta i bendestruksjonen, men i stedet gi ekstracellulære signaler som fører til osteoklastdifferensiering og
- 35 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.
- 40 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.

5 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. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil således en administrering av et antistoff til OPGL til 10 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 15 påvirker overlevelsen til myelomcellene. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil således en administrering av et antistoff til OPGL kunne redusere tumorcelleoverlevelsen og derved nedsette eller eliminere den tumorbelastning som ofte ses hos myelompasienter.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er farmasøytiske 20 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 adjuvans tilveiebrakt.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er farmasøytiske 25 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 adjuvans tilveiebrakt. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er minst 30 ett ytterligere terapeutisk middel 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; anakinra, TNF α -inhibitorer som inkluderer, men ikke er begrenset til, en løselig TNF α -reseptor, EnbrelTM, etanercept, anti-TNF α -antistoffer, RemicadeTM, infliximab, og 35 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, celecoxib, og VioxxTM; rofecoxib, immunundertrykkende midler så som metotreksat og leflunomid; serinproteaseinhibitorer så som sekretorisk leukocytproteaseinhibitor (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; fibroblastvekstfaktorer FGF-1 til og med FGF-10 og FGF-modulatorer; PAF-antagonister; kartinocytvekstfaktor (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 lipopolysakkarid (LPS) nivåer; og noradrenalin og modulatorer og mimetika av dette.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil akseptable preparatmaterialer fortrinnsvis være ikke-toksiske for mottakeren ved de doser og konsentrasjoner som blir anvendt.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil den farmasøytiske sammensetningen 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. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil egnede sammensetningsmaterialer eller stoffer 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)).

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er et antistoff til OPGL og/eller et terapeutisk molekyl 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.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil den optimale farmasøytiske sammensetningen 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*. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil slike sammensetninger kunne påvirke den fysiske tilstanden, stabiliteten, hastigheten med hensyn til *in vivo* frigjøring og hastigheten med hensyn til *in vivo* eliminering av antistoffene som er angitt og/eller krevd heri.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil den primære bærervæsken eller bærerstoffet i en farmasøytisk sammensetning enten være vandig eller ikke-vandig av natur. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil for eksempel 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, nøytral bufret saltløsning eller saltløsning blandet med serum albumin være eksempler på slike bærervæsker. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil de farmasøytiske sammensetningene 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. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil en sammensetning som omfatter et antistoff til OPGL med eller uten minst ett ytterligere terapeutisk middel 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. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan videre en sammensetning som omfatter et antistoff til OPGL, med eller uten minst ett ytterligere terapeutisk middel, opparbeides som et frysetørket preparat ved å bruke passende fortynningsmidler så som sukrose.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan farmasøytiske sammensetninger som er angitt og/eller krevd heri opparbeides for parenteral

administrering. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan sammensetningene opparbeides for inhalering eller administrering gjennom fordøyelseskanalen, for eksempel oralt. Fremstillingen av slike farmasøytisk akseptable sammensetninger er velkjente innenfor den farmasøytiske industrien.

- 5 I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil komponentene i preparatene være tilstede i konsentrasjoner som er akseptable for administreringsstedet. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan man anvende buffere for å holde sammensetningen på en fysiologisk pH eller ved en noe lavere pH, typisk i et pH-område fra omtrent 5 til omtrent 8.
- 10 I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, så som 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. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil en bærervæske 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. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil fremstillingen 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. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan man også bruke hyaluronsyre som effektivt fremmer en vedvarende varighet av preparatet i sirkulasjonen. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er det også mulig å anvende implanterbare medikamenttilføringsanordninger for å tilføre det forønskede molekylet.
- 20 I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan en farmasøytisk sammensetning opparbeides for inhalering. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil et antistoff til OPGL med eller uten minst ett ytterligere terapeutisk middel, opparbeides som et tørt pulver for inhalering. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil en inhaleringsløsning omfatte et antistoff til OPGL, med eller uten minst ett ytterligere terapeutisk middel, være opparbeidet sammen med et drivstoff for aerosol bruk. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan løsningene forstøves. Lungeadministrering er videre beskrevet i PCT-søknad publisert som WO 94/20069 A1 som beskriver lungetilførsel av kjemisk modifiserte proteiner.
- 30 I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan preparater administreres oralt. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil således et antistoff til OPGL, med eller uten minst ett ytterligere terapeutisk middel, bli administrert på
- 35

denne måten og kan da opparbeides med eller uten de bærerstoffer som vanligvis brukes for opparbeiding av faste doseringsformer så som tabletter og kapsler. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan en kapsel være utformet slik at den frigjør den aktive delen av preparatet på det punktet i fordøyelseskanalen hvor

5 biotilgjengeligheten er maksimal og den presystemiske degraderingen er minimal. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan minst ett ytterligere middel inkluderes for å lette absorpsjon av antistoffet til OPGL og/eller eventuelle andre terapeutiske midler. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er det også

10 mulig å anvende fortynningsmidler, smaksstoffer, vokstyper med lavt smeltepunkt, vegetabiliske oljer, smøremidler, suspenderingsmidler, tablettedbrytningsmidler og bindemidler.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan en farmasøytisk sammensetning innbefatte en effektiv mengde av antistoffer til OPGL, med eller uten minst ett ytterligere terapeutisk middel, i en blanding med ikke-toksiske

15 fortynningsmidler som er egnet for fremstillingen av tabletter. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan man ved å løse tablettene i sterilt vann eller annen passende bærervæske fremstille løsninger i enhetsdoseform. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil egnede fortynningsmidler innbefatte, men ikke være begrenset til, inerte fortynningsmidler slik som

20 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

25 antistoffer til OPGL, med eller uten minst ett ytterligere terapeutisk middel, så som preparater for vedvarende eller kontrollert frigjøring av de aktive bestanddelene. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er teknikker for å opparbeide en rekke forskjellige andre anordninger for vedvarende eller kontrollert tilførsel av aktive bestanddeler så som liposombærerstoffer, bionedbrytbare mikropartikler eller

30 porøse perler eller depotinjeksjoner, velkjente innenfor den farmasøytiske industrien. Se for eksempel PCT-søknad publisert som WO 93/15722 A1 som beskriver den kontrollerte frigjøringen av porøse polymere mikropartikler for tilførsel av farmasøytiske sammensetninger. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil preparatene for vedvarende frigjøring innbefatte semipermeable

35 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)

40 og Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982)), etylenvinylacetat (Langer *et al.*,

supra) eller poly-D(-)-3-hydroksysmørsyre (EP 133,988). I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil preparatene eller sammensetningene for vedvarende frigjøring 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. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan dette oppnås ved filtrering gjennom sterile filtreringsmembraner. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, når sammensetningen er fremstilt ved frysetørking, så kan sterilisering ved å bruke denne fremgangsmåten utføres enten før eller etter frysetørkingen og en eventuell rekonstituering. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil sammensetningen for parenteral administrering kunne lagres i frysetørket form eller i en løsning. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil de parenterale sammensetningene 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.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, så vil den farmasøytiske sammensetningen, 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.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, er sett for å fremstille en enkeltdose administreringsenhet tilveiebrakt, hvert av settene vil kunne inneholde en første beholder som inneholder et tørket protein og en andre beholder som inneholder et vandig preparat. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil disse settene inneholde enkle eller flerkamrede på forhånd fylte sprøyter (for eksempel væskesprøyter og såkalte lyosprøyter).

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil den effektive mengden av en farmasøytisk sammensetning som omfatter et antistoff til OPGL, 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 og disse nivåene vil således 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. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil legen lett kunne

justere dosen og modifisere administrasjonsmåten for derved å oppnå den optimale terapeutiske effekten. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil typiske doser variere fra ca 0,1 µg/kg til omtrent 100 mg/kg eller mer, avhengig av de faktorer som er nevnt ovenfor. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil dosen 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.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil doseringsfrekvensen måtte ta hensyn til de farmakokinetiske parametrene for antistoffet til OPGL og/eller eventuelle andre terapeutiske midler som anvendes. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil en klinisk lege administrere sammensetningen inntil man når et dosenivå som gir den forønskede effekten. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan derfor 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. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil passende doser kunne oppnås ved å bruke passende doseresponsdata.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil administrasjonsveien 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. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil sammensetningene kunne administreres ved en bolusinjeksjon eller kontinuerlig ved infusjon eller ved hjelp av implantert anordning.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil sammensetningen 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. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, 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.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan det 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. I slike tilfeller vil celler, vev og/eller organer som er fjernet fra pasienten 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.

I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan et antistoff til OPGL og/eller eventuelle andre terapeutiske midler 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. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan slike celler være animalske eller humane celler, og kan være autologe, heterologe eller xenogene. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, kan cellene være såkalt immortaliserte. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, for å øke sjansen for en immunologisk respons eller reaksjon, kan cellene være innkapslet for å unngå infiltrering i det omkringliggende vevet. I visse utførelser, som er angitt og/eller krevd heri, vil innkapslingsmaterialene 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.

20

Eksempel 1

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 klonere det α OPGL-1 lettkjedede cDNA, mens AMG 6.4 ble brukt for å klonere 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 II™ Preamplification System for første tråds cDNA syntesesett (katalog nr. 18089-011). De nedenfor angitte oligonukleotidene ble brukt for PCR-reaksjonen:

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)

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.

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:

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.

Det 738 bp fullengde kappafragmentet utviklet som beskrevet ovenfor ble kuttet med *XbaI* og *SalI*, 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 som her inngår som referanse for ethvert formål (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.

15 **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 glykoproteinmonet (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 <i>E. coli</i> (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 *Xba*I- og *Sal*I-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 dobbelttrådet cDNA fremstilt med Clontech MarathonTM cDNA amplifiseringssettet (katalognr. K1802-1). Amplifisering av AMG 6.4 tungkjedet cDNA ble utført med 5' og 3' rask
- 10 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)

- 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
- 20 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 *Sal*I-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)

*Hind*III 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'
5 (SEKV.ID. NR. 12)

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

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
10 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 *Hind*III og *Sal*I, 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-
20 vektoren som er beskrevet ovenfor, bortsett fra at det α OPGL-1 IgG2 tungkjededede cDNA er erstattet med det α OPGL-1 kappa lettkjededede cDNA mellom *Xba*I- og *Sal*I-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.

25 Eksempel 2

α OPGL-1-ekspresjon i CHO-celler

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
30 hydrofolatreduktasesviktende (DHFR⁻) kinesiske hamstereggstokkcellene (CHO AM-1/D, U.S. patent nr. 6,210,924) etter isolering og testing av individuelle kloner.

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
35 0). På dag en ble 400 μ l serumfritt RPMI 1640-medium (Gibco®) porsjonert over i

12 × 75 mm polypropylenrør. 24 µl av *TransIT®*-LT1-reagens (Mirus Corporation) ble dråpevis tilsatt mediet, og blandingen ble hensatt for inkubering ved romtemperatur i 10 minutter. Totalt 15 µg linearisert plasmid DNA (7m5 µg av αOPGL-1-kappa/pDSRα19 og 7,5 µg av αOPGL-1-IgG2/pDSRα19 ble kuttet med Pvu1), ble så dråpevis tilsatt blandingen og denne ble så inkubert 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 vevskulturinkubator, 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 storfosters serum (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 αOPGL-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 αOPGL-1 lette kjeden. Klonene med den høyeste ekspresjonen ble utvidet og lagret i flytende nitrogen.

Eksempel 3

Produksjon av αOPGL-1

30 Fremstilling og dannelselse av cellelinje 125Q

CHO-celler som produserte αOPGL-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 αOPGL-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 Aplikon 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.

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 Sopp 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, hvoretter 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.

- 5 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.

- 10 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 μ m eller mindre.

- 15 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 μ m 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 20 frosset for rensing på et senere tidspunkt. Produksjonsprosessen er vist på figur 19.

Celledyrkningsmedium

- 25 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 μ m 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
Lipoinssyre	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
Treverdige 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)

5 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, ble produktet oppsamlet basert på absorpsjonen ved 280 nm i kolonne-eluatet.

B. Viral inaktivering

10 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

15 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)

Antistoffet ble ytterligere rensset ved kationutbyttingskromatografi ved å bruke SP Sepharose HP (Amersham Pharmacia) eller tilsvarende.

20 Kationutbyttingskromatografitrinnet fjernet 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 lineær gradient med økende saltkonsentrasjon (20 mM NAMES pH 6,2, 0 M NaCl

25 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 kolonne-eluatet.

E. Hydrofob interaksjonskromatografi (HIC)

Antistoffet ble ytterligere rensset ved hydrofob interaksjonskromatografi ved å bruke fenyl Toyapearly 650S (Tosoh Biosep) eller tilsvarende. Det hydrofobe

30 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 15-25°C. Etter påsetting ble kolonnen vasket med ekvibreringsbufferen (1 M kaliumfosfat pH 8).

35 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 kolonne-eluatet.

F. Konsentrasjon og diafiltrering.

5 HIC-kolonne-eluatet 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.

Endelig filtrering og lagring

10 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

Bindingsspesifisitet for α OPGL-1

15 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).

20 **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

25 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 inkubert 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.

5 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 inkubert i 2 timer ved romtemperatur. Bundet antistoff ble påvist ved hjelp av geit antihumant IgG (Fab')-HRP ved å bruke TMB-H₂O₂
10 (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 preinkubert med varierende
15 konsentrasjoner av OPGL, TNFa, TNFb, 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 inkubert i 30 minutter i 2-8°C med FITC-merket F(ab')₂ geit antihumant IgG
20 (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 TNFa, TNFb, TRAIL eller CD40-ligand.

25 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
30 preinkubert 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 inkubert 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 inkubert 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 inkubert 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.

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 tertiære komplekset emitte 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 preinkubert 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 romtemperatur i ca 1 time (preinkuberingsblanding). 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 inkubert ved romtemperatur i 1 time (fluorokromblanding). Like volumer av preinkuberingsblandingen og fluorokromblandingen ble så blandet, og inkubert ved romtemperatur i 3 timer. Fluorescensen ble målt ved å lese platene i et Packard Discovery HTRF mikroplateanalyseapparat ved å bruke en eksitasjonslengde på 337 nm og en emisjonsbølgelengde på 665 nm.

Når α OPGL-1 ble preinkubert 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 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 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 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.

5 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.

10 Det ble brukt en ikke-kompartemental analyse av fullstendige serumkonsentrasjonstidsprofiler 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 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
15 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 mg/kg. Endelig elimineringshalvliv ($t_{1/2z}$) beregnet ikke-kompartementalt, er i gjennomsnitt 31 timer for alle IV-dosegruppene. Elimineringen (Cl , Cl/F) for
20 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).

Etter en subkutan administrering, er absorpsjonen langsom med en midlere toppkonsentrasjon (C_{max}) på 11600 ng/ml etter 132 timer. Det er stor variabilitet
25 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%.

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

5 ^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

10 α OPGL-1 forårsaker en rask senkning av serum N-Tx-nivåene i løpet av 24 timer 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 høyere doser ble det imidlertid ikke observert noen ytterligere suppresjon med en

15 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 (figur 20).

5 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 suppressjon 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.

10 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
15 på en α OPGL-1-disposisjon (figur 16).

PATENTKRAV

1. Antistoff,

k a r a k t e r i s e r t v e d å omfatte en tung kjede og en lett kjede,

- 5 a) der den tunge kjeden er valgt fra en fullengde tung kjede og polypeptid fragmenter derav som har tilstrekkelig variabel områdesekvens til å gi spesifisitet for en OPGL, og
den tunge kjeden omfatter et første variabelt område som omfatter en aminosyresekvens som har minst 90 % identitet med aminosyresekvensen som angitt i SEKV.ID.NR. 13, og
10 b) der den lette kjeden er valgt fra en fullengde lett kjede og polypeptid fragmenter derav som har tilstrekkelig variabel områdesekvens til å gi spesifisitet for en OPGL, og
den lette kjeden omfatter et andre variabelt område som omfatter en aminosyresekvens som har minst 90 % identitet med aminosyresekvensen som
15 angitt i SEKV.ID. NR. 14,
der antistoffet binder til en osteoprotegerin ligand (OPGL) og inhiberer bindingen av OPGL til en osteoklast differensierings- og aktiveringsreseptor (ODAR), og
der et overskudd av antistoff reduserer bindingen med minst 20 % som målt i
20 en *in vitro* konkurrerende bindingsprøve.

2. Antistoff ifølge krav 1,

- der det første variable området omfatter en aminosyresekvens som har minst 95 % identitet med aminosyresekvensen som angitt i SEKV.ID.NR. 13, og der det andre
25 variable området omfatter en aminosyresekvens som har minst 95 % identitet med aminosyresekvensen som angitt i SEKV.ID.NR. 14.

3. Antistoff ifølge krav 1 eller krav 2,

- der det første variable området omfatter en aminosyresekvens som har minst 99 %
30 identitet med aminosyresekvensen som angitt i SEKV.ID.NR. 13, og der det andre variable området omfatter en aminosyresekvens som har minst 99 % identitet med aminosyresekvensen som angitt i SEKV.ID.NR. 14.

4. Antistoff ifølge ethvert av kravene 1 til 3,

- 35 a) der den tunge kjeden omfatter de tre CDRene av SEKV.ID.NR. 13, og
b) der den lette kjeden omfatter de tre CDRene av SEKV.ID.NR. 14.

5. Antistoff ifølge ethvert av kravene 1 til 4, der den tunge kjeden og den lette kjeden danner et enkeltkjedet antistoff.
6. Antistoff ifølge krav 5, som er et enkeltkjedet Fv-antistoff.
- 5
7. Antistoff ifølge ethvert av kravene 1 til 4, som er et Fab-antistoff, et Fab'-antistoff eller et F(ab')₂-antistoff.
8. Antistoff ifølge ethvert av kravene 1 til 4, som er fullt ut humant.
- 10
9. Antistoff ifølge ethvert av kravene 1 til 8, som er uttrykt fra en vertscelle.
10. Antistoff ifølge krav 9, der vertscellen er en pattedyrvertscelle.
- 15
11. Antistoff ifølge krav 10, der pattedyrvertscellen er valgt fra en kinesisk hamstereggstokk celle, en HeLa-celle, en fosterhamsternyre celle, en apenyrecelle og en human hepatocellulær karsinomcelle.
- 20
12. Antistoff ifølge ethvert av kravene 9 til 11, der vertscellen omfatter et første polynukleotid og et andre polynukleotid, der det første polynukleotidet koder en tung kjede som omfatter aminosyresekvensen som angitt i SEKV.ID.NR. 13 og det andre polynukleotidet koder en lett kjede som omfatter aminosyresekvensen som angitt i SEKV.ID.NR. 14.
- 25
13. Antistoff ifølge krav 12, der det første polynukleotidet koder en tung kjede som omfatter aminosyresekvensen i SEKV.ID.NR. 2 og det andre polynukleotidet koder en lett kjede som omfatter aminosyresekvensen i SEKV.ID.NR. 4.
- 30
14. Farmasøytisk sammensetning som omfatter et antistoff ifølge ethvert av kravene 1 til 13.

15. Antistoff ifølge ethvert av kravene 1 til 13 eller en farmasøytisk sammensetning ifølge krav 14 for anvendelse i å behandle bentap.
- 5 16. Antistoff for anvendelse eller farmasøytisk sammensetning for anvendelse ifølge krav 15, der bentapet er assosiert med minst en tilstand valgt fra osteoporose, Pagets sykdom, osteomyelitt, hyperkalsemi, osteopeni, osteonekrose, en inflammatorisk tilstand, en autoimmun tilstand, reumatoidartritt og kreft.
- 10 17. Anvendelse av antistoff ifølge ethvert av kravene 1 til 13 eller farmasøytisk sammensetning ifølge krav 14 for fremstilling av et medikament for å behandle bentap.
- 15 18. Anvendelse ifølge krav 17, der bentapet er assosiert med minst en tilstand valgt fra osteoporose, Pagets sykdom, osteomyelitt, hyperkalsemi, osteopeni, osteonekrose, en inflammatorisk tilstand, en autoimmun tilstand, reumatoidartritt og kreft.
- 20 19. Anvendelse av antistoff ifølge ethvert av kravene 1 til 13 eller farmasøytisk sammensetning ifølge krav 14 for fremstilling av et medikament for administrasjon sammen med minst en av strålingsterapi og kjemoterapi, for å behandle bentap assosiert med kreft.
- 25 20. Antistoff ifølge ethvert av kravene 1 til 13 eller farmasøytisk sammensetning ifølge krav 14, for anvendelse i behandling av bentap assosiert med kreft ved administrasjon sammen med minst en av strålingsterapi og kjemoterapi.
- 30 21. Anvendelse ifølge krav 19, der kreften er valgt fra brystkreft, prostatakreft, skjoldbruskkjertelkreft, nyrekreft, lungekreft, spiserørkreft, endetarmskreft, urinblærekreft, cervikalkreft, eggstokkreft, leverkreft, gastrointestinalkreft, multipelt myelom, lymfom og Hodgkins sykdom.

22. Antistoff for anvendelse eller farmasøytisk sammensetning for anvendelse ifølge krav 20, der kreften er valgt fra brystkreft, prostatakreft, skjoldbruskkjertelkreft, nyrekreft, lungekreft, spiserørkreft, endetarmskreft, urinblærekreft, cervikalkreft, eggstokkreft, leverkreft, gastrointestinalkreft, multippelt myelom, lymfom og Hodgkins sykdom.
23. Anvendelse ifølge krav 19, der kjemoterapien innbefatter behandling med minst et middel valgt fra et antrasyklin, taksol, tamoksifen, doksorubicin, 5-fluoruracil og en luteiniserende hormonfrigjørende hormon (LHRH) antagonist.
24. Antistoff for anvendelse eller farmasøytisk sammensetning for anvendelse ifølge krav 20, der kjemoterapien innbefatter behandling med minst et middel valgt fra antrasyklin, taksol, tamoksifen, doksorubicin, 5-fluoruracil og en luteiniserende hormonfrigjørende hormon (LHRH) antagonist.
25. Antistoff ifølge ethvert av kravene 1-4 og 8, der nevnte antistoff omfatter
- i) en human IgG2 tung kjede som omfatter aminosyresekvensen i SEKV.ID.NR.13, og
 - ii) en human kappa lett kjede som omfatter aminosyresekvensen i SEKV.ID.NR.14.
26. Antistoff ifølge krav 25, som er uttrykt fra en pattedyrvertscelle som omfatter et første polynukleotid og et andre polynukleotid, der det første polynukleotidet koder en human IgG2 tung kjede som omfatter aminosyresekvensen i SEKV.ID.NR.13 og det andre polynukleotidet koder en human kappa lett kjede som omfatter aminosyresekvensen i SEKV.ID.NR.14.
27. Antistoff ifølge krav 25, som er uttrykt fra en pattedyrvertscelle som omfatter et første polynukleotid og et andre polynukleotid, der det første polynukleotidet koder en tung kjede som omfatter det variable området og det konstante området av aminosyresekvensen i SEKV.ID.NR. 2 og det andre polynukleotidet koder en lett kjede som omfatter det variable området og det konstante området av aminosyresekvensen i SEKV.ID.NR.4.

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 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attactggga gtggtggttag      240
tacatactac gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa      300
cacgctgtat ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc      360
gaaagatcca gggactacgg tgattatgag ttgggttcgac ccctggggcc agggaaccct      420
ggtcaccgtc tcctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg cgcctgtctc      480
caggagcacc tccgagagca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga      540
accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc tctgaccagc ggcggtgcaca ccttcccagc      600
tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcaa      660
cttcggcacc cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga      720
caagacagtt gagcgcaaata gttgtgtcga gtgcccaccg tgcccagcac cacctgtggc      780

```

```

aggaccgtca gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac      840
ccctgagggtc acgtgctgtg tggtggacgt gagccacgaa gaccccgagg tccagttcaa      900
ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt      960
caacagcaog ttccgtgtgg tca`cgctcct caccgttggtg caccaggact ggctgaacgg     1020
caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa aggctccca gcccccatcg agaaaacat      1080
ctccaaaacc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga     1140
ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggtc aaaggcttct accccagcga     1200
catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC aactacaaga ccacacctcc     1260
catgctggac tccgacggct ctttcttct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag     1320
gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc 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 ttctcttctt cctgtacttc tggctcccag      60
ataccaccgg agaaattgtg ttgacgcagt ctccaggcac cctgtctttg tctccagggg      120
aaagagccac cctctcctgt agggccagtc agagtgttcg cggcagggtac ttagcctggg      180
accagcagaa acctggccag gctcccaggc tctcatcta tgggtgcatcc agcagggcca      240
ctggcatccc agacagggttc agtggcagtg ggtctgggac agacttcact ctcaccatca      300
gcagactgga gctgaagat tttgcagtgt tttactgtca gcagtatggg agttcacctc      360
ggacgttcgg ccaagggacc aagggtgaaa tcaaacgaac tgtggctgca ccatctgtct      420
tcatcttccc gccatctgat gagcagttga aatctggaac tgccctgtgt gtgtgcctgc      480
tgaataactt ctatcccaga gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac gccctccaat      540
```

```

cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca      600
gcagcaccct gacgctgagc aaagcagact acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag      660
tcacccatca gggcctgagc tcgcccgta 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

<220>

<223> 5' kappa RACE-primer

<400> 5

gatgacccag tctccagcca ccctg 25

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Kunstig sekvens

<220>

<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	
caactctaga ccaccatgga aaccccagcg		30
<210>	8	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	Kunstig sekvens	
<220>		
<223>	3' anti-OPGL-1 kappa-primer	
<400>	8	
tttgacgtcg acttatcaac actctcccct gttgaag		37
<210>	9	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Kunstig sekvens	
<220>		
<223>	5' IgG2 RACE-primer	
<400>	9	
ggcacggtca ccacgctgct gag		23
<210>	10	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Kunstig sekvens	
<220>		
<223>	3' IgG2 RACE-primer	
<400>	10	
cctccaccaa gggcccatcg gtct		24

<210> 11

<211> 51

<212> DNA

<213> Kunstig sekvens

<220>

<223> 5' anti-OPGL-1 IgG2-primer

<400> 11

cagaagcttg accacatgg agtttgggct gagctggctt tttctgtgg c 51

<210> 12

<211> 37

<212> DNA

<213> Kunstig sekvens

<220>

<223> 3' anti-OPGL-1 IgG2-primer

<400> 12

gcatgtcgac ttctattta 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

ggccggatag 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 CTGGGGGGTCT
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 AGGGAACCCT
421 GGTCACCGTC TCCTCAGCCT CCACCAAGGG CCCATCGGTC TTCCCCCTGG CGCCCTGCTC
481 CAGGAGCACC TCCGAGAGCA CAGCGGCCCT GGGCTGCCTG GTCAAGGACT ACTTCCCCGA
541 ACCGGTGACG GTGTCGTGGA ACTCAGGCGC TCTGACCAGC GGCGTGACA CCTTCCCAGC
601 TGTCTTACAG TCCTCAGGAC TCTACTCCCT CAGCAGCGTG GTGACCGTGC CCTCCAGCAA
661 CTTCCGCACC CAGACCTACA CCTGCAACGT AGATCACAAG CCCAGCAACA CCAAGGTGGA
721 CAAGACAGTT GAGCGCAAAT GTTGTGTCGA GTGCCCACCG TGCCAGCAC CACCTGTGGC
781 AGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAAAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC
841 CCCTGAGGTC ACGTGCCTGG 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 CCTTCTTCCT 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 aminosyressekvens**

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 WGQGTlVTVS Sastkgpsvf plapcsrsts estaalgclv kdyfpepvtv
181 swnsгалтsg vhtfpavlqs sglyslssvv tvpssnfgtq tytcnvdhkp sntkvdk tve
241 rkccvecppc pappvagpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvshed pevqfnwyvd
301 gvevhnaatk preeqfnstf rvsvltvvh qdwlngkeyk ckvsnkglpa piektisktk
361 gqprepvyt lppsreemtk nqvsltclvk gfypsdiave wesngqpenn ykttppmlds
421 dgsfflyskl tvdksrwqqg nvfscsvmhe alhnhytqks lslspgk (SEQ ID NO: 2)

```

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

DNA-sekvensen for kappakjede ekspresjonsplasmidsekvensen fra XbaI-setet til og med SallI-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 AGAGTGTTTCG CGGCAGGTAC TTAGCCTGGT
181 ACCAGCAGAA ACCTGGCCAG GCTCCCAGGC TCCTCATCTA TGGTGCATCC AGCAGGGCCA
241 CTGGCATCCC AGACAGGTTC AGTGGCAGTG GGTCTGGGAC AGACTTCACT CTCACCATCA
301 GCAGACTGGA GCCTGAAGAT TTTGCAGTGT TTTACTGTCA GCAGTATGGT AGTTCACCTC
361 GGACGTTTCG 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 GCAGCACCTT GACGCTGAGC AAAGCAGACT ACGAGAAACA CAAAGTCTAC GCCTGCGAAG
661 TCACCCATCA GGGCCTGAGC TCGCCCGTCA CAAAGAGCTT CAACAGGGGA GAGTGTTGAT
721 AAGTCGAC (SEQ ID NO: 3)

```

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

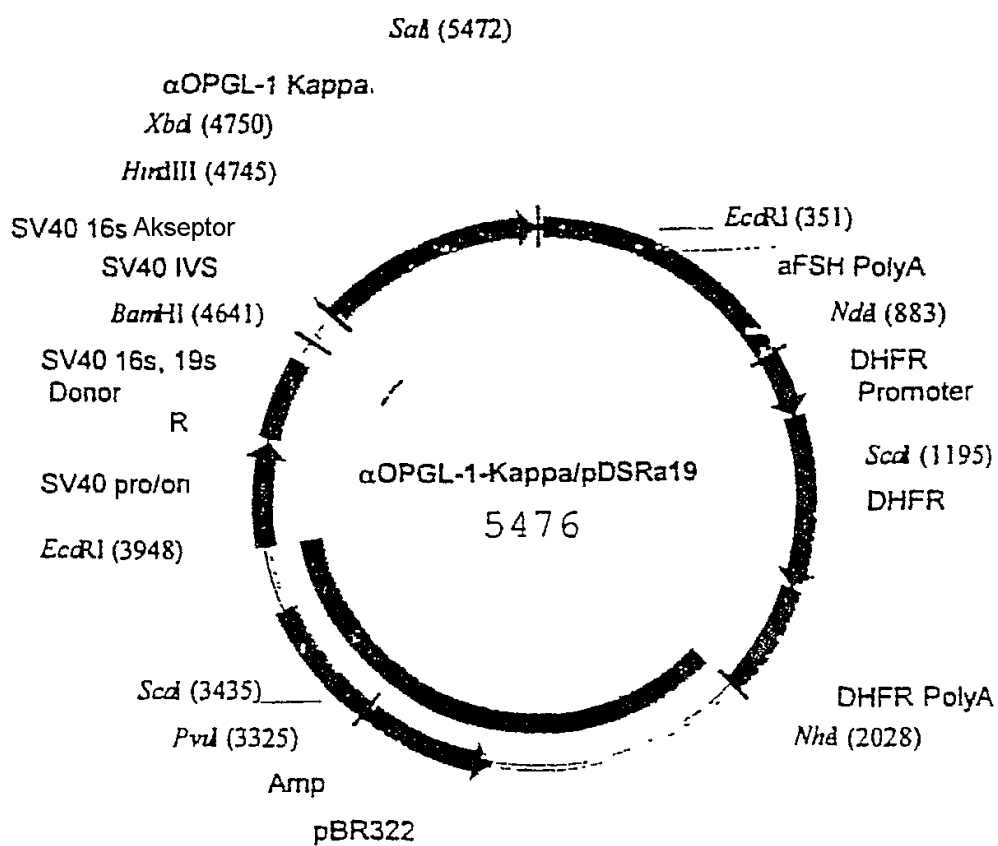
Kappasignalpeptidet er understreket, det variable området er angitt med blokkbokstaver og er ikke understreket, mens det konstante området er angitt med vanlig skrift.

```

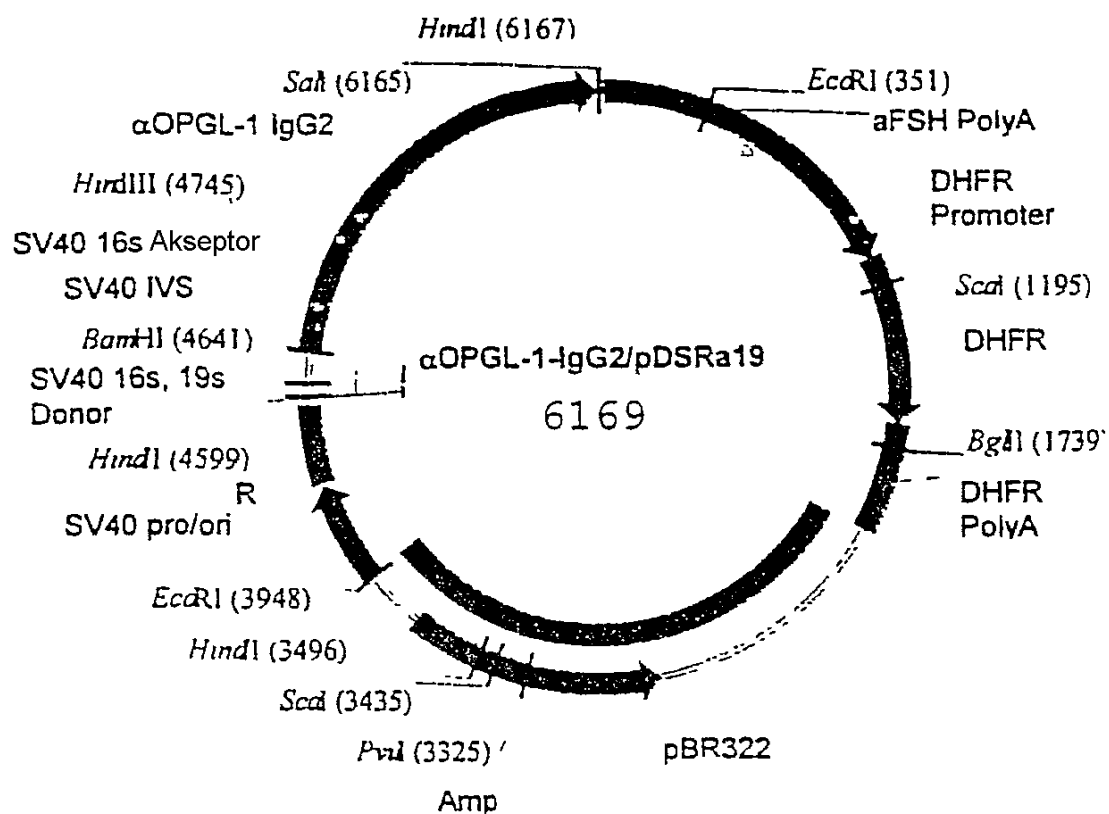
1 METPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVR
51 GRYLAWYQQK PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE
101 PEDFAVFYCQ QYGSSPRTFG QGTKVEIKrt vaapsvfifp psdeqlksgt
151 asvvcllnnf ypreakvqwk vdnalqsgns qesvteqdsk dstyslsstl
201 tlskadyekh kvyacevthq glsspvtksf nrgec (SEQ ID NO: 4)

```


FIGUR 5

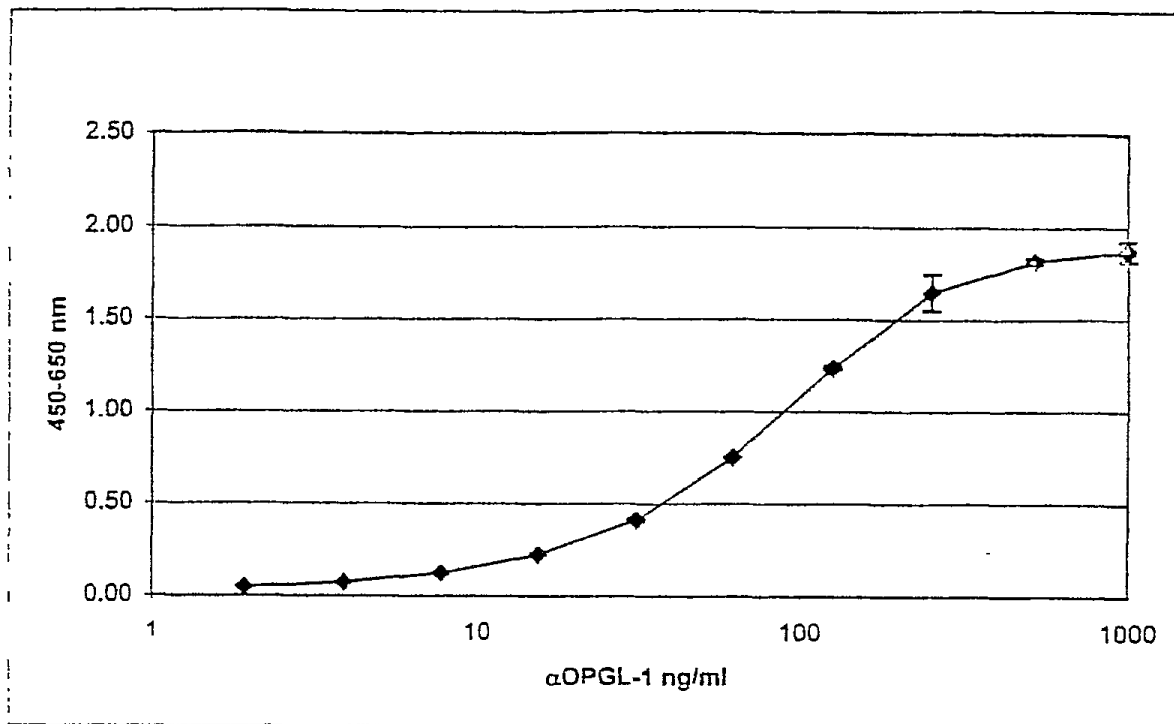
Sirkulært plasmidkart for α OPGL-1-kappa/pDSR α 19

FIGUR 6

Sirkulært plasmidkart for α OPGL-1-IgG2/pDSRa19

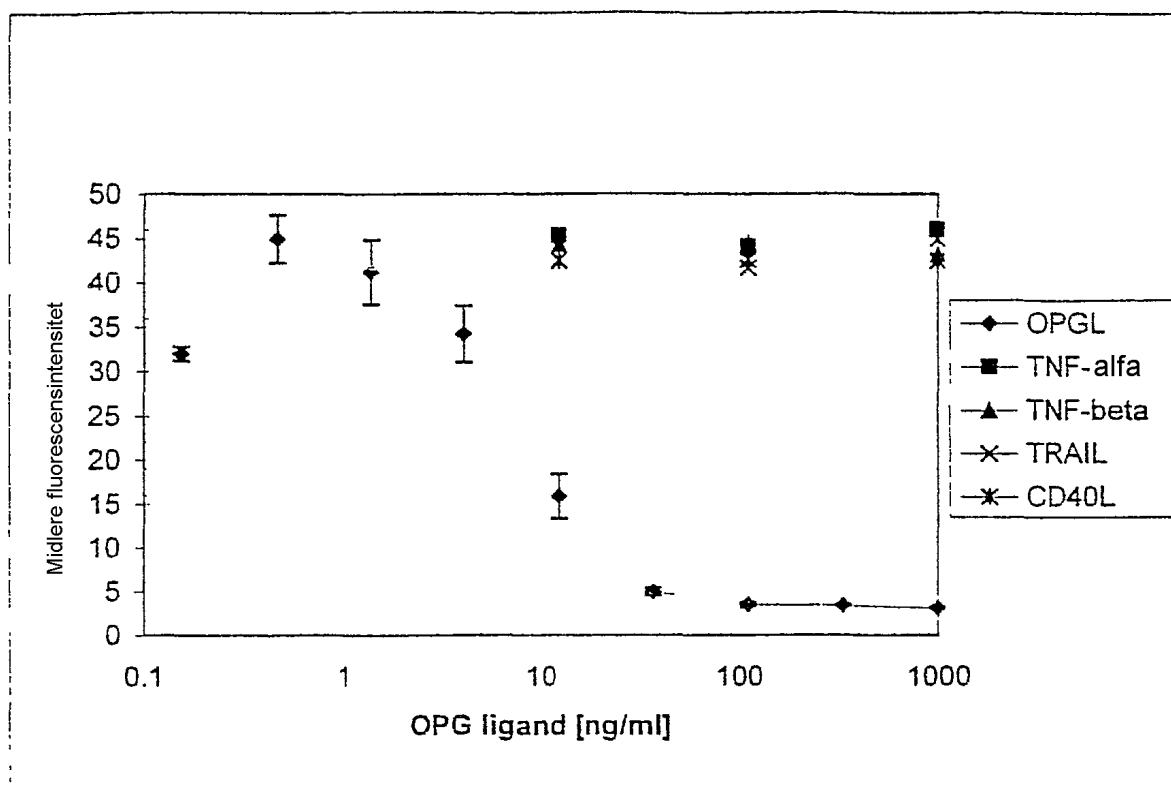
FIGUR 7

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



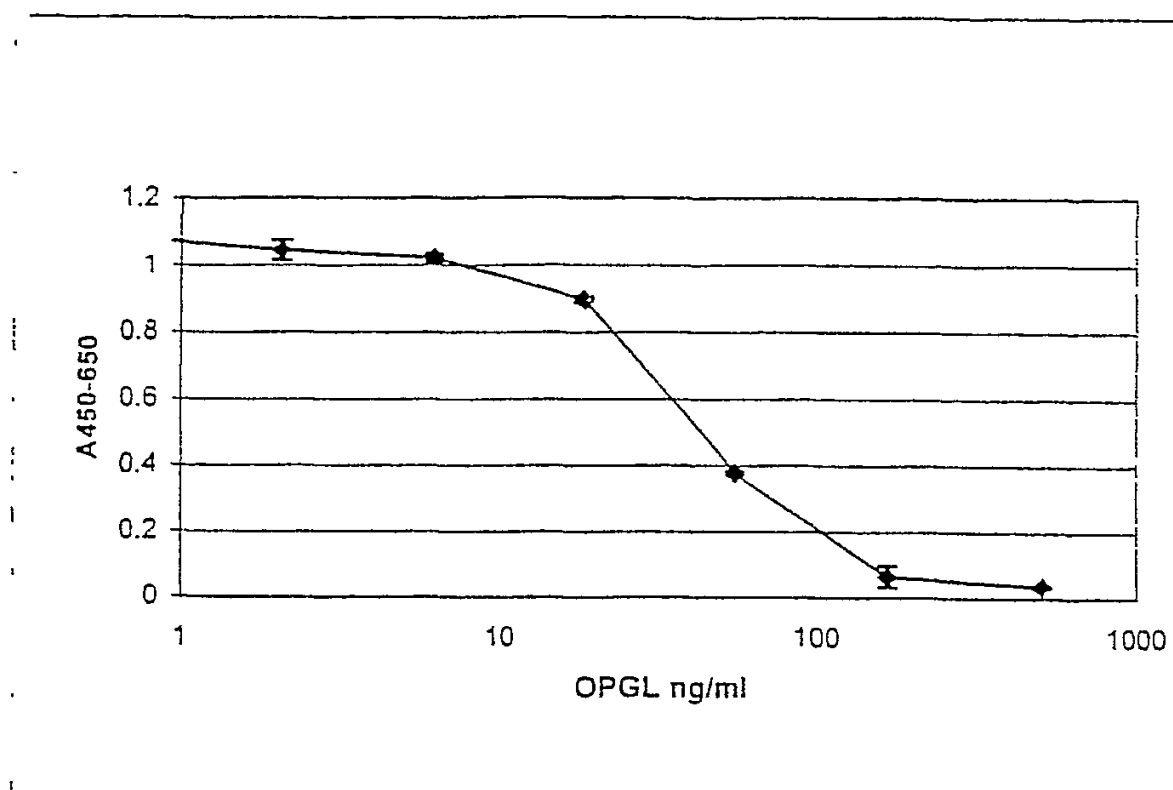
96-brønners EIA-plater ble belagt med rekombinant løselig OPGL. Varierende konsentrasjoner av α OPGL-1 ble tilsatt brønnene og platene ble innkubert i 2 timer ved romtemperatur. Bundet antistoff ble påvist ved hjelp av geit anti-humant IgG (Fab')-pepperrotperoksidase. Absorpsjonen ble avlest ved 450 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, Fc γ fragmentspesifikk. Etter sentrifugering og vasking ble celleoverflatefluorescensen målt ved å bruke flowcytometri.

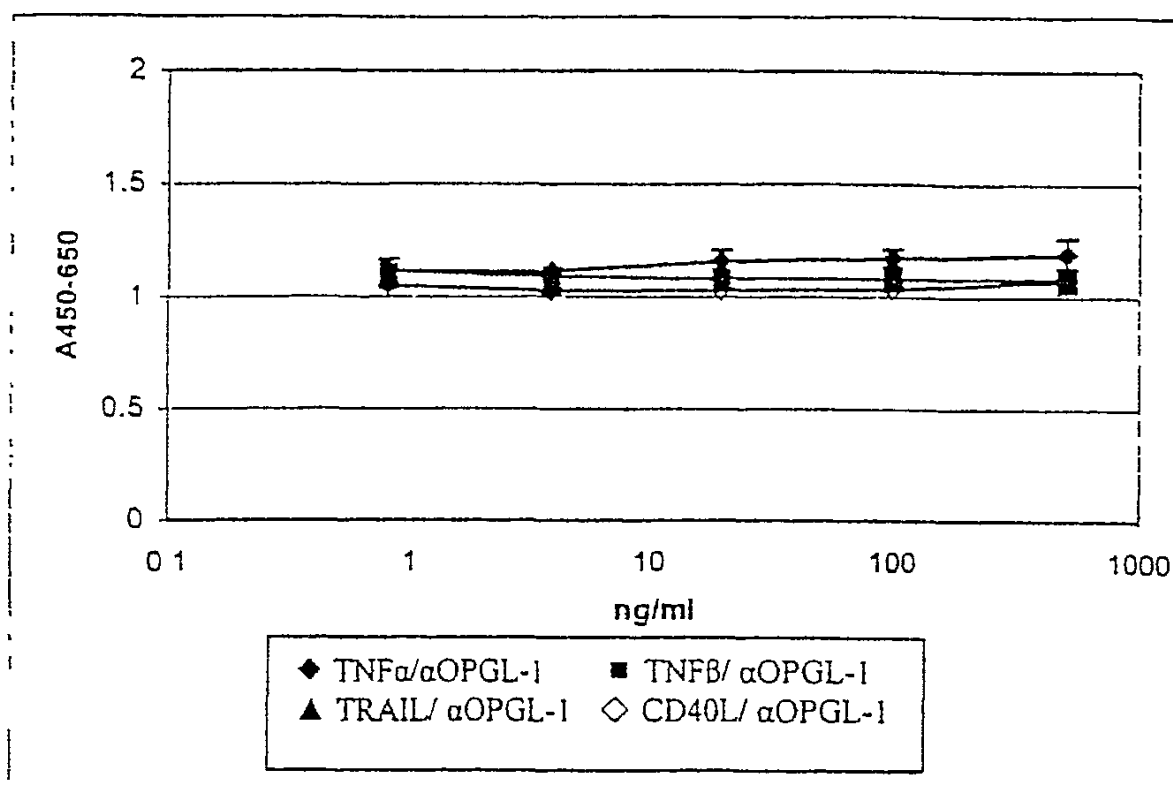
FIGUR 9

 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

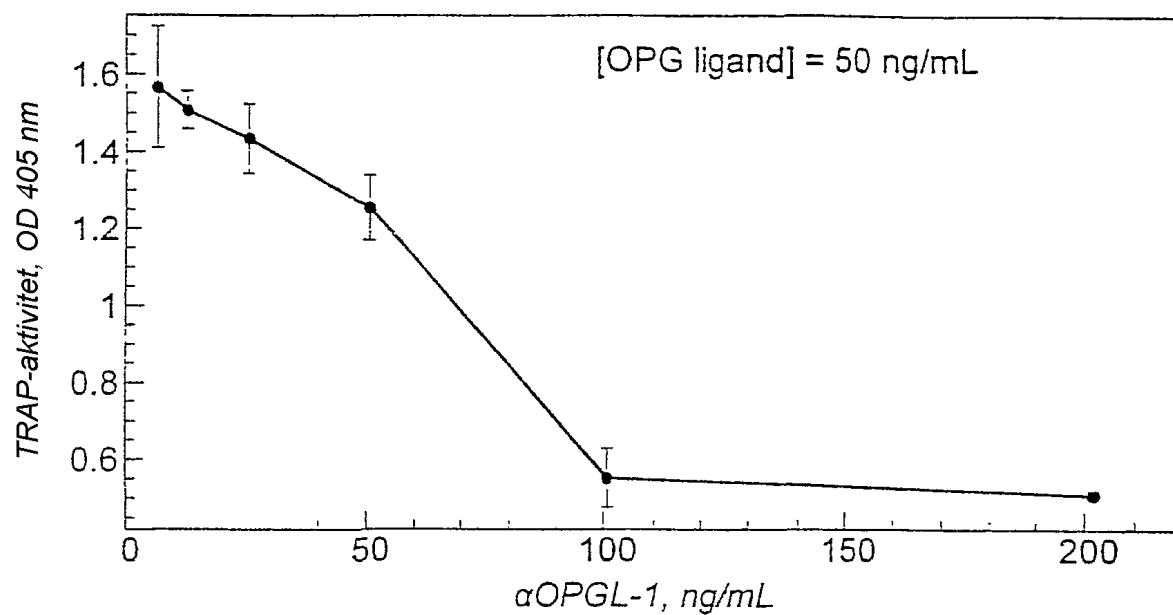
α OPGL-1 binder seg ikke til $\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\beta$, TRAIL eller CD40-ligand fra TNF-gruppen



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.

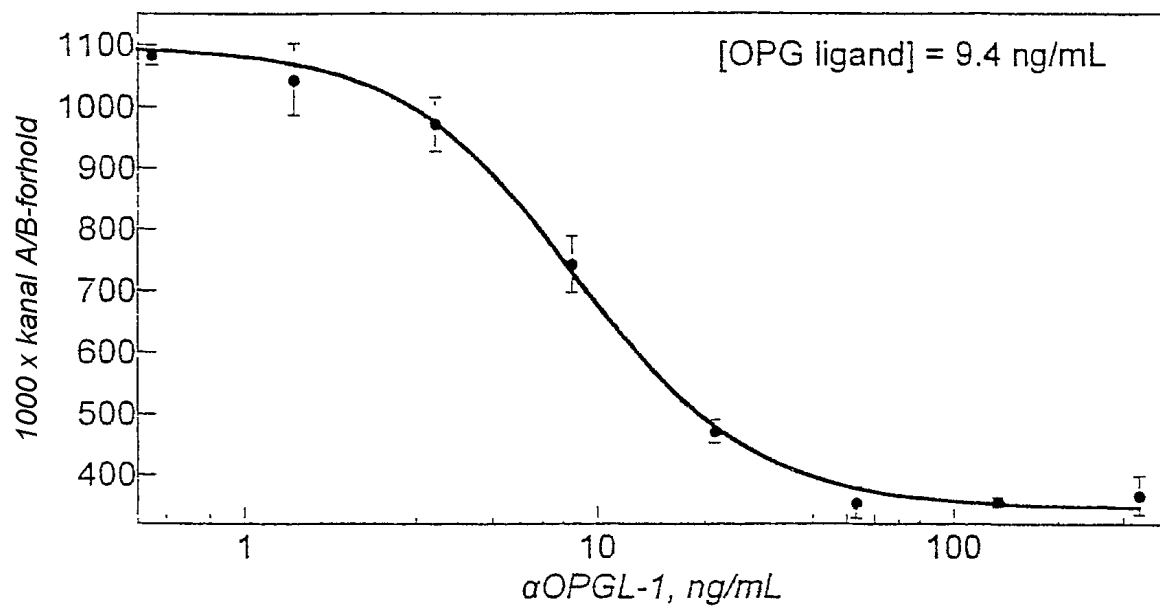
FIGUR 11

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



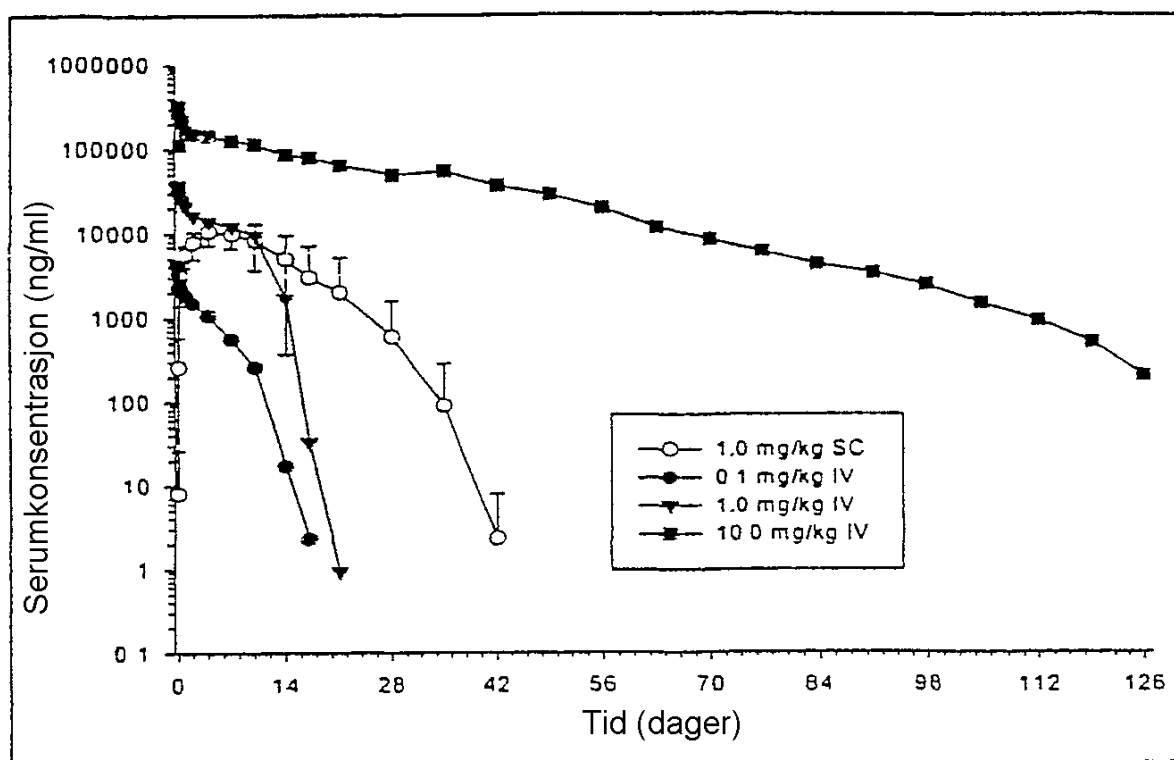
FIGUR 12

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



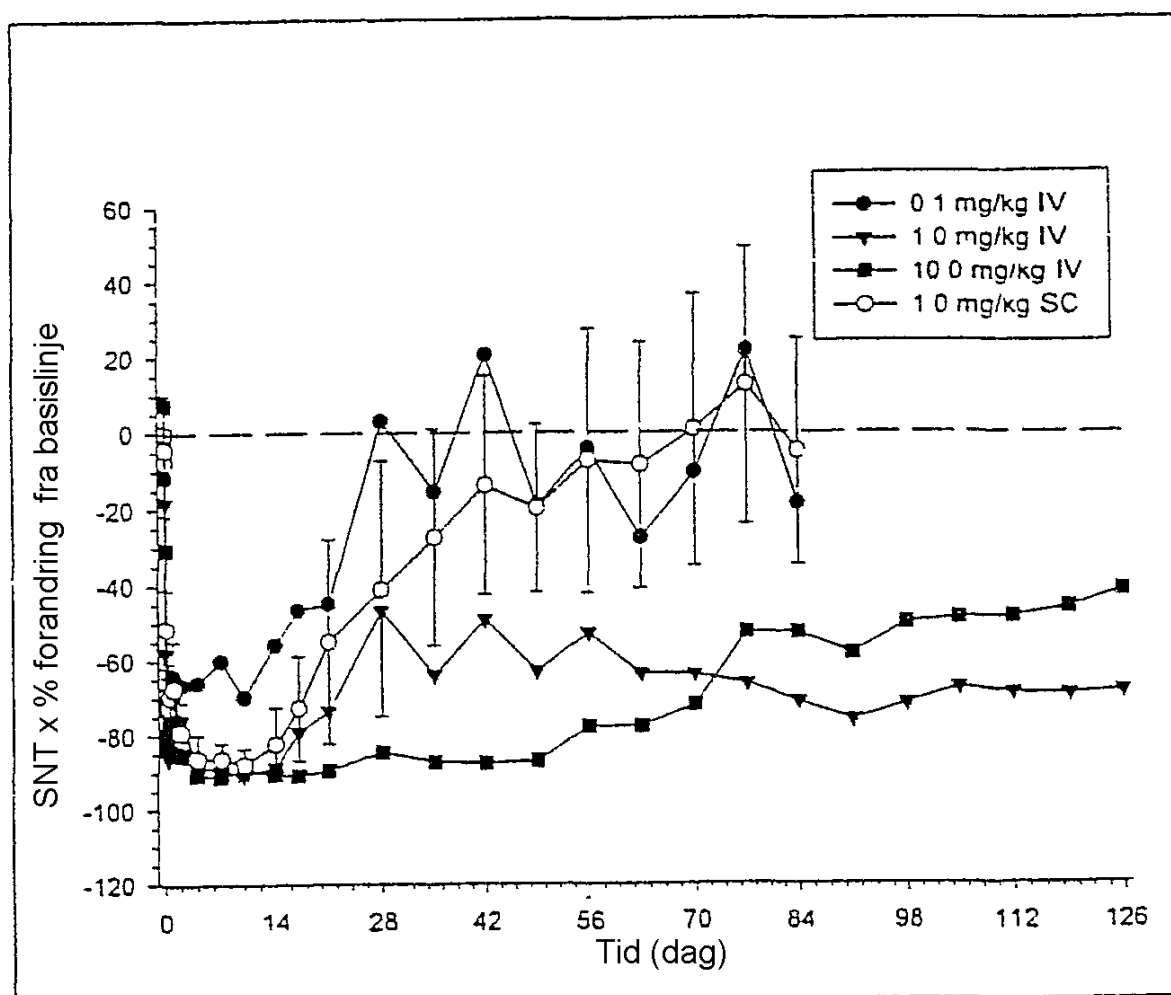
FIGUR 13

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)



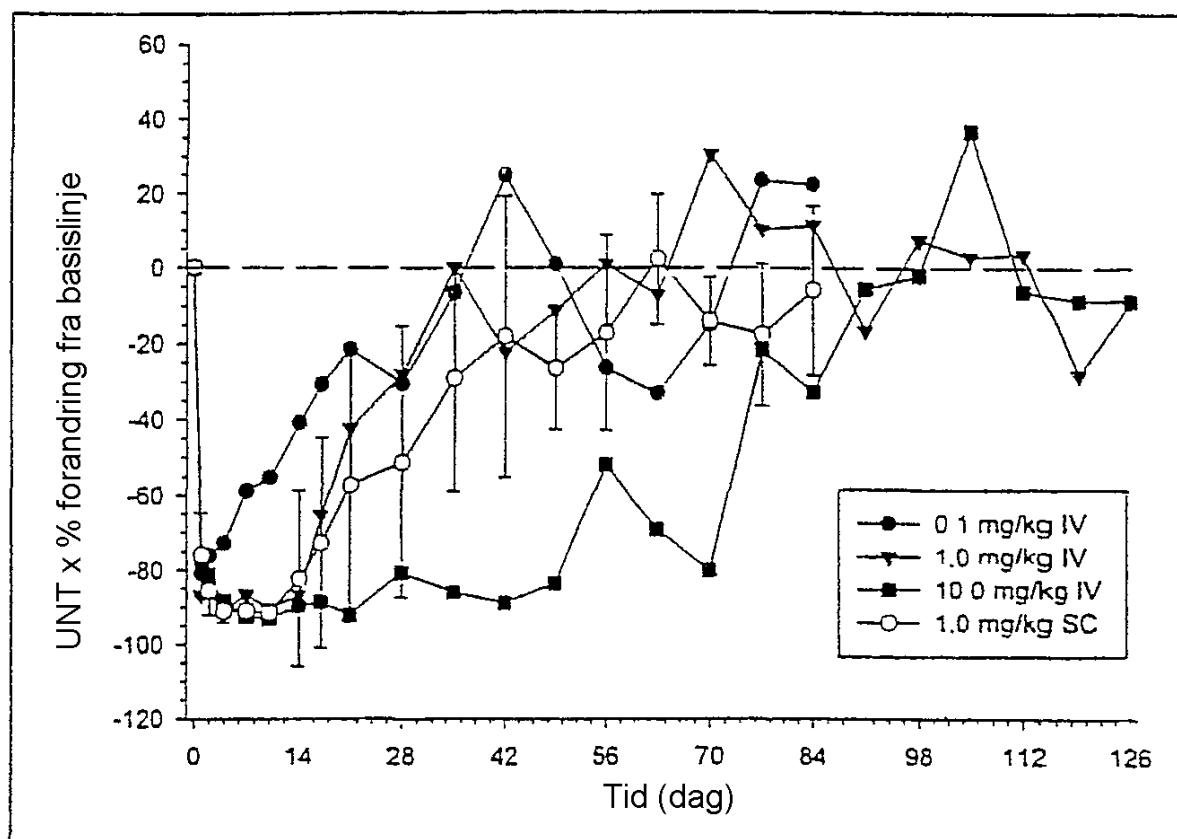
FIGUR 14

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



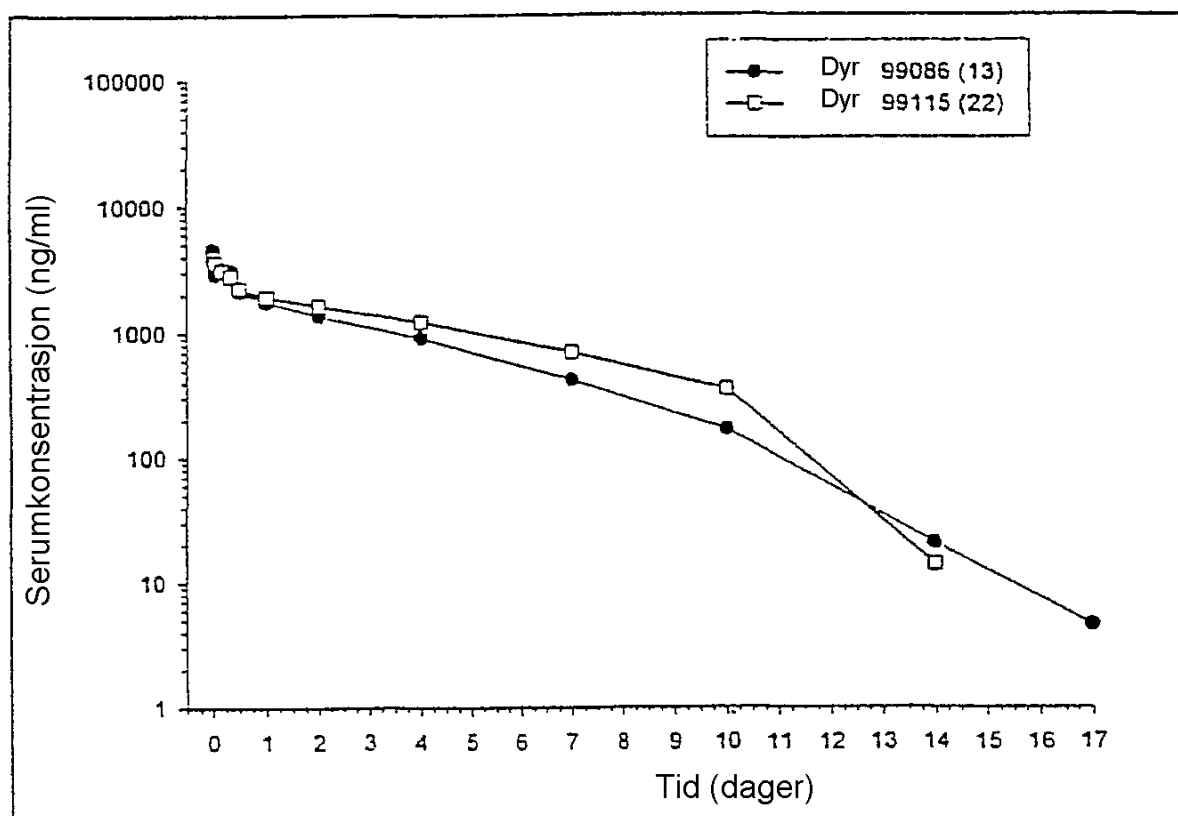
FIGUR 15

Midlere ($\pm$ SD) prosentvis forandring i urin N-Tx-konsentrasjon etter enkelt dose IV ($n = 2/\text{dose}$) eller SC ($n = 6$) administrering av $\alpha\text{OPGL-1}$ 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 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA
41 PGKGLEWVSG ITGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY
81 LQMNSLRAED TAVYYCAKDP GTTVIMSWFD PWGQGTLVTV
121 SS (SEQ ID NO: 13)
```

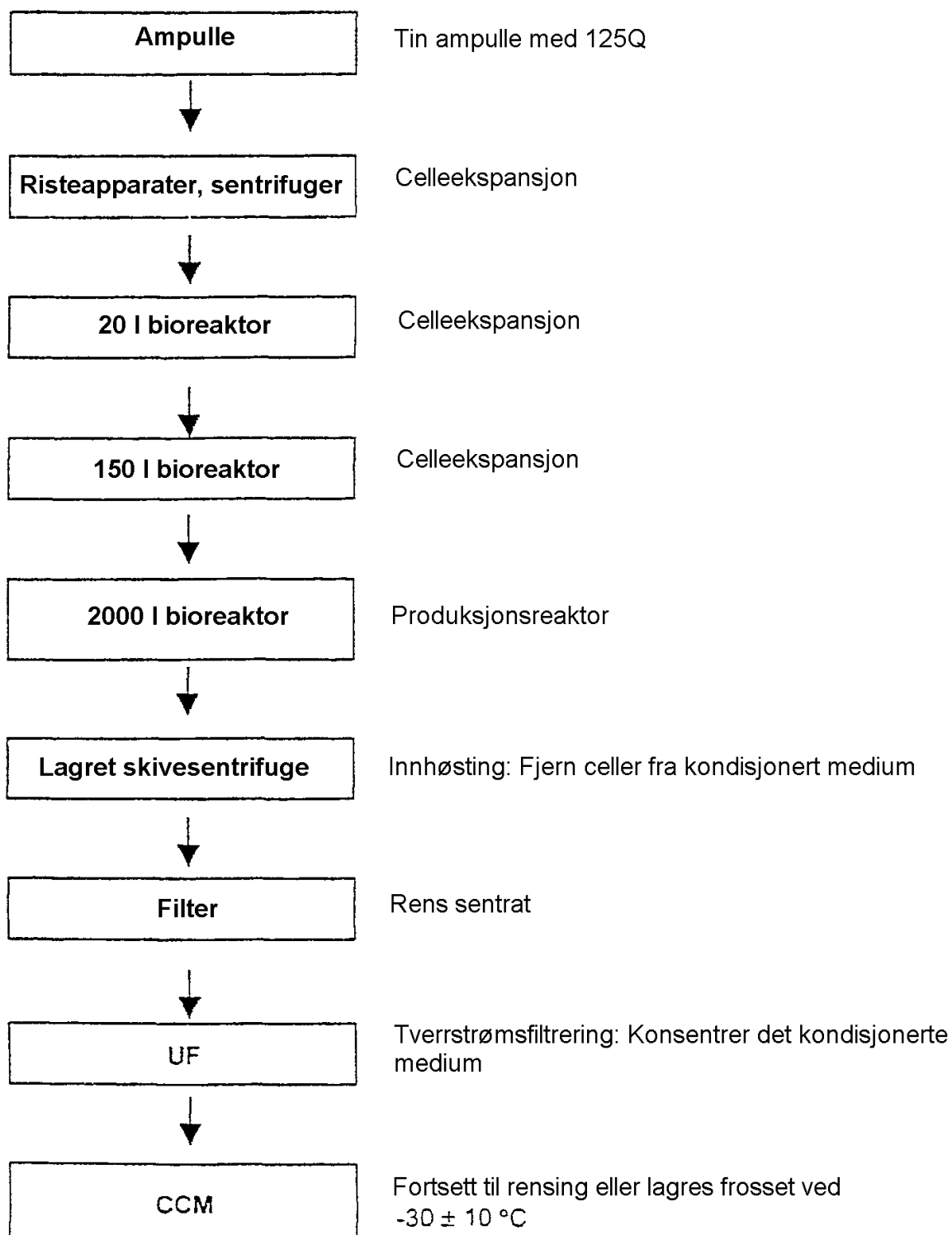
FIGUR 18

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)

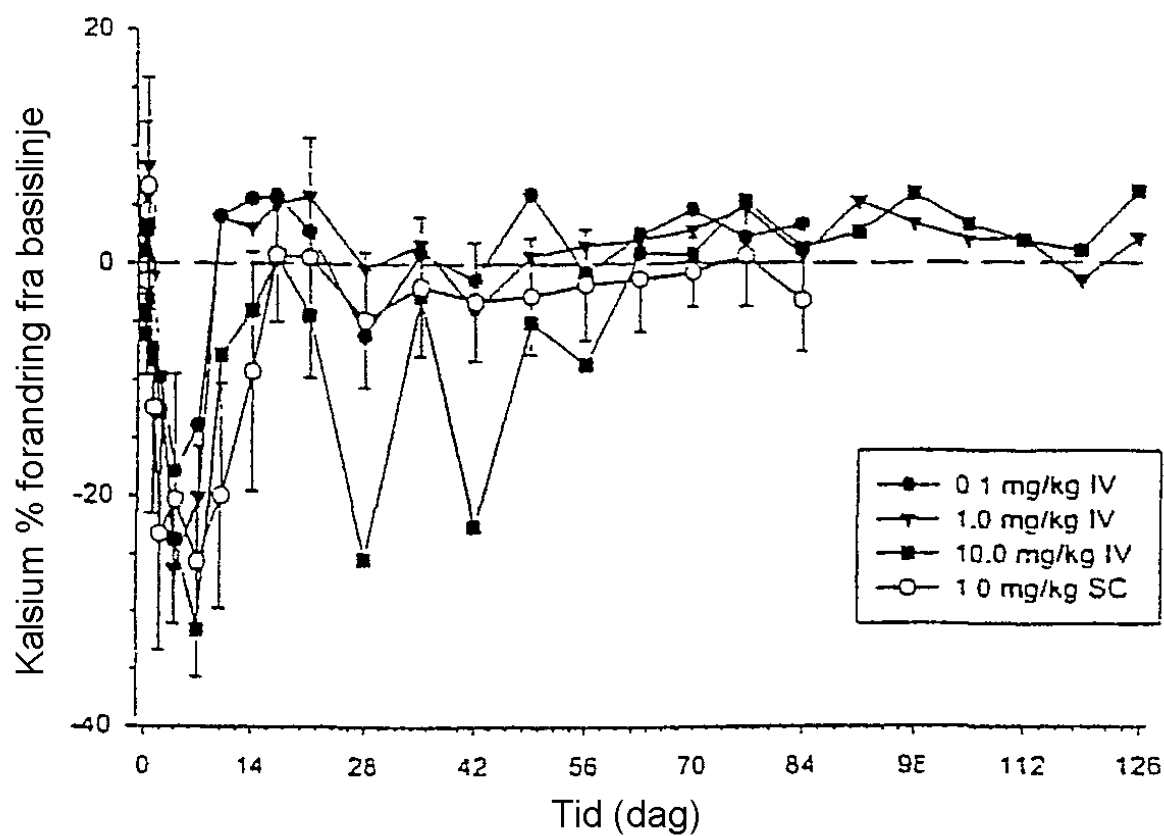
FIGUR 19

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

