



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2059534 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2012.09.03
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2012.04.25
(86)	Europeisk søknadsnr	08714211.3
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.02.21
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2009.05.20
(30)	Prioritet	2007.02.23, US 891409 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
	Utpekte samarbeidende stater	AL BA MK RS
(60)	Utskilt fra	11172014.0 / 2 426 144
(73)	Innehaver	Merck Sharp & Dohme Corp., 126 East Lincoln Avenue, Rahway NJ 07065-0907, USA
(72)	Oppfinner	PRESTA, Leonard, G., 1900 Gough Street, Apt. 206, San Francisco, California 94109, USA BEYER, Brian, M., 4401 Central Avenue, Matawan, New Jersey 07747, USA INGRAM, Richard, N., 1454 Graymill Drive, Scotch Plains, New Jersey 07076, USA ORTH, Peter, 100 West 93rd Street, Apartment 8H, New York, New York 10025, USA LIU, Yan-Hui, 125 Roland Road, Murray Hill, New Jersey 07974, USA
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Modifiserte anti-IL-23p19-antistoffer
(56)	Anførte publikasjoner	US-A1- 2007 009 526 B1 WO-A-2005/052157 B1 WO-A-2006/068987 B1 WO-A-2007/024846 B1 WO-A-2007/027714 B1 WO-A-2007/147019 B1 WO-A1-2008/103473 B1 CHEN YI ET AL: "Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, NEW YORK, NY, US, vol. 116, no. 5, 1 May 2006 (2006-05-01), pages 1317-1326, XP002424834 ISSN: 0021-9738 DAVIES J ET AL: "Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding" IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 2, no. 3, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 169-179, XP004070292 ISSN: 1380-2933

GARBER KEN: "Psoriasis: from bed to bench and back.", NATURE BIOTECHNOLOGY JUL 2011 LNKD- DOI:10.1038/NBT.1906 PUBMED:21747375, vol. 29, no. 7, July 2011 (2011-07), pages 563-566, ISSN: 1546-1696

HOLT L J ET AL: "Domain antibodies: proteins for therapy" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, 1 November 2003 (2003-11-01), pages 484-490, XP004467495 ISSN: 0167-7799

HUNTER CHRISTOPHER A: "New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions" NATURE REVIEWS. IMMUNOLOGY, XX, XX, vol. 5, no. 7, 1 July 2005 (2005-07-01), pages 521-531, XP002455691 ISSN: 1474-1733

LITTLE M ET AL: "Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies" IMMUNOLOGY TODAY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 8, 1 August 2000 (2000-08-01), pages 364-370, XP004215163 ISSN: 0167-5699

NESTLE ET AL: "Evidence for a Role of the Interleukin-23 Pathway in the Pathogenesis of Psoriasis" CLINICAL IMMUNOLOGY, ACADEMIC PRESS, US, vol. 123, 1 January 2007 (2007-01-01), pages S62-S63, XP022076993 ISSN: 1521-6616

RUDIKOFF S ET AL: "Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity.", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA MAR 1982 LNKD- PUBMED:6804947, vol. 79, no. 6, March 1982 (1982-03), pages 1979-1983, ISSN: 0027-8424

SIOBHAN O'BRIEN ET AL: "Humanising Antibodies by CDR Grafting", ANTIBODY ENGINEERING, XX, XX, 1 January 2001 (2001-01-01), page 582, XP002420989,

WEI ZIPING ET AL: "Identification of a single tryptophan residue as critical for binding activity in a humanized monoclonal antibody against respiratory syncytial virus.", ANALYTICAL CHEMISTRY 1 APR 2007 LNKD- PUBMED:17319649, vol. 79, no. 7, 1 April 2007 (2007-04-01), pages 2797-2805, ISSN: 0003-2700

Den foreliggende oppfinnelse gjelder generelt interleukin 23p19 (IL-23p19)-spesifikke antistoffer og anvendelser av dem. Nærmere bestemt gjelder oppfinnelsen humaniserte antistoffer som gjenkjenner humant IL-23p19 og modulerer aktiviteten av dette, nærmere bestemt i inflammatoriske, autoimmune og proliferative forstyrrelser.

OPPFINNELSENS BAKGRUNN

Immunsystemets funksjon er å beskytte individer mot infeksiose agens, for eksempel bakterier, multicellulære organismer og virus, så vel som mot kreft. Systemet omfatter flere typer av lymfoide og myeloide celler, for eksempel monocytter, makrofager, dendrittceller (DC), eosinofile celler, T-celler, B-celler og nøytrofile celler. Disse lymfoide og myeloide cellene produserer ofte signalproteiner som betegnes cytokiner. Immunresponsen omfatter betennelse, dvs. akkumulering av immunceller systemisk eller i et gitt område av kroppen. Som respons på et infeksiosøst agens eller en fremmed forbindelse utskiller immunceller cytokiner, som i sin tur modulerer proliferasjon, utvikling, differensiering eller migrering av immunceller. Immunresponsen kan ha patologiske følger, f.eks. når den omfatter overdreven betennelse, som ved auto-immune sykdommer (se f.eks. Abbas et al. (red.) (2000) *Cellular and Molecular Immunology*, W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA, Oppenheim og Feldmann (red.) (2001) *Cytokine Reference*, Academic Press, San Diego, CA, von Andrian og Mackay (2000) *New Engl. J. Med.* 343:1020-1034, Davidson og Diamond (2001) *New Engl. J. Med.* 345:340-350).

Interleukin 12 (IL-12) er et heterodimert molekyl som består av en p35- og en p40-subenhet. Undersøkelser har vist at IL-12 spiller en avgjørende rolle i differensieringen av naive T-celler til T-hjelper type 1 CD4⁺-lymfocytter, som utskiller IFN γ . Det har også blitt vist at IL-12 er essensiell for T-celleavhengige immunresponser og inflammatoriske responser in vivo. Se for eksempel Cua et al. (2003) *Nature* 421:744-748. IL-12-reseptoren består av subenhetene IL-12 β 1 og IL-12 β 2.

Interleukin 23 (IL-23) er et heterodimert cytokin som omfatter to subenheter, p19, som bare forekommer i IL-23, og p40, som også foreligger i IL-12. p19-subenheten er strukturelt beslektet med IL-6, granulocyt-kolonistimulerende faktor (G-CSF) og p35-subenheten i IL-12. IL-23 formidler signalisering ved å bindes til en heterodimer reseptor som består av IL-23R og IL-12 β 1, som også foreligger i IL-12-reseptoren. En rekke tidlige undersøkelser viste at følgene av en genetisk mangel av p40 (p40-*knockout*-mus, p40KO-mus) var alvorligere enn følgene påvist i en p35KO-mus. Noen av disse resultatene ble senere forklart ved oppdagelsen av IL-23 og det funn at p40KO ikke bare hindrer ekspresjon av IL-12, men også av IL-23 (se f.eks. Oppmann et al. (2000) *Immunity* 13:715-725, Wiekowski et al. (2001) *J. Immunol.* 166:7563-

7570, Parham et al. (2002) *J. Immunol.* 168:5699-708, Frucht (2002) *Sci STKE* 2002, E1-E3, Elkins et al. (2002) *Infection Immunity* 70:1936-1948).

Nyere undersøkelser har ved anvendelse av p40 KO-mus vist at blokkering av både IL-23 og IL-12 er en effektiv behandling av forskjellige inflammatoriske og autoimmune sykdommer. Blokkering av IL-12 via p40 ser imidlertid ut til å ha forskjellige systemiske konsekvenser, som økt utsatthet for opportunistiske mikrobielle infeksjoner. Bowman et al. (2006) *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19:245.

Terapeutiske antistoffer kan anvendes for å blokkere cytokinaktivitet. Den viktigste begrensingen ved anvendelse av antistoffer som terapeutiske midler *in vivo* er antistoffenes immunogenisitet. Siden de fleste monoklonale antistoffer er avledet fra gnagere, fører gjentatt bruk av dem i mennesker til utløsning av en immunrespons mot det terapeutiske antistoffet. En slik immunrespons fører i det minste til tap av terapeutisk virkning, og i verste fall til en, muligens fatal, anafylaktisk respons. Innledende forsøk på å redusere immunogenisiteten av gnagerantistoffer omfattet fremstilling av kimære antistoffer, i hvilke variable områder fra mus var fusjonert til humane konstante områder. Liu et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-43. Mus injisert med hybrider av humane variable områder og konstante områder fra mus utvikler imidlertid en kraftig anti-antistoffreaksjon rettet mot det humane variable området, noe som tyder på at bevaringen av hele gnager-Fv-området i slike kimære antistoffer fortsatt kan føre til uønsket immunogenisitet i pasienter.

Det antas generelt at komplementaritetsbestemmende område (CDR)-løkker i variable domener utgjør antistoffmolekylers bindingssete. Kobling av CDR-løkker fra gnagere til humane rammeverk (dvs. humanisering) ble forsøkt for ytterligere å redusere innholdet av gnagersekvenser. Jones et al. (1986) *Nature* 321:522, Verhoeyen et al. (1988) *Science* 239:1534. Utbygging av CDR-løkker fører imidlertid fortsatt ikke alltid til et antistoff med de samme bindingsegenskaper som utgangsansistoffet. Endringer av aminosyrerester i rammeverket (FR), aminosyrerester som deltar i oppstøtting av CDR-løkker, i humaniserte antistoffer er også nødvendig for å bevare antistoffets bindingsaffinitet. Kabat et al. (1991) *J. Immunol.* 147:1709. Selv om anvendelse av CDR-overføring og bevaring av rammeverk-aminosyrerester har blitt rapportert i en rekke humaniserte antistoffkonstruksjoner, er det vanskelig å forutsi hvorvidt en gitt sekvens vil gi et antistoff med de ønskede bindingsegenskaper, og i blant også biologiske egenskaper. Se f.eks. Queen et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029, Gorman et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4181, og Hodgson (1991) *Biotechnology (NY)* 9:421-5. Videre har de fleste tidligere undersøkelser benyttet forskjellige humane sekvenser for variable sekvenser fra tung- og lett kjeden fra dyr, noe som gjør de prediktive egenskapene til slike studier tvilsomme. Man har benyttet sekvensene til kjente

antistoffer, eller mer typisk, sekvenser fra antistoffer med kjent røntgenstruktur, antistoffene NEW og KOL. Se for eksempel Jones et al., supra, Verhoeyen et al., supra, og Gorman et al., supra. Nøyaktig sekvensinformasjon har blitt rapportert for noen få humaniserte antistoffer. Eksempler på konstruerte antistoffer mot IL-12p19 beskrives i de felles anviste U.S. Foreløpige Patentsøknader nr. 60/891 409 og 60/891 413 (begge innlevert 23. februar 2007), i U.S. Patentsøknader nr. 2007/0009526 og 2007/0048315, og i Internasjonale Patentpublikasjoner nr. WO 2007/076524, WO 2007/024846 og WO 2007/147019.

Det foreligger et behov for anti-huIL-23p19-antistoffer for anvendelse f.eks. ved behandling av inflammatoriske, autoimmune og proliferative forstyrrelser. Slike antistoffer er fortrinnsvis konstruert ved å innføre humane kimbanesekvenser for å redusere immunogenisiteten i mennesker, f.eks. i rammeverkområdene. Slike antistoffer vil fortrinnsvis ha høy affinitet for huIL-23p19 og vil bindes med høy spesifisitet til huIL-23p19.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

Den foreliggende oppfinnelse er som definert i kravene. Den foreliggende beskrivelse tilveiebringer bindende forbindelser, for eksempel et antistoff eller et antistoffragment, innbefattet humaniserte eller kimære rekombinante antistoffer, som binder human IL-23p19, som omfatter et variabelt domene fra en antistoff-lettkjede eller et antigenbindende fragment derav med minst ett, to eller tre CDR utvalgt fra gruppen som består av SEK.ID. nr. 32-46. I en utførelse omfatter den bindende forbindelsen ifølge oppfinnelsen et variabelt lettkjededomene som omfatter minst en CDRL1 utvalgt fra gruppen som består av SEK.ID. nr. 32-36, minst en CDRL2 utvalgt fra gruppen som består av SEK.ID. nr. 37-41 og minst en CDRL3 utvalgt fra gruppen som består av SEK. ID. nr. 42-46.

I en utførelse omfatter den bindende forbindelsen et variabelt domene fra en antistoff-tungkjede eller et antigenbindende fragment derav med minst ett, to eller tre CDR utvalgt fra gruppen som består av SEK.ID. nr. 15-31. I en utførelse omfatter den bindende forbindelsen ifølge oppfinnelsen et variabelt tungkjededomene som omfatter minst en CDRH1 utvalgt fra gruppen som består av SEK.ID. nr. 15-19, minst en CDRH2 utvalgt fra gruppen som består av SEK.ID. nr. 20-26 og minst en CDRH3 utvalgt fra gruppen som består av SEK. ID. nr. 27-31.

I andre utførelser omfatter den bindende forbindelsen ifølge oppfinnelsen et variabelt lettkjededomene og et variabelt tungkjededomene eller de antigenbindende fragmentene av disse som er beskrevet i de to avsnittene ovenfor.

I noen utførelser omfatter den bindende forbindelsen et rammeverkområde, hvori aminosyresekvensen i rammeverkområdet er hele eller i det vesentlige hele av en human immunglobulin-aminosyresekvens.

I noen utførelser omfatter lettkjedens og/eller tungkjedens variable domener en variant av et eller flere av CDR-sekvensene. I forskjellige utførelser omfatter domenevarianten opp til 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 eller flere konservativt modifiserte aminosyrerester sammenlignet med sekvensene med de angjeldende SEK.ID. nr. Konservative aminosyresubstitusjoner vises i Tabell 1.

I noen utførelser omfatter det variable lettkjededomenet aminosyrerestene 1-108 i SEK.ID. nr. 14 eller en variant av denne. I noen utførelser omfatter det variable tungkjededomenet en sekvens utvalgt fra gruppen som består av aminosyrerestene 1-116 i SEK.ID. nr. 6-8, f.eks. SEK.ID. nr. 6, SEK.ID. nr. 7 eller SEK.ID. nr. 8. I forskjellige utførelser omfatter variabelt domene-varianten opp til 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 eller flere konservativt modifiserte aminosyrerester sammenlignet med sekvensene med de angjeldende SEK.ID. nr. I nok en utførelse omfatter den bindende forbindelsen et variabelt lettkjededomene og et variabelt tungkjededomene eller de antigenbindende fragmentene av disse som er beskrevet i dette avsnittet.

I en utførelse omfatter den bindende forbindelsen en lettkjedeseqvens ifølge SEK.ID. nr. 14 og/eller en tungkjedeseqvens utvalgt fra gruppen som består av SEK.ID. nr. 6-8.

I andre utførelser omfatter den bindende forbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse et variabelt lettkjededomene eller et antigenbindende fragment derav som i det vesentlige består av aminosyrerestene 1-108 i SEK.ID. nr. 14, og/eller et variabelt tungkjededomene eller et antigenbindende fragment derav som i det vesentlige består av en sekvens utvalgt fra gruppen som består av aminosyrerestene 1-116 i SEK.ID. nr. 6-8, f.eks. SEK.ID. nr. 6, SEK.ID. nr. 7 eller SEK.ID. nr. 8.

I andre utførelser omfatter den bindende forbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse et variabelt lettkjededomene eller et antigenbindende fragment derav med minst 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% eller 99% sekvenshomologi med aminosyre-restene 1-108 i SEK.ID. nr. 14, og/eller et variabelt tungkjededomene eller et antigenbindende fragment derav med minst 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% eller 99% sekvenshomologi med en sekvens utvalgt fra gruppen som består av aminosyrerestene 1-116 i SEK.ID. nr. 6-8, f.eks. SEK.ID. nr. 6, SEK.ID. nr. 7 eller SEK.ID. nr. 8.

I en utførelse bindes den bindende forbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse til humant IL-23p19 (SEK.ID. nr. 47) i en epitop som omfatter aminosyrerestene 20-30, aminosyrerestene 82-110 eller begge disse områdene. I en annen utførelse bindes den

IL-23p19-bindende forbindelsen til en epitop som omfatter noen eller alle av aminosyrerestene K20, T23, W26, S27, P30, E82, S95, L96, L97, P98, D99, P101, G103, Q104, H106, A107 og L110, og om ønskelig aminosyrerestene L24, L85, T91, S100 og V102. I forskjellige utførelser identifiseres epitopen for et antistoff av interesse ved å erholde en røntgenkrystallstruktur av et antistoff-antigenkompleks og fastslå hvilke aminosyrerester i IL-23-p19 som ligger innenfor en angitt avstand fra aminosyrerester i antistoffet av interesse, hvor den angitte avstand er f.eks. 4Å eller 5Å. I noen utførelser er epitopen definert som et strekk av 11 eller flere på hverandre følgende aminosyrerester langs IL-23p19-sekvensen, hvor minst 30%, 40%, 50% eller 54% av aminosyrerestene ligger innenfor den angitte avstand fra antistoffet.

I en utførelse gjelder oppfinnelsen antistoffer som kan blokkere bindingen av en bindende forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse til humant IL-23 i en kryssblokkeringsanalyse. I en annen utførelse gjelder oppfinnelsen bindende forbindelser som kan blokkere IL-23-formidlet aktivitet, hvor slike aktiviteter omfatter, men ikke er begrenset til, binding til reseptoren for IL-23 og fremme proliferasjon eller overlevelse av T_H17-celler.

I noen utførelser omfatter det konstante tungkjedeområdet et human konstant γ 1-, γ 2-, γ 3- eller γ 4-tungkjedeområde eller en variant derav. I forskjellige utførelser omfatter det konstante lettkjedeområdet en human konstant lambda- eller kappa-lettkjedeområde.

I forskjellige utførelser er antistoffet eller det antigenbindende fragment derav ifølge oppfinnelsen polyklonale, monoklonale, kimære, humaniserte eller fullt ut humane antistoffer eller fragmenter derav. Foreliggende oppfinnelse omfatter også at det antigenbindende fragment er et antistofffragment utvalgt fra gruppen som består av f.eks. Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂ og et diastoff.

Foreliggende oppfinnelse omfatter en fremgangsmåte for undertrykkelse av en immunrespons i et menneske som omfatter tilførsel til et individ med behov for dette av et antistoff (eller et antigenbindende fragment derav) spesifikt for IL-23 i en mengde som effektivt blokkerer den biologiske aktiviteten av IL-23. I noen utførelser er antistoffet som er spesifikt for IL-23 det humaniserte eller kimære antistoff. I andre utførelser er immunresponsen en inflammatorisk respons, innbefattet artritt, psoriasis og inflammatorisk tarmsykdom. I andre utførelser er immunresponsen en autoimmun sykdom, innbefattet multippel sklerose, uveitt, systemisk lupus erythematosus og diabetes. I en annen utførelse har individet kreft, og immunresponsen er en Th17-respons.

Den foreliggende oppfinnelse omfatter også tilførsel av ytterligere et immunsupprimerende eller antiinflammatorisk middel. Antistoffet eller det antigenbindende frag-

ment derav ifølge foreliggende oppfinnelse kan foreligge i et farmasøytisk preparat som omfatter den bindende forbindelse eller det antigenbindende fragment derav i kombinasjon med et farmasøytisk aksepterbart bærestoff eller fortynningsmiddel. I en videre utførelse omfatter det farmasøytiske preparatet videre et immunsupprimerende eller antiinflammatorisk middel.

Foreliggende oppfinnelse omfatter en isolert nukleinsyre som koder for polypeptid-sekvensen til en antistoffutførelse av den bindende forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse. Nukleinsyren kan foreligge i en ekspresjonsvektor, operativt koblet til kontrollsekvenser som gjenkjennes av en vertscelle som er transfektet med vektoren. Videre omfattes en vertscelle som omfatter vektoren og en fremgangsmåte for fremstilling av et polypeptid, som omfatter dyrking av vertscellen under betingelser hvor nukleinsyresekvensen uttrykkes slik at polypeptidet dannes, og gjenvinning av polypeptidet fra vertscellen eller mediet.

I forskjellige utførelser gjelder oppfinnelsen anvendelse av et antistoff eller et antigenbindende fragment derav ifølge foreliggende oppfinnelse for fremstilling av medikamenter for behandling av forstyrrelser som omfatter, men ikke er begrenset til, betennelsessykdom, autoimmun sykdom, kreft, infeksjonssykdom (f.eks. bakteriell, mykobakteriell eller viral infeksjon eller soppinfeksjon, innbefattet kroniske infeksjoner), artritt, psoriasis, inflammatorisk tarmsykdom, multipel sklerose, uveitt, systemisk lupus erythematosus og diabetes.

I andre utførelser gjelder oppfinnelsen farmasøytiske preparater som omfatter et antistoff eller et antigenbindende fragment ifølge foreliggende oppfinnelse for behandling av forstyrrelser som omfatter, men ikke er begrenset til, betennelsessykdom, autoimmun sykdom, kreft, infeksjonssykdom (f.eks. bakteriell, mykobakteriell eller viral infeksjon eller soppinfeksjon, innbefattet kroniske infeksjoner), artritt, psoriasis, inflammatorisk tarmsykdom, multipel sklerose, uveitt, systemisk lupus erythematosus og diabetes.

I noen utførelser induserer antistoffet, det antigenbindende fragment derav eller det farmasøytiske preparat ifølge oppfinnelsen en langvarig periode med tilfriskning fra sykdomssymptomer i et individ, slik at doseringsintervallet kan utvides til mye lenger tid enn halveringstiden av den bindende forbindelse i individet, for eksempel ved behandling av en relapserende-remitterende sykdom. I forskjellige utførelser er tidsrommet mellom én tilførsel og den neste 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24 eller 30 uker eller mer. I andre utførelser er en enkelt tilførsel tilstrekkelig til permanent å forhindre tilbakefall.

KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

Figur 1 viser en sammenligning mellom sekvenser fra variable tungkjededomener fra kloner av anti-humant IL-23p19-antistoff fra mus. Det vises sekvenser fra klonene m1A11, m11C1, m5F5, m21D1, m13B8, h13B8a, h13B8b og h13B8c. CDR-områdene er avmerket. I begge figurer betegner prefikset "m" et museantistoff og "h" et humanisert antistoff. Suffiksene "a", "b" og "c" viser til sekvensvarianter av det variable tungkjededomenet i det humaniserte 13B8, som diskutert i mer detalj nedenfor.

Figur 2 viser en sammenligning mellom sekvenser fra variable lettkjededomener fra kloner av anti-humant IL-23p19-antistoff fra mus. Det vises sekvenser fra klonene m1A11, m11C1, m5F5, m21D1, m13B8 og h13B8. CDR-områdene er avmerket.

DETALJERT BESKRIVELSE

Som anvendt heri, innbefattet i de vedlagte krav, omfatter entallsformen av ord som "en", "et", "den" og "det" også de tilsvarende flertallsformer, med mindre sammenhengen klart tilsier noe annet. Tabell 7 nedenfor opplister sekvensbetegnelse som benyttes i denne patentsøknaden. Henvisningene til referansene heri er ikke ment som en innrømmelse av at noen av disse utgjør relevant kjent teknikk og utgjør heller ingen innrømmelser når det gjelder innholdet i eller datoen for disse publikasjonene eller dokumentene.

I. Definisjoner

"Proliferativ aktivitet" omfatter en aktivitet som fremmer, er nødvendig for eller spesifikt er assosiert med f.eks. normal celledeling, så vel som kreft, tumorer, dysplasi, celletransformasjon, metastase og angiogenese.

"Tilførsel" og "behandling", anvendt på et dyr, et menneske, et forsøksobjekt, en celle, et vev, et organ eller en biologisk væske, viser til kontakt mellom et eksogent farmasøytisk, terapeutisk eller diagnostisk middel eller preparat og dyret, mennesket, individet, cellen, vevet, organet eller den biologiske væsken. "Tilførsel" og "behandling" kan f.eks. vise til terapeutiske, farmakokinetiske, diagnostiske, forskningsmessige og eksperimentelle fremgangsmåter. Behandling av en celle omfatter kontakt mellom et reagens og cellen, så vel som kontakt mellom et reagens og en væske, hvor væsken er i kontakt med cellen. "tilførsel" og "behandling" betyr også *in vitro*- og *ex vivo*-behandling, for eksempel av en celle, med et reagens, et diagnostisk middel, en bindende sammensetning eller med en annen celle. "Behandling" benyttet om et menneske, et veterinærmedisinsk objekt eller et forskningsobjekt viser til terapeutisk behandling, profylaktiske eller forebyggende tiltak, forskningsanvendelser og diagnostiske anven-

delser. "Behandling" anvendt om et menneske, et veterinærmedisinsk objekt, et forskningsobjekt, en celle, et vev eller et organ omfatter kontakt mellom et middel og et dyr, en celle, et vev, en fysiologisk seksjon eller en fysiologisk væske. "Behandling av en celle" omfatter også situasjoner i hvilke middelet er i kontakt med IL-23 reseptoren (IL-23R/IL-12Rbeta1-heterodimer), for eksempel i væskefase eller kolloidal fase, men også situasjoner i hvilke agonisten eller antagonisten ikke er i kontakt med cellen eller reseptoren.

Som anvendt heri viser begrepet "antistoff" til enhver antistoff-form som viser den ønskede biologiske aktivitet. Det anvendes følgelig i sin bredeste betydning og omfatter spesifikt monoklonale antistoffer (innbefattet monoklonale antistoffer av full lengde), polyklonale antistoffer, multispesifikke antistoffer (f.eks. bispesifikke antistoffer), kimære antistoffer, humaniserte antistoffer, fullt ut humane antistoffer og så videre, så lenge som de fremviser den ønskede biologiske aktivitet.

Som anvendt heri omfatter begrepene "IL-23p19-bindende fragment", "bindende fragment derivat" eller "antigenbindende fragment derivat" et fragment eller derivat av et antistoff som fortsatt i det vesentlige har bevart sin biologiske aktivitet, å inhibere IL-23p19-aktivitet. Begrepet "antistofffragment" eller IL-23p19-bindende fragment viser følgelig til en del av et full-lengde-antistoff, generelt det antigenbindende eller variable område i dette. Eksempler på antistofffragmenter omfatter Fab-, Fab'-, F(ab')₂- og Fv-fragmenter, diastoffer, lineære antistoffer, enkeltkjedede antistoffmolekyler, f.eks. scFv, og multispesifikke antistoffer oppbygd av antistofffragmenter. Et bindende fragment eller derivat har typisk bevart minst 10% av sin IL-23p19-inhiberende aktivitet. Fortrinnsvis har et bindende fragment eller derivat bevart minst 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% eller 100% (eller mer) av sin IL-23p19-inhiberende aktivitet, selv om ethvert bindende fragment med tilstrekkelig affinitet til å utøve den ønskede biologiske virkning vil være anvendbart. Det er også meningen at et IL-23p19-bindende fragment kan omfatte varianter med konservative aminosyresubstitusjoner som ikke i vesentlig grad endrer den biologiske aktivitet.

Begrepet "monoklonalt antistoff" viser som det anvendes heri til et antistoff erholdt fra en populasjon av i det vesentlige homogene antistoffer, dvs. at de enkelte antistoffene som utgjør populasjonen er identiske, bortsett fra mulige naturlig forekommende mutasjoner som kan foreligge i mindre mengder. Monoklonale antistoffer er svært spesifikke, siden de er rettet mot en enkelt antigen epitop. I motsetning til dette omfatter konvensjonelle (polyklonale) antistoffpreparater typisk et stort antall antistoffer rettet mot (eller spesifikke for) forskjellige epitoper. Adjektivet "monoklonalt" angir at antistoffet er erholdt fra en i det vesentlige homogen populasjon av antistoffer, og skal ikke oppfattes slik at det krever at antistoffet er fremstilt ved spesielle fremgangsmåter. For

eksempel kan de monoklonale antistoffene som skal anvendes i samsvar med den foreliggende oppfinnelse være fremstilt ved hjelp av hybridom-fremgangsmåten, først beskrevet av Kohler et al. (1975) *Nature* 256, 495, eller fremstilt ved rekombinant DNA-fremgangsmåter (se f.eks. U.S. Patentskrift nr. 4816567). De "monoklonale antistoffene" kan også være isolert fra antistoffbiblioteker i bakteriofager ved anvendelse av teknikkene som beskrives i for eksempel Clackson et al. (1991) *Nature* 352: 624-628 og Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222, 581-597.

De monoklonale antistoffene heri omfatter spesifikt "kimære" antistoffer (immunglobuliner), i hvilke en del av tungkjeden og/eller lett kjeden er identisk eller homolog med tilsvarende sekvenser i antistoffer avledet fra en gitt art eller tilhørende en gitt antistoffklasse eller -underklasse, mens resten av kjeden(e) er identiske eller homologe med tilsvarende sekvenser i antistoffer avledet fra en annen art eller tilhørende en annen antistoffklasse eller -underklasse, så vel som fragmenter av slike antistoffer, så lenge som de fremviser den ønskede biologiske aktivitet. U.S. Patentskrift. nr. 4816567, Morrison et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855.

Et "domeneantistoff" er et immunologisk funksjonelt immunglobulinfragment som kun inneholder det variable området fra en tungkjede eller det variable området fra en lett kjede. I noen tilfeller er to eller flere V_H -områder kovalent sammenkoblet med en peptid-linker, slik at det dannes et bivalent domeneantistoff. De to V_H -områdene i et bivalent domeneantistoff kan være rettet mot samme antigen eller forskjellige antigener.

Et "bivalent" antistoff omfatter to antigenbindende seter. I noen tilfeller har de to bindende setene samme antigenspesifisitet. Bivalente antistoffer kan imidlertid være bispesifikke (se nedenfor).

Som anvendt heri viser begrepet "enkeltkjedet Fv"- eller "scFv"-antistoff til antistofffragmenter som omfatter V_H - og V_L -antistoffdomener, hvori disse domenene foreligger i en enkelt polypeptidkjede. Generelt omfatter Fv-polypeptidet videre en polypeptid-linker mellom V_H - og V_L -domenet som gjør det mulig for sFv å danne den ønskede struktur for antigenbinding. For en oversikt over sFv, se Pluckthun (1994) *THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES*, bind 113, Rosenberg og Moore, red., Springer-Verlag, New York, s. 269-315.

De monoklonale antistoffene heri omfatter også kameliserte enkeltdomeneantistoffer. Se f.eks. Muyldermans et al. (2001) *Trends Biochem. Sci.* 26:230, Reichmann et al. (1999) *J. Immunol. Methods* 231:25, WO 94/04678, WO 94/25591, U.S. Patentskrift nr. 6005079). I en utførelse tilveiebringer foreliggende oppfinnelse enkeltdomeneantistoffer som omfatter to V_H -domener med modifikasjoner som gjør at enkeltdomeneantistoffer dannes.

Som anvendt heri viser begrepet "diastoffer" til små antistofffragmenter med to antigenbindende seter, hvor fragmentene omfatter et variabelt tungkjededomene (V_H) koblet til et variabelt lett kjededomene (V_L) i samme polypeptidkjede (V_H - V_L eller V_L - V_H). Ved anvendelse av en linker som er for kort til å tillate parring mellom de to domenene i samme kjede, tvinges domenene til å danne par med de komplementære domenene i en annen kjede og danne to antigenbindende seter. Diastoffer beskrives i mer detalj i f.eks. EP 404097, WO 93/11161, og Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448. For en oversikt over modifiserte antistoffvarianter generelt, se Holliger og Hudson (2005) Nat. Biotechnol. 23:1126-1136.

Som anvendt heri viser begrepet "humanisert antistoff" viser til antistoff-former som inneholder sekvenser fra ikke-humane antistoffer (f.eks. fra mus), så vel som fra humane antistoffer. Slike antistoffer inneholder minimal sekvens avledet fra ikke-humant immunglobulin. Generelt vil det humaniserte antistoffet omfatte i det vesentlige hele av minst ett, og typisk to, variable domener, i hvilke alle eller i det vesentlige alle de hypervariable løkkene tilsvarer løkkene i et ikke-humant immunglobulin, og alle, eller i det vesentlige alle, FR-områdene er områder fra en human immunglobulin-sekvens. Det humaniserte antistoff vil også om ønskelig omfatte i det minst en del av et konstant immunglobulinområde (Fc), typisk fra et humant immunglobulin. Prefikset "hum", "hu" eller "h" adderes til antistoffklonbetegnelser dersom det er nødvendig å skille mellom humaniserte antistoffer (f.eks. hum13B8) og utgangsansistoffer fra gnagere (f.eks. muse-13B8 eller m13B8). De humaniserte formene av gnagerantistoffer vil generelt omfatte de samme CDR-sekvensene som utgangsansistoffene fra gnagere, selv om visse aminosyresubstitusjoner kan være innført for å øke affiniteten, øke stabiliteten av det humaniserte antistoff eller av andre grunner.

Antistoffene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter også antistoffer med modifiserte (eller blokkerte) Fc-områder for å oppnå endrede effektorfunksjoner. Se f.eks. U.S. Patentskrift nr. 5 624 821, WO2003/086310, WO2005/120571, WO2006/0057702, Presta (2006) Adv. Drug Delivery Rev. 58:640-656. Slik modifisering kan anvendes for å forsterke eller svekke forskjellige reaksjoner i immunsystemet, med mulige gunstige virkninger i diagnose og terapi. Endringer i Fc-området omfatter aminosyre-endringer (substitusjoner, delesjoner og insersjoner), glykosylering eller deglykosylering, og addering av flere Fc. Endringer i Fc kan også endre halveringstiden for antistoffer i terapeutiske antistoffer, og en lengre halveringstid vil føre til mindre hyppig dosering, med medfølgende økt bekvemmelighet og redusert bruk av materiale. Se Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116:731 på s. 734-35.

Begrepet "fullt ut humant antistoff" viser til et antistoff kun omfatter humane immunglobulin-proteinsekvenser. Et fullt ut humant antistoff kan inneholde karbohydratkjeder

fra mus dersom det er fremstilt i en mus, en musecelle eller en hybridom avledet fra en musecelle. På tilsvarende måte viser "museantistoff" til et antistoff som kun omfatter muse-immunglobulinsekvenser. Et fullt ut humant antistoff kan være frembrakt i et menneske, i et transgent dyr med immunglobulinsekvenser fra den humane kimbannen, ved bakteriofag-fremvisning eller ved hjelp av andre molekylærbiologiske fremgangsmåter.

Som anvendt heri viser begrepet "hypervariabelt område" til de aminosyrerester i et antistoff som er ansvarlige for bindingen av antigen. Det hypervariable området omfatter aminosyrerester fra et "komplementaritetsbestemmende område" eller "CDR" (f.eks. aminosyrerestene 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) og 89-97 (CDRL3) i lett-kjedens variable domene og aminosyrerestene 31-35 (CDRH1), 50-65 (CDRH2) og 95-102 (CDRH3) i tungkjedens variable domene (Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. utgave. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.), og/eller aminosyrerestene fra en "hypervariabel løkke" (dvs. aminosyrerestene 26-32 (L1), 50-52 (L2) og 91-96 (L3) i lett-kjedens variable domene og 26-32 (H1), 53-55 (H2) og 96-101 (H3) i tungkjedens variable domene (Chothia og Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917). Som anvendt heri viser begrepet "rammeverk"- eller "FR"-aminosyrerester til de aminosyrerester i de variable domene som ikke er aminosyrerester i hypervariable domener, heri definert som CDR-aminosyrerester. Nummereringen av aminosyrerester ovenfor gjelder Kabat-nummereringssystemet og tilsvarer ikke nødvendigvis i detalj sekvensnummereringen i den vedlagte Sekvensliste.

"Bindende forbindelse" viser til et molekyl, et lite molekyl, et makromolekyl, et polypeptid, et antistoff eller et fragment eller en analog derav, eller en løselig reseptor som kan bindes til et mål. "Bindende forbindelse" kan også vise til et kompleks av molekyler, f.eks. et ikke-kovalent kompleks, til et ionisert molekyl og til et kovalent eller ikke-kovalent modifisert molekyl, f.eks. modifisert ved fosforylering, acylering, kryssbinding, syklisering eller begrenset kløyving, som kan bindes til et mål. Anvendt ved henvisning til antistoffer viser begrepet "bindende forbindelse" til både antistoffer og bindende fragmenter av antistoffer. "Binding" viser til en assosiasjon mellom den bindende sammensetning og et målmolekyl, hvor assosiasjonen fører til en reduksjon av den bindende sammensetnings normale brownske bevegelse, i tilfeller hvor den bindende sammensetning kan løses eller suspenderes i løsning. "Bindende sammensetning" viser til et molekyl, f.eks. et bindende molekyl, i kombinasjon med en stabilisator, en eksipiens, et salt, en buffer, et løsemiddel eller et tilsetningsstoff, som kan bindes til et mål.

”Konservativt modifiserte varianter” eller ”konservativ substitusjon” viser til substitusjoner av aminosyrer som er kjente blant fagfolk og som generelt kan innføres uten å endre den biologiske aktiviteten av det resulterende molekyl, selv i essensielle områder i polypeptidet. Slike eksemplariske substitusjoner innføres fortrinnsvis i samsvar med substitusjonene som beskrives i Tabell 1 som følger:

Tabell 1

Eksempler på konservative aminosyresubstitusjoner	
Opprinnelig	aminosyrerest Konservativ substitusjon
Opprinnelig aminosyrerest	Konservativ substitusjon
Ala (A)	Gly, Ser
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln, His
Asp (D)	Glu, Asn
Cys (C)	Ser, Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp, Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn, Gln
Ile (I)	Leu, Val
Leu (L)	Ile, Val
Lys (K)	Arg, His
Met (M)	Leu, Ile, Tyr
Phe (F)	Tyr, Met, Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe
Tyr (Y)	Trp, Phe
Val (V)	Ile, Leu

I tillegg vet fagfolk at enkeltvise aminosyresubstitusjoner i ikke-essensielle deler av et polypeptid generelt ikke endrer biologisk aktivitet i vesentlig grad. Se f.eks. Watson et al. (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., s. 224 (4. utgave).

Uttrykket ”består i det vesentlige av” eller varianter som ”i det vesentlige bestående av” angir, som det brukes i beskrivelsen og kravene, innbefattelse av alle angitte elementer eller grupper av elementer, og om ønskelig innbefattelse av andre elementer av lignende eller forskjellig natur enn de angitte elementene som ikke i vesentlig grad endrer de basale eller nye egenskapene til det angitte doseringsskjema, den angitte fremgangsmåte eller den angitte sammensetning. Som et ikkebegrensende eksempel kan en bindende forbindelse som i det vesentlige består av en angitt aminosyresekvens også omfatte en eller flere aminosyrer, innbefattet substituering av en eller flere aminosyrerester, som ikke i vesentlig grad egner den bindende forbindelsens egenskaper.

”Effektiv mengde” omfatter en mengde som er tilstrekkelig til å lindre eller forhindre et symptom eller tegn på den medisinske tilstanden. Effektiv mengde betyr også en mengde som er tilstrekkelig til å tillate eller lette diagnose. En effektiv mengde for en gitt pasient eller et gitt veterinærmedisinsk objekt kan variere, avhengig av faktorer som tilstanden som behandles, pasientens generelle helsetilstand, metodens tilførselsvei og tilførte dose, og omfanget av bivirkninger. Se for eksempel U.S. Patentskrift nr. 5888530. En effektiv mengde kan være den maksimale dose eller doseringsprotokoll som unngår vesentlige bivirkninger eller toksiske virkninger. Virkningen vil føre til en forbedring av et diagnostisk mål eller en diagnostisk parameter med minst 5%, vanligvis med minst 10%, mer vanlig minst 20%, mest vanlig minst 30%, fortrinnsvis minst 40%, mer foretrukket minst 50%, mest foretrukket minst 60%, ideelt sett minst 70%, mer ideelt minst 80% og mest ideelt minst 90%, hvor 100% er definert som den diagnostiske parameter som vises av et normalt individ. Se f.eks. Maynard et al. (1996) *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, Interpharm Press, Boca Raton, FL, Dent (2001) *Good Laboratory and Good Clinical Practice*, Urch Publ., London, UK.

”Immuntilstand” eller ”immunforstyrrelse” omfatter f.eks. patologisk betennelse, en inflammatorisk forstyrrelse og en autoimmun forstyrrelse eller sykdom. ”Immuntilstand” viser også til infeksjoner, vedvarende infeksjoner og proliferative tilstander som kreft, tumorer og angiogenese, innbefattet infeksjoner, tumorer og krefttilstander som motsetter seg bekjempelse via immunsystemet. Kreftlignende tilstand” omfatter f.eks. kreft, kreftceller, tumorer, angiogenese og prekankrøse tilstander, f.eks. dysplasi.

”Inflammatorisk forstyrrelse” betyr en forstyrrelse eller patologisk tilstand i hvilken patologien helt eller delvis skyldes f.eks. en endring i antallet av, en endring i migra-

sjonshastigheten av eller en endring i aktiveringen av celler i immunsystemet. Celler i immunsystemet omfatter f.eks. T-celler, B-celler, monocytter eller makrofager, antigenpresenterende celler (APC), dentrittceller, mikroglia, NK-celler, NKT-celler, nøytrofile celler, eosinofile celler, mastceller eller hvilken som helst annen celle som spesifikt er assosiert med immunologi, for eksempel cytokinproduserende endotel- eller epitelceller.

En "IL-17-produserende celle" betyr en T-celle som ikke er en T-celle av klassisk TH1-type eller klassisk TH2-type og som betegnes T_H17 -celler. T_H17 -celler diskuteres i mer detalj i Cua og Kastelein (2006) Nat. Immunol. 7:557-559, Tato og O'Shea (2006) Nature 441:166-168, Iwakura og Ishigame (2006) J. Clin. Invest. 116:1218-1222. "IL-17-produserende celle" betyr også en T-celle som uttrykker et gen eller polypeptid fra Tabell 10B i U.S. Publiserte Patentsøknad nr. 2004/0219150 (F.eks. mitogenresponsivt P-protein, kjemokinligand 2, interleukin 17 (IL-17), transkripsjonsfaktor RAR-beslektet og/eller suppressor av cytokinsignalisering 3), hvor ekspresjonen ved behandling med en IL-23-agonist er høyere enn ved behandling med en IL-12-agonist, hvor "høyere enn" er definert som følger: Ekspresjonen med en IL-23-agonist er vanligvis minst 5 ganger høyere, typisk minst 10 ganger høyere, mer typisk minst 15 ganger høyere, mest typisk minst 20 ganger høyere, fortrinnsvis minst 25 ganger høyere og mest foretrukket minst 30 ganger høyere enn ved IL-12-behandling. Ekspresjonen kan for eksempel måles ved å behandle en populasjon av i det vesentlige rene IL-17-produserende celler. En Th17-respons er en immunrespons i hvilken aktiviteten og/eller proliferasjonen av Th17-celler er forhøyet, typisk koblet til en undertrykt Th1-respons.

Videre omfatter "IL-17-produserende celle" en progenitorcelle eller forløpercelle som i en reaksjonsvei for celleutvikling eller celledifferensiering er forpliktet til å differensiere til en IL-17-produserende celle, som definert ovenfor. En progenitorcelle eller forløpercelle av den IL-17-produserende cellen kan finnes i en drenerende lymfeknute (DLN). I tillegg omfatter "IL-17-produserende celle" en IL-17-produserende celle som definert ovenfor, som har blitt f.eks. aktivert, f.eks. med en forbolester, en ionofor og/eller en karsinogen forbindelse, differensiert videre, lagret, nedfrosset, dehydrert, inaktivert, delvis degradert, f.eks. ved apoptose, proteolyse eller lipidoksidasjon, eller modifisert, f.eks. ved rekombinant teknologi.

Som anvendt heri viser begrepet "isolert nukleinsyremolekyl" til et nukleinsyremolekyl som har blitt identifisert og separert fra minst ett kontaminerende nukleinsyremolekyl som det vanligvis er assosiert med i den naturlige kilde for antistoff-nukleinsyren. Et isolert nukleinsyremolekyl foreligger i en annen form eller sammenheng enn det foreligger i i naturen. Isolerte nukleinsyremolekyler er derfor forskjellige fra nukleinsyre-

molekylet som det foreligger i naturlige celler. Et isolert nukleinsyremolekyl omfatter imidlertid et nukleinsyremolekyl som foreligger i celler som vanligvis uttrykker anti-stoffet, men hvor for eksempel nukleinsyremolekylet har en annen kromosomal plassering enn i naturlige celler.

Uttrykket "kontrollsekvenser" viser til DNA-sekvenser som er nødvendige for ekspressjonen av en operativt tilkoblet kodende sekvens i en gitt vertsorganisme. Kontrollsekvensene som er egnede for prokaryoter omfatter for eksempel en promoter, om ønskelig en operatorsekvens og et ribosombindingssete. Eukaryote celler vites å benytte promotere, polyadenyleringsseter og enhancere.

En nukleinsyre er "operativt tilkoblet" når den er plassert inn i en funksjonell sammenheng med en annen nukleinsyresekvens. For eksempel er DNA for en presekvens eller sekretorisk ledersekvens operativt koblet til DNA for et polypeptid dersom den uttrykkes som et preprotein som deltar i sekresjonen av polypeptidet, en promoter eller enhancer er operativt koblet til en kodende sekvens dersom den påvirker transkripsjonen av sekvensen, eller et ribosombindingssete er operativt koblet til en kodende sekvens dersom det er plassert slik at translasjonen fremmes. Generelt betyr "operativt tilkoblet" at DNA-sekvensene som er koblet til hverandre er sammenhengende og, når det gjelder en sekretorisk ledersekvens, sammenhengende og i samme leseramme. Enhancere må imidlertid ikke nødvendigvis være sammenhengende. Tilkobling oppnås ved ligering i egnede restriksjonsseter. Dersom slike seter ikke foreligger, anvendes syntetiske oligonukleotid-adaptorer eller -linkere i samsvar med konvensjonell praksis.

Som anvendt heri benyttes begrepene "celle", "cellelinje" og "cellekultur" om hverandre, og alle slike betegnelser omfatter avkom. Således omfatter ordene "transformanter" og "transformerte celler" den primære cellen det gjelder og kulturer avledet fra denne, uten hensyn til antall overføringer. Det skal også forstås at alt avkom ikke nødvendigvis har nøyaktig det samme DNA-innhold, grunnet forsettlige eller uforsettlige mutasjoner. Mutant avkom som har den samme funksjon eller biologiske aktivitet som den opprinnelige transformerte cellen ble utvalgt for, omfattes. Dersom forskjellige betegnelser er tilsiktede, vil dette være klart ut fra sammenhengen.

Som anvendt heri visere "polymerasekjedereaksjon" eller "PCR" til en fremgangsmåte eller teknikk i hvilken svært små mengder av et spesifikt stykke nukleinsyre, DNA eller RNA, amplifiseres som beskrevet i f.eks. U.S. Patentskrift nr. 46831195. Generelt nå sekvensinformasjon fra endene av området av interesse eller utenfor endene være tilgjengelig, slik at det kan utformes oligonukleotid-primere, disse primerene vil ha en sekvens som er identisk med eller som ligner sekvens i motsatte tråder i templatet som skal amplifiseres. De 5'-terminale nukleotidene i de to primerene kan falle sammen

med endene av det amplifiserte materialet. PCR kan anvendes for amplifisering av spesifikke RNA-sekvenser, spesifikke DNA-sekvenser fra totalt genomisk DNA og cDNA transkribert fra totalt cellulært RNA, bakteriofag- eller plasmidsekvenser osv. Se generelt Mullis et al. (1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263, Erlich, red., (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.). Som anvendt heri anses PCR å være ett eksempel, men ikke det eneste, på en nukleinsyrepolymerase-reaksjonsfremgangsmåte for amplifisering av en nukleinsyreprøve som omfatter anvendelse av en kjent nukleinsyre som primer og en nukleinsyrepolymerase for amplifisering eller frembringelse av et spesifikt nukleinsyrestykke.

Som anvendt heri viser begrepet "kimbanesekvens" til en rekkefølge av ikke-rearrangerte immunglobulin-DNA-sekvenser, innbefattet kimbanesekvenser fra gnagere (f.eks. mus) og menneske. Enhver egnet kilde for ikke-rearrangert immunglobulin-DNA kan anvendes. Humane kimbanesekvenser kan for eksempel erholdes fra "JOINSOLVER" kimbane-databaser fra nettstedet til National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases of the United States National Institutes of Health. Kimbanesekvenser fra mus kan f.eks. erholdes som beskrevet i Giudicelli et al. (2005) Nucleic Acids Res. 33:D256-D261.

For å undersøke graden av inhibering av IL-23-aktivitet kan for eksempel prøver eller analyseblandinger som omfatter f.eks. et gitt protein, et gitt gen, en gitt celle eller en gitt organisme behandles med et mulig aktiverende eller inhiberende middel og sammenlignes med kontrollprøver uten middelet. Kontrollprøver, dvs. prøver som ikke er behandlet med middel, gis en relativ aktivitetsverdi på 100%. Inhibering er oppnådd dersom aktivitetsverdien sammenlignet med kontrollen er 90% eller lavere, typisk 85% eller lavere, mer typisk 80% eller lavere, mest typisk 75% eller lavere, generelt 70% eller lavere, mer generelt 65% eller lavere, mest generelt 60% eller lavere, typisk 55% eller lavere, vanligvis 50% eller lavere, mer vanlig 45% eller lavere, mest vanlig 40% eller lavere, fortrinnsvis 35% eller lavere, mer foretrukket 30% eller lavere, enda mer foretrukket 25% eller lavere og mest foretrukket lavere enn 25%. Aktivisering er oppnådd dersom aktivitetsverdien sammenlignet med kontrollen er tilnærmet 110%, generelt minst 120%, mer generelt minst 140%, mer generelt minst 160%, ofte minst 180%, oftere minst 2 ganger, oftest minst 2,5 ganger, vanligvis minst 5 ganger, mer vanlig minst 10 ganger, fortrinnsvis minst 20 ganger, mer foretrukket minst 40 ganger og mest foretrukket mer enn 40 ganger.

Endepunkter for aktivisering eller inhibering kan måles som følger: Aktivisering, inhibering og respons på behandling, for eksempel av en celle, en fysiologisk væske, et vev, et organ og et dyr eller menneske, kan måles ut fra et endepunkt. Endepunktet kan omfatte en på forhånd bestemt mengde eller prosentandel av f.eks. et mål på betennelse,

onkogenisitet eller celledegranulering eller -sekresjon, for eksempel frigjøringen av et cytokin, toksisk oksygen eller en protease. Endepunktet kan for eksempel omfatte en på forhånd bestemt mengde av ionefluks eller -transport, cellemigrasjon, celleadhesjon, celleproliferasjon, potensial for metastase, celledifferensiering og endring i fenotype, f.eks. endring i ekspresjonen av gen forbundet med betennelse, apoptose, transformasjon, cellyklus eller metastase (se f.eks. Knight (2000) *Ann. Clin. Lab. Sci.* 30:145-158, Hood og Cheresch (2002) *Nature Rev. Cancer* 2:91-100, Timme et al. (2003) *Curr. Drug Targets* 4:251-261, Robbins og Itzkowitz (2002) *Med. Clin. North Am.* 86:1467-1495, Grady og Markowitz (2002) *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 3:101-128, Bauer, et al. (2001) *Glia* 36:235-243, Stanimirovic og Satoh (2000) *Brain Pathol.* 10:113-126).

Et endepunkt for inhibering er generelt 75% av kontrollen eller lavere, fortrinnsvis 50% av kontrollen eller lavere, mer foretrukket 25% av kontrollen eller lavere og mest foretrukket 10% av kontrollen eller lavere. Generelt er et endepunkt for aktivering minst 150% av kontrollen, fortrinnsvis minst 2 ganger kontrollen, mer foretrukket minst 4 ganger kontrollen og mest foretrukket minst 10 ganger kontrollen.

”Lite molekyl” er definert som et molekyl med en molekylvekt som er lavere enn 10 kDa, typisk lavere enn 2 kDa og fortrinnsvis lavere enn 1 kDa. Små molekyler omfatter, men er ikke begrenset til, uorganiske molekyler, organiske molekyler, organiske molekyler som inneholder en uorganisk bestanddel, molekyler som omfatter et radioaktivt atom, syntetiske molekyler, peptidomimetiske molekyler og antistoffetterliggende molekyler. Som terapeutisk middel kan et lite molekyl være mer permeabelt for celler, mindre utsatt for degradering og ha mindre tendens til å utløse en immunrespons enn store molekyler. Små molekyler, som peptidomimetiske molekyler fra antistoffer og cytokiner, så vel som lavmolekylære toksiner har blitt beskrevet. Se f.eks. Casset et al. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307:198-205, Muylldermans (2001) *J. Biotechnol.* 74:277-302, Li (2000) *Nat. Biotechnol.* 18:1251-1256, Apostolopoulos et al. (2002) *Curr. Med. Chem.* 9:411-420, Monfardini et al. (2002) *Curr. Pharm. Des.* 8:2185-2199, Domingues et al. (1999) *Nat. Struct. Biol.* 6:652-656, Sato og Sone (2003) *Biochem. J.* 371: 603-608, U.S. Patentskrift nr. 6326482.

”Spesifikt” eller ”selektivt” binder indikerer, når det viser til ligand/reseptor, antistoff/antigen eller et annet bindingspar, en bindingsreaksjon som kan påvise nærvær av proteinet i en heterolog populasjon av proteiner og andre biologiske molekyler. Under angitte betingelser bindes således en angitt ligand til en gitt reseptor, og bindes ikke i signifikante mengder til andre proteiner som foreligger i prøven. Som anvendt heri sies et antistoff å bindes spesifikt til et polypeptid *som omfatter* en gitt sekvens (i dette tilfellet IL-23p19) dersom det bindes til polypeptider som omfatter sekvensen til IL-

23p19, men ikke bindes til proteiner som mangler sekvensen til IL-23p19. For eksempel kan et antistoff som spesifikt bindes til et polypeptid som omfatter IL-23p19 bindes til en "FLAG"-merket form av IL-29p19, men det vil ikke bindes til andre "FLAG"-merkede proteiner.

Antistoffet eller den bindende sammensetningen avledet fra et antistoffs antigenbindende sete, ifølge den omfattede fremgangsmåte bindes til sitt antigen med en affinitet som er minst to ganger høyere, fortrinnsvis minst to ganger høyere, mer foretrukket minst 20 ganger høyere og mest foretrukket minst 100 ganger høyere enn affiniteten til ubeslektede antigener. I en foretrukket utførelse vil antistoffet ha en affinitet som er høyere enn tilnærmet 10⁹ liter/mol, bestemt ved f.eks. Scatchard-analyse. Munsen et al. (1980) *Analyt. Biochem.* 107:220-239.

Som anvendt heri viser uttrykket "immunmodulerende middel" til naturlige eller syntetiske midler som undertrykker eller modulerer en immunrespons. Immunresponsen kan være en humoral eller cellulær respons. Immunmodulerende midler omfatter immunsupprimerende eller antiinflammatoriske midler.

"Immunsupprimerende midler" eller "immunsupprimerende medikamenter" er, som begrepene anvendes heri, terapeutiske midler som anvendes i immunsupprimerende behandling for å inhibere eller forhindre immunsystemaktivitet. Klinisk anvendes de for å forhindre avvisning av transplanterte organer og vev (f.eks. beinmarg, hjerte, nyre, lever) og/eller i behandlingen av autoimmune sykdommer eller sykdommer som sannsynligvis har et autoimmunt opphav (f.eks. reumatoid artritt, myasthenia gravis, systemisk lupus erythematosus, ulcerøs kolitt, multippel sklerose). Immunsupprimerende midler kan inndeles i fire grupper: cytostatiske glukokortikoider, antistoffer (innbefattet biologisk respons-modifiserende midler eller DMARD), medikamenter som virker på immunofiliner, og andre medikamenter, innbefattet kjente kjemoterapeutiske midler som anvendes ved behandling av proliferative forstyrrelser. For multippel sklerose i særdeleshet kan antistoffene ifølge foreliggende oppfinnelse tilføres sammen med en ny klasse av myelinbindende protein-lignende terapeutiske midler som betegnes kopaksoner.

"Antiinflammatoriske midler" eller "antiinflammatoriske medikamenter" anvendes som betegnelse på både steroide og ikkesteroidale terapeutiske midler. Steroide, også betegnet kortikosteroider, er medikamenter som ligner mye på kortisol, et hormon som dannes naturlig av binyrekjertlene. Steroide anvendes som hovedbehandling for visse betennelsestilstander, for eksempel: Systemisk vaskulitt (betennelse i blodkar) og myositt (betennelse i muskel). Steroide kan også anvendes selektivt for behandling av betennelsestilstander som reumatoid artritt (kronisk inflammatorisk artritt som opptrer i

ledd på begge sider av kroppen), systemisk lupus erythematosus (en generalisert sykdom som skyldes unormal funksjon av immunsystemet) og Sjögrens syndrom (kronisk forstyrrelse som gir tørre øyne og tørr munn).

Ikke-steroid antiinflammatoriske medikamenter, vanligvis forkortet NSAID, er medikamenter med analgetiske, antipyretiske og antiinflammatoriske virkninger – de reduserer smerte, feber og betennelse. Begrepet ”ikke-steroid” anvendes for å skille disse medikamentene fra steroider, som (i tillegg til et bredt utvalg av andre virkninger) har en lignende eikosanoidundertrykkende, antiinflammatorisk virkning. NSAID foreskrives generelt for symptomatisk lindring av følgende tilstander: reumatoid artritt, osteoartritt, inflammatoriske artropatier (f.eks. ankyloserende spondylitt, psoriatisk artritt, Reiters syndrom), akutt urinsyregikt, dysmenoré, metastatisk beinsmerte, hodepine og migrene, postoperativ smerte, mild til moderat smerte grunnet betennelse og vevsskade, pyreksi og nyrekolikk. NSAID omfatter salicylater, alryalknonsyrer, 2-arylpropionsyrer (profener), N-arylantranilsyrer (fenaminsyrer), oksikamer, koksiber og sulfonamider.

II Generelt

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer modifiserte anti-IL-23-antistoffer og anvendelser av disse for behandling av inflammatoriske, autoimmune og proliferative forstyrrelser.

Et antall cytokiner spiller en rolle i utvikling eller reparasjon av nevrologiske forstyrrelser. IL-6, IL-17, interferon gamma (IFN γ) og granulocyt-kolonistimulerende faktor (GM-CSF) har blitt assosiert med multippel sklerose. Matusevicius et al. (1999) Multiple Sclerosis 5:101-104, Lock et al. (2002) Nature Med. 8:500-508. IL-1 α , IL-1 β og transformerende vekstfaktor beta 1 (TGF- β 1) spiller en rolle i ALS, Parkinsons sykdom og Alzheimers sykdom. Hoozemans et al. (2001) Exp. Gerontol. 36:559-570, Griffin og Mrak (2002) J. Leukocyte Biol. 72:233-238, Ilzecka et al. (2002) Cytokine 20:239-243. TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, interferon-gamma, og IL-17 ser ut til å modulere responsen på hjerneiskemi. Se f.eks. Kostulas et al. (1999) Stroke 30:2174-2179, Li et al. (2001) J. Neuroimmunol. 116:5-14. Vaskulær endotelcellevekstfaktor (VEGF) er forbundet med ALS. Cleveland og Rothstein (2001) Nature 2:806-819.

Inflammatoriske tarmforstyrrelser, f.eks. Crohns sykdom, ulcerøs kolitt, cøliaki og irriterabel tarm-syndrom, formidles av celler i immunsystemet og av cytokiner. For eksempel er Crohns sykdom forbundet med forhøyet IL-12 og IFN γ , mens ulcerøs kolitt er forbundet med forhøyet IL-5, IL-13 og transformerende vekstfaktor beta (TGF β). IL-17-ekspresjonen kan også være forhøyet i Crohns sykdom og ulcerøs

kolitt. Se f.eks. Podolsky (2002) New Engl. J. Med. 347:417-429, Bouma og Strober (2003) Nat. Rev. Immunol. 3:521-533, Bhan et al. (1999) Immunol. Rev. 169:195-207, Hanauer (1996) New Engl. J. Med. 334:841-848, Green (2003) The Lancet 362:383-391, McManus (2003) New Engl. J. Med. 348:2573-2574, Horwitz og Fisher (2001) New Engl. J. Med. 344:1846-1850, Andoh et al. (2002) Int. J. Mol. Med. 10:631-634, Nielsen et al. (2003) Scand. J. Gastroenterol. 38:180-185, Fujino et al. (2003) Gut 52:65-70.

IL-23-reseptoren er et heterodimert kompleks av subenhetene IL-23R og IL-12R β 1. Parham et al. (2000) J. Immunol. 168:5699. IL-12-reseptoren er et kompleks av subenhetene IL-12R β 1 og IL-12R β 2. Se Presky et al. (1996) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 93:14002. IL-23R har blitt implisert som en avgjørende genetisk faktor i de inflammatoriske tarmforstyrrelsene Crohns sykdom og ulcerøs kolitt. Duerr et al. (2006) Scienceexpress 26-oktober-2006:1. En genomomfattende assosiasjonsundersøkelse fant at genet for IL-23R var kraftig assosiert med Crohns sykdom, med en uvanlig kodingsvariant (Arg381 Gln) som gav kraftig beskyttelse mot sykdommen. Denne genetiske assosiasjonen bekrefter tidligere biologiske funn (Yen et al. (2006) J. Clin. Investigation 116:1218) som antydte at IL-23 og den tilhørende reseptor er lovende mål for nye terapeutiske tilnærminger for behandling av IBD.

Betennelsessykdommer i hud, ledd og CNS samt proliferative forstyrrelser utløser tilsvarende immunresponser, følgelig bør blokkering av IL-23 gi en inhibering av disse immunformidlede betennelsessykdommene uten å forspille vertens evne til å bekjempe systemiske infeksjoner. Antagonisering av IL-23 bør lindre betennelsen som er forbundet med inflammatorisk tarmsykdom, Crohns sykdom, ulcerøs kolitt, reumatoid artritt, psoriatisk artritt, psoriasis, ankyloserende spondylitt og atopisk dermatitt. Anvendelse av IL-23-inhibitorer vil også gi en inhibering av proliferative forstyrrelser, f.eks. kreft og autoimmune forstyrrelser, f.eks. multippel sklerose, type I diabetes og SLE. Beskrivelser av IL-23 i disse forskjellige forstyrrelsene kan finnes i følgende offentliggjorte PCT-søknader: WO 04/081190, WO 04/071517, WO 00/53631 og WO 01/18051. IL-23-inhibitorer kan også finne anvendelse i behandling av infeksjoner, innbefattet kroniske infeksjoner, som bakterielle, mykobakterielle og virale infeksjoner og soppinfeksjoner.

p19-subenheten av IL-23 er medlem av "lang kjede"-familien av hematopoietiske cytokiner (Oppmann et al. (2000) *supra* og omfatter fire pakkede α -helikser, betegnet A, B, C og D, med opp-opp-ned-ned-topologi. De 4 heliksene er sammenbundet av 3 polypeptidløkker. A-B-løkken og C-D-løkken har blitt modellert til å være temmelig lange, siden de sammenbinder parallelle helikser. Den korte B-C-løkken binder de antiparallelle heliksene B og C sammen. p19-subenheten av IL-23 er et medlem av IL-

6-familien av heliksformede cytokiner. Denne cytokinfamilien bindes til sine tilhørende reseptorer via tre konserverte epitoper (sete I, II og III, Bravo og Heath (2000) EMBO J. 19:2399-2411). p19-subenheten interagerer med tre cytokinreseptor-subenheter for dannelse av det kompetente signaliseringskomplekset. Uttrykt i en celle danner p19-subenheten først et kompleks med p40-subenheten, som også foreligger i IL-12. Som bemerkt ovenfor utskilles p19p40-komplekset fra cellen som et heterodimerert kompleks som kalles IL-23. Se f.eks. Oppmann et al., *supra*. Det cellulære reseptorkomplekset som er nødvendig for overføring av IL-23-signalet består av to medlemmer av tall-signalreseptor-subenhetene for IL-6/IL-12-familien av cytokiner, den IL-23-spesifikke IL-23R (se f.eks. Parham et al., *supra*) og IL-12Rb1, som deles med IL-12.

Innsyn i det strukturelle grunnlaget for ”lang kjede”-cytokin/reseptorgjenkjenning har vist at selv som store områder av proteinoverflatene begravnes ved dannelse av cytokinreseptorkomplekser, domineres affiniteten av interaksjonen av noen få, ofte nært hverandre liggende aminosyrer som danner en energetisk ”hot spot” i sentrum av bindingsgrenseflaten. Identiteten til aminosyrerestene som dominerer bindingsenergien til en stor protein-proteingrenseflate har blitt betegnet den ”funksjonelle epitop”. Affiniteten av interaksjonen (og således den biologiske spesifisitet) defineres følgelig av den strukturelle komplementaritet mellom de funksjonelle epitopene i ligand og reseptor. Detaljerte mutageneseundersøkelser har vist at de mest signifikante aminosyrerestene som utgjør de funksjonelle epitopene i cytokiner og reseptorer er hydrofobe kontakter som omfatter enten upolare sidekjeder som tryptofan, de alifatiske delene av upolare sidekjeder eller polypeptidryggraden. Den upolare ”kjernen” er omgitt av en ”sky” av polare aminosyrerester av mindre betydning for bindingsenergien. Kinetiske undersøkelser viser at de funksjonelle epitopenes primære rolle er å stabilisere protein-proteininteraksjoner ved å redusere kompleksets dissosiasjonshastighet. Det har blitt foreslått at den innledende kontakten mellom cytokin og reseptor domineres av en tilfeldig diffusjon eller ”rulling” av proteinoverflater som frembringer mange ustabile kontakter. Så stabiliseres komplekset når de funksjonelle epitopene i reseptor og ligand interagerer med hverandre. Se f.eks. Bravo og Heath, *supra*.

III. Frembringelse av IL-23-spesifikke antistoffer

Enhver egnet fremgangsmåte for frembringelse av monoklonale antistoffer kan benyttes. For eksempel kan en mottaker immuniseres med en sammenkoblet eller ukoblet (f.eks. naturlig forekommende) form av IL-23-heterodimeren eller et fragment av denne. Enhver egnet immuniseringsfremgangsmåte kan benyttes. Slike fremgangsmåter kan omfatte adjuvantia, andre immunstimulerende midler, gjentatte forsterkerinjeksjoner og anvendelse av en eller flere immuniseringsveier.

Enhver egnet IL-23-kilde kan anvendes som immunogen for frembringelse av det ikke-humane antistoff, spesifikt for p19-subenheten, i sammensetningene og fremgangsmåtene som beskrives heri. Slike former omfatter, men er ikke begrenset til, helt protein, innbefattet sammenkoblede og naturlig forekommende heterodimerer, et eller flere peptider og epitoper, frembragt ved hjelp av rekombinante midler, syntesemidler, kjemiske midler eller kjemisk degradering, midler som er kjente innen faget.

Enhver form for antigen som er tilstrekkelig til å frembringe et biologisk aktivt antistoff kan anvendes for frembringelse av antistoffet. Således kan det utløsende antigen være en enkelt epitop, flere epitoper eller hele proteinet, alene eller i kombinasjon med et eller flere immunogenisitetstimulerende midler som er kjente innen faget. Det utløsende antigen kan være et isolert fullengde-protein, et celleoverflateprotein (f.eks. immunisering med celler som er transfektert med i det minste en del av antigenet) eller et løselig protein (f.eks. immunisering med bare ekstracellulært domene-delen av proteinet). Antigenet kan være fremstilt i en genetisk modifisert celle. DNA som koder for antigenet kan være genomisk eller ikke-genomisk (f.eks. cDNA) og koder for i det minste en del av det ekstracellulære domenet. Som anvendt heri viser ”del” til det minimale antall aminosyrer eller nukleinsyrer, hva som måtte passe, som utgjør en immunogen epitop i antigenet av interesse. Alle genetiske vektorer som er egnede for transformasjon av cellene av interesse kan benyttes, innbefattet, men ikke begrenset til, adenovirusvektorer, plasmider og ikke-virale vektorer, f.eks. kationiske lipider.

Enhver egnet fremgangsmåte kan anvendes for å utløse et antistoff med de ønskede biologiske egenskapene når det gjelder inhibering av IL-23. Det er ønskelig å fremstille monoklonale antistoffer (mAb) fra forskjellige pattedyrsverter som mus, gnagere, primater, mennesker osv. En beskrivelse av teknikker for fremstilling av slike monoklonale antistoffer kan finnes i f.eks. Stites et al. (red.) BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY (4. utgave) Lange Medical Publications, Los Altos, CA, og referanser som siteres i denne, Harlow og Lane (1988) ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL CSH Press, Goding (1986) MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (2. utgave) Academic Press, New York, NY. Således kan monoklonale antistoffer erholdes ved hjelp av en rekke forskjellige teknikker som er velkjente blant fagfolk. Typisk immortaliseres miltceller fra et dyr som er immunisert med et ønsket antigen, vanligvis ved fusjon med en myelomcelle. Se Kohler og Milstein (1976) Eur. J. Immunol. 6:511-519. Alternative fremgangsmåter for immortalisering omfatter transformasjon med Epstein-Barr-virus, onkogener eller retrovirus, eller andre fremgangsmåter som er kjente innen faget. Se f.eks. Doyle et al. (red. 1994 og periodiske tillegg) CELL AND TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES, John Wiley and Sons, New York, NY. Kolonier som oppstår fra enkeltvis immortaliserte celler analyseres for dannelsen av antistoffer med den ønskede

spesifisitet og affinitet for antigenet, og utbyttet av de monoklonale antistoffene som dannes av slike celler kan forhøyes ved hjelp av forskjellige teknikker, innbefattet injeksjon i bukhulen til en vertebratvert. Alternativt kan man isolere DNA-sekvenser som koder for et monoklonalt antistoff eller et antigenbindende fragment derav ved å gjennomføre et DNA-bibliotek fra humane B-celler f.eks. ifølge den generelle fremgangsmåten som er skissert av Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281.

Andre egnede teknikker omfatter seleksjon i antistoffbiblioteker i bakteriofag eller lignende vektorer. Se f.eks. Huse et al., supra og Ward et al. (1989) Nature 341, 544-546. Polypeptidene og antistoffene ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes med eller uten modifisering, innbefattet kimære eller humaniserte antistoffer. Ofte vil polypeptidene og antistoffene merkes ved tilkobling, enten kovalent eller ikke-kovalent, av en forbindelse som tilveiebringer et påvisbart signal. Et bredt utvalg av merkingsgrupper og konjugeringsteknikker er kjent og grundig beskrevet i både den vitenskapelige litteratur og i patentlitteraturen. Egnede merkingsgrupper omfatter radioaktive isotoper, enzymer, substrater, kofaktorer, inhibitorer, fluorescerende grupper, kjemiluminescerende grupper, magnetiske partikler og lignende. Patentskrifter som beskriver anvendelsen av slike merkingsgrupper omfatter U.S. Patentskrifter nr. 3817837, 3850752, 3939350, 3996345, 4277437 4275149 og 4366241. Videre kan det fremstilles rekombinante immunglobuliner, se Cabilly, U.S. Patentskrift nr. 4816567 og Queen et al. (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033, eller de kan fremstilles i transgenomus, se Mendez et al. (1997) Nature Genetics 15:146-156. Se også Abgenix- og Medarex-teknologiene.

Antistoffer eller bindende sammensetninger mot på forhånd bestemte fragmenter av IL-23 kan frembringes ved immunisering av dyr med konjugater av polypeptidet, fragmentene, peptidene eller epitopene med bærerproteiner. Monoklonale antistoffer fremstilles fra celler som utskiller det ønskede antistoff. Disse antistoffene kan analyseres for binding til normalt eller defekt IL-23. Disse monoklonale antistoffene vil vanligvis bindes med en K_d på minst tilnærmet 1 μ M, mer vanlig minst tilnærmet 300 nM, 30 nM, 10 nM, 3 nM, 1 nM, 300 pM, 100 pM, 30 pM eller bedre, vanligvis bestemt ved ELISA. Egnede ikke-humane antistoffer kan også påvises ved anvendelse av de biologiske analysene som beskrives i Eksempel 5 og 6 nedenfor.

En hybridom som uttrykker antistoff 13B8 ble i henhold til Budapest-konvensjonen deponert hos American Type Culture Collection (ATCC – Manassas, Virginia, USA) den 17. august 2006 under aksjesjonsbetegnelsen PTA-7803.

IV. Humanisering av IL-23-spesifikke antistoffer

Ethvert egnet ikke-humant antistoff kan anvendes som kilde for det hypervariable området. Kilder for ikke-humane antistoffer omfatter, men er ikke begrenset til, mus, hare dyr (innbefattet kaniner), storfe og primater. Stort sett er humaniserte antistoffer humane immunglobuliner (mottaker-antistoff) i hvilke aminosyrerester i mottakerens hypervariable område er erstattet med aminosyrerester fra det hypervariable området fra en ikke-menneskelig art (donor-antistoff), for eksempel mus, rotte, kanin eller ikke-menneskelig primat, med den ønskede spesifisitet, affinitet og kapasitet. I noen tilfeller er aminosyrerester i Fv-rammeverkområdet (FR) erstattet med tilsvarende ikke-humane aminosyrerester. Videre kan humaniserte antistoffer omfatte aminosyrerester som verken finnes i mottaker-antistoffet eller i donor-antistoffet. Disse modifikasjonene er innført for ytterligere å forfine antistoffets yteevne i den ønskede biologiske aktivitet. For ytterligere detaljer, se Jones et al. (1986) *Nature* 321:522-525, Reichmann et al. (1988) *Nature* 332:323-329 og Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596.

Fremgangsmåter for rekombinant modifisering av antistoffer har blitt beskrevet, f.eks. av Boss et al. (U.S. Patentskrift nr. 4816397), Cabilly et al. (U.S. Patentskrift nr. 4816567), Law et al. (Publisert Europeisk Patentsøknad nr. EP438310A1) og Winter (Europeisk Patentskrift nr. EP239400B1).

Aminosyresekvensvarianter av humanisert anti-IL-23-antistoff fremstilles ved å innføre formålstjenlige nukleotidendringer i DNA for det humaniserte anti-IL23-antistoff eller ved peptidsyntese. Slike varianter omfatter for eksempel delesjoner fra og/eller inserasjoner i og/eller substitusjoner av aminosyrerester i aminosyresekvensene som er vist for det humaniserte anti-IL-23-antistoff. Enhver kombinasjon av delesjon, inserasjon og substitusjon kan innføres for å nå fram til den endelige konstruksjon, så lenge som den endelige konstruksjon har de ønskede egenskaper. Aminosyreendringene kan også endre posttranslasjonelle prosesser for det humaniserte anti-IL-23-antistoff, for eksempel endre antallet av glykosyleringssteder eller dere posisjon.

En anvendbar fremgangsmåte for påvisning av visse aminosyrerester eller områder i det humaniserte anti-IL-23-antistoffpolypeptid som er foretrukne posisjoner for mutagenese betegnes "alanin-skannende mutagenese" og beskrives av Cunningham og Wells (1989) *Science* 244: 1081-1085. Her identifiseres en aminosyrerest eller en gruppe av målrester (f.eks. ladede aminosyrerester som Arg, Asp, His, Lys og Glu) og erstattes med en nøytral eller negativt ladd aminosyre (vanligvis alanin eller polyalanin) for å påvirke interaksjonene mellom aminosyrene og IL-23-antigen. Aminosyrerestene som viser funksjonell sensitivitet overfor substitusjonene forfines så ved å innføre ytterligere eller andre varianter i eller for substitusjonssetene. Selv om setet for

innføring av en aminosyresekvensvariasjon er bestemt på forhånd, behøver således mutasjonens egenskaper i seg selv ikke være forhåndsbestemt. For eksempel å analysere virkningen av en mutasjon i et gitt sete, utføres alanin-skanning eller tilfeldig mutagenese i målkodonet eller -området, og de uttrykte variantene av humanisert anti-IL-23-antistoff analyseres for den ønskede aktivitet.

Aminosyresekvensinsersjoner omfatter amino- og/eller karboksylterminale fusjoner som varierer i størrelse fra en aminosyrerest til polypeptider som inneholder et hundre eller flere aminosyrerester, så vel som insersjoner av enkeltvis eller flere aminosyrerester inne i sekvensen. Eksempler på terminale insersjoner omfatter humanisert anti-IL-23-antistoff med en N-terminal metionylrest eller antistoffet fusjonert til en merkingsepitop. Andre insersjonsvarianter av den humaniserte anti-IL-23-antistoffmolekyl omfatter fusjon til N- eller C-enden av humanisert anti-IL-23-antistoff av et enzym eller polypeptid som forlenger antistoffets halveringstid i serum.

En annen varianttype er en aminosyresubstitusjonsvariant. I disse variantene har minst en aminosyrerest i det humaniserte anti-IL-23p19-molekyl blitt fjernet, og en annen aminosyrerest innsatt i dens sted. Setene av størst interesse for substitusjonsmutagenese omfatter de hypervariable løkkene, men FR-endringer omfattes også.

En annen type av aminosyrevariant av antistoffet endrer antistoffets opprinnelige glykosyleringsmønster. Med endring menes deleksjon av en eller flere karbohydratgrupper som forefinnes i antistoffet og/eller innføring av et eller flere glykosyleringsseter som ikke foreligger i antistoffet. Glykosyleringen av antistoffer er typisk enten N-koblet eller O-koblet. N-koblet viser til kobling av karbohydratgruppen til sidekjeden i en asparaginrest. Tripeptidsekvensene asparagin-X-serin og asparagin-X-treonin, hvor X står for hvilken som helst aminosyre bortsett fra prolin, er gjenkjenningsssekvensene for enzymatisk tilkobling av karbohydratgruppen til asparaginsidekjeden. Nærvær av en av disse tripeptidsekvensene i et polypeptid danner således et mulig glykosyleringssete. O-koblet glykosylering viser til kobling av et av sukkerene N-acetylgalaktosamin, galaktose eller xylose til en hydroksyaminosyre, vanligvis serin eller treonin, selv om 5-hydroksyprolin eller 5-hydroksylisin også kan anvendes.

Addisjon av glykosyleringsseter til antistoffet oppnås enkelt ved å endre aminosyresekvensen slik at den inneholder en eller flere av de ovenfor beskrevne tripeptidsekvensene (for seter for N-koblet glykosylering). Endringen kan også innføres ved addisjon av eller substitusjon med en eller flere serin- eller treoninrester til sekvensen til det opprinnelige antistoff (for seter for O-koblet glykosylering).

Nok en type av aminosyrevariant er substitusjon av aminosyrerester for å oppnå høyere kjemisk stabilitet av det endelige humaniserte antistoff. For eksempel kan en asparagin-

rest endres for å redusere evnen til å danne isoaspartat i eventuelle NG-sekvenser i et gnager-CDR. Et tilsvarende problem kan oppstå i en DG-sekvens. Reissner og Aswad (2003) Cell. Mol. Life Sci. 60:1281. Isoaspartatdannelse kan svekke eller fullstendig forhindre bindingen av et antistoff til målantigenet. Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116:731 på s. 734. I en utførelse endres asparagin til glutamin (Q). I tillegg kan metioninrester i gnager-CDR endres for å redusere sannsynligheten for oksidasjon av svovel i metionin, noe som kan redusere antigenbindingsaffiniteten og også bidra til molekylær heterogenitet i det endelige antistoffpreparat. *Id.* I en utførelse endres metionin til alanin (A). Antistoffer med slike substitusjoner analyseres etterpå for å sikre at substitusjonen ikke reduserer bindingsaffiniteten overfor IL-23p29 til et uakseptabelt nivå.

Nukleinsyremolekyler som koder for aminosyresekvensvarianter av humanisert IL-23-spesifikt antistoff fremstilles ved en rekke forskjellige fremgangsmåter som er kjente innen faget. Disse fremgangsmåtene omfatter, men er ikke begrenset til, isolering fra en naturlig kilde (når det gjelder naturlig forekommende aminosyresekvensvarianter) eller fremstilling ved oligonukleotidformidlet (eller seterettet) mutagenese, PCR-mutagenese og kassett-mutagenese av en tidligere fremstilt variant eller en ikke-variantversjon av humanisert anti-IL-23p19-antistoff.

Vanligvis vil aminosyresekvensvarianter av det humaniserte anti-IL-23-antistoff ha en aminosyresekvens med minst 75% aminosyresekvensidentitet med de opprinnelige humaniserte antistoff-aminosyresekvensene for enten tungkjeden eller lett kjeden, mer foretrukket minst 80% mer foretrukket minst 85%, mer foretrukket minst 90% og mest foretrukket minst 95, 98 eller 99%. Identitet eller homologi når det gjelder denne sekvensen er heri definert som prosentandelen av aminosyrerester i kandidatsekvensen som er identiske med aminosyrerestene i humanisert anti-IL-23 etter sammenstilling av sekvensene og om nødvendig innføring av gap for å oppnå den maksimale prosent sekvensidentitet, idet eventuelle konservative substitusjoner ikke regnes som en del av sekvensidentiteten. Ingen N-terminale, C-terminale eller interne forlengelser, delesjoner eller insersjoner i antistoffsekvensen skal fortolkes til å påvirke sekvensidentitet eller -homologi.

Det humaniserte antistoff kan være utvalgt fra hvilken som helst klasse av immunoglobuliner, innbefattet IgM, IgG, IgD, IgA og IgE. Antistoffet er fortrinnsvis et IgG-antistoff. Enhver isotype av IgG kan anvendes, innbefattet IgG₁, IgG₂, IgG₃ og IgG₄. Varianter av IgG-isotypene omfattes også. Det humaniserte antistoffet kan omfatte sekvenser fra mer enn en klasse eller isotype. Optimalisering av de nødvendige konstant domene-sekvensene for frembringelse av den ønskede biologiske aktivitet oppnås enkelt ved å undersøke antistoffene i de biologiske analysene som beskrives nedenfor.

Likeså kan hvilken som helst klasse av lettkjede anvendes i sammensetningene og fremgangsmåtene heri. Nærmere bestemt er kappa, lambda eller varianter av disse anvendbare i de foreliggende sammensetningene og fremgangsmåtene.

Enhver egnet del av CDR-sekvensene fra det ikke-humane antistoff kan anvendes. CDR-sekvensene kan være mutagenisert ved substitusjon, insersjon eller delesjon av minst en aminosyrerest, slik at CDR-sekvensene er forskjellige fra den benyttede humane og ikke-humane antistoffsekvens. Man tenker seg at slike mutasjoner vil være minimale. Typisk vil minst 75% av aminosyrerestene i det humaniserte antistoff tilsvare aminosyrerestene i det ikke-humane CDR, oftere 90% og mest foretrukket mer enn 95%.

Enhver egnet del av FR-sekvensene fra det humane antistoff kan anvendes. FR-sekvensene kan være mutagenisert ved substitusjon, insersjon eller delesjon av minst en aminosyrerest, slik at FR-sekvensen er forskjellig fra den benyttede humane og ikke-humane antistoffsekvens. Man tenker seg at slike mutasjoner vil være minimale. Typisk vil minst 75% av aminosyrerestene i det humaniserte antistoff tilsvare dem i den humane FR, oftere 90% og mest foretrukket mer enn 95, 98 eller 99%.

CDR- og FR-aminosyrerester fastsettes ut fra standard-sekvensdefinisjonen til Kabat. Kabat et al. (1987) Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda Md. SEK.ID. nr. 1-5 viser sekvensene i tungkjedens variable domene i forskjellige anti-humant IL-23p19-antistoff fra mus, og SEK.ID. nr. 9-13 viser sekvensene i lettkjedens variable domene. FIG. 1 og 2 viser sekvenssammstillinger av tungkjedens og lettkjedens variable domener i de forskjellige antistoffene ifølge foreliggende oppfinnelse. CDR-områder er angitt i figurene, og de enkelte CDR-sekvensene er presentert sammen med sin unike sekvensbetegnelse i Tabell 7.

Humaniserte former av antistoff 13B8 tilveiebringes. Den humaniserte 13B8-lettkjede-sekvens (med konstant kappa-område) tilveiebringes som SEK.ID. nr. 14, og lettkjedens variable domene omfatter aminosyrerestene 1-108 i denne sekvensen. Tre versjoner av den humaniserte 13B8-tungkjedese-kvens (med konstante γ 1-områder) tilveiebringes som SEK.ID. nr. 6-8, og tungkjedens variable domene omfatter aminosyrerestene 1-116 i disse sekvensene. 13B8-tungkjedevariantene er illustrert i Tabell 2, med forskjeller fra utgangssekvensen vist med uthevet skrift. Met (M) ble endret til Lys (K) for å unngå muligheten for oksidasjon av aminosyreresten og inaktivering av antistoffet. Innføringen av AQKLQ i stedet for NEMFE er en erstatning av muse-CDR-sekvensen med den humane kimbanesekvens fra det humaniserte rammeverk som ble valgt for humanisering av antistoffet.

Tabell 2

Antistoff 13B8 CDRH2-varianter		
Antistoff	CDRH2-sekvens	SEK.ID. nr.
m13B8, h13B8-a	QIFPASGSADYNEMFEG	24
h13B8-b	QIFPASGSADYNEKFEG	25
h13B8-c	QIFPASGSADYAQKLQG	26

Humaniserte former av de andre antistoffene som beskrives heri kan dannes ved ganske enkelt å innsostituere utgangs-CDR fra gnagerantistoffet i lettkjede- og tungkjede-sekvensene fra humanisert 13B8, gitt som SEK.ID. nr. 14 og 6. Denne tilnærmingen vil mest sannsynlig være vellykket for antistoffkjeder med CDR med høy homologi med CDR i antistoff 13B8, f.eks. klon 11C1 for tungkjeden og klonene 11C1 og 21D1 for lettkjeden. Alternativt kan museantistoffene humaniseres på uavhengig vis ved anvendelse av tilnærmingene som er skissert heri, f.eks. i Eksempel 2.

I en utførelse omfatter CDR varianter av ethvert enkeltsekvens-CDR som beskrives heri (SEK.ID. nr. 15-46), hvor varianten omfatter 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 eller flere konservative aminosyresubstitusjoner sammenlignet med den beskrevne sekvens, bestemt ved anvendelse av dataene i tabell 1.

Videre omfattes kimære antistoffer. Som bemerket ovenfor omfatter typiske kimære antistoffer en del av tungkjeden og/eller lettkjeden som er identisk eller homolog med tilsvarende sekvenser i antistoffer avledet fra en gitt art eller tilhørende en gitt antistoffklasse eller -underklasse, mens resten av kjeden(e) er identisk eller homolog med tilsvarende sekvenser i antistoffer avledet fra en annen art eller tilhørende en annen antistoffklasse eller -underklasse, så vel som fragmenter av slike antistoffer, så lenge som de fremviser den ønskede biologiske aktivitet. Se U.S. Patentskrift nr. 4816567 og Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855.

Bispesifikke antistoffer er også anvendbare i de foreliggende fremgangsmåtene og sammensetningene. Som anvendt heri viser begrepet "bispesifikt antistoff" til et antistoff, typisk et monoklonalt antistoff, med bindingsspesifisitet for minst to forskjellige antigene epitoper, f.eks. IL-23p19 og IL-17. I en utførelse er epitopene fra samme antigen. I en annen utførelse er epitopene fra to forskjellige antigener. Fremgangsmåter

for fremstilling av bispesifikke antistoffer er kjente innen faget. For eksempel kan bispesifikke antistoffer fremstilles rekombinant ved anvendelse av ko-ekspressjon av to immunglobulin-tungkjede/lettkjede-par. Se f.eks. Milstein et al. (1983) *Nature* 305: 537-39. Alternativt kan bispesifikke antistoffer fremstilles ved kjemisk sammenkobling. Se f.eks. Brennan et al. (1985) *Science* 229:81. Bispesifikke antistoffer omfatter bispesifikke antistoffragmenter. Se f.eks. Holliger et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-48, Gruber et al. (1994) *J. Immunol.* 152:5368.

I ytterligere andre utførelser kan forskjellige konstante domener festes til de humaniserte V_L - og V_H -områdene som tilveiebringes heri. Dersom for eksempel en spesiell påtenkt anvendelse av et antistoff (eller fragment) ifølge foreliggende oppfinnelse skulle kreve endrede effektorfunksjoner, kan det anvendes et annet konstant tungkjededomene enn IgG 1. Selv om IgG 1-antistoffer tilveiebringer lang halveringstid og effektorfunksjoner som komplementaktivering og antistoffavhengig cellulær cytotoksitet, er slike aktiviteter ikke nødvendigvis ønskelige for alle anvendelser av antistoffet. I slike tilfeller kan for eksempel et konstant IgG4-område anvendes.

V. Biologisk aktivitet av humanisert anti-IL-23

Antistoffer med de egenskaper som heri er angitt som ønskelige i et humanisert anti-IL-23-antistoff kan analyseres for inhibitorisk biologisk aktivitet *in vitro* eller egnet bindingsaffinitet. For søk etter antistoffer som bindes til den epitop i humant IL-23 (dvs. p19-subenheten) som bindes av et antistoff av interesse (f.eks. antistoffer som blokkerer binding av cytokinet til reseptoren) kan en rutinemessig kryssblokkeringsanalyse, for eksempel analysen som beskrives i *ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), utføres. Antistoffer som bindes til samme epitop vil sannsynligvis kryssblokkere hverandre i slike analyser, men ikke alle kryssblokkerende antistoffer vil nødvendigvis bindes til nøyaktig samme epitop, siden kryssblokkering kan skyldes sterisk hindring av antistoffbindingen grunnet antistoffer som bindes til overlappende epitoper, eller til og med nærliggende, ikke overlappende epitoper.

Alternativt kan epitopkartlegging utføres, f.eks. som beskrevet i Champe et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:1388-1394, for å fastslå hvorvidt antistoffet binder en epitop av interesse. "Alanin-skannende mutagenese", som beskrevet av Cunningham og Wells (1989) *Science* 244: 1081-1085, eller en annen form for punktmutagenese av aminosyrerester i humant IL-23 kan også anvendes for å bestemme den funksjonelle epitopen for et anti-IL-23-antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse. Mutageneseundersøkelser kan imidlertid også avsløre aminosyrerester som er avgjørende for den totale tredimensjonale struktur av IL-23, men som ikke direkte deltar i antistoff-antigenkontakter, og

det kan følgelig være nødvendig med andre fremgangsmåter for å bekrefte en funksjonell epitop bestemt ved anvendelse av denne fremgangsmåten.

Epitopen som bindes av et spesifikt antistoff kan også identifiseres ved hjelp av strukturelle fremgangsmåter, for eksempel røntgenkrystallstrukturbestemmelse (se f.eks. WO2005/044853), molekylmodellering og kjernemagnetisk resonans (NMR)-spektroskopi, innbefattet NMR-bestemmelse av H-D-utbytningshastigheten for labile amidhydrogenatomer i fritt IL-23 og IL-23 bundet i et kompleks med antigenet av interesse (Zinn-Justin et al. (1992) *Biochemistry* 31:11335-11347, Zinn-Justin et al. (1993) *Biochemistry* 32:6884-6891).

Når det gjelder røntgenkrystallografi kan krystallisering oppnås ved anvendelse av hvilken som helst av de kjente fremgangsmåtene innen faget (f.eks. Giege et al. (1994) *Acta Crystallogr.* D50:339-350, McPherson (1990) *Eur. J. Biochem.* 189:1-23), innbefattet "microbatch"-krystallisering (f.eks. Chayen (1997) *Structure* 5:1269-1274), hengende dråpe-dampdiffusjon (f.eks. McPherson (1976) *J Biol. Chem.* 251:6300-6303), kiming og dialyse. Det er ønskelig å benytte et proteinpreparat som har en konsentrasjon på minst 1 mg/ml og fortrinnsvis fra tilnærmet 10 mg/ml til tilnærmet 20 mg/ml. Krystallisering kan best oppnås i en utfellende løsning inneholdende polyetylenglykol 1000-20000 (PEG, gjennomsnittlig molekylvekt i området fra tilnærmet 1000 til tilnærmet 20000 Da), fortrinnsvis fra tilnærmet 5000 til tilnærmet 7000 Da, mer foretrukket tilnærmet 6000 Da, med konsentrasjoner i området fra tilnærmet 10% til tilnærmet 30% (vekt/vol). Det kan også være ønskelig å inkludere et proteinstabiliserende middel, f.eks. glyserol, i en konsentrasjon i området fra tilnærmet 0,5% til tilnærmet 20%. Et egnet salt, f.eks. natriumklorid, litiumklorid eller natriumcitrat, kan også være ønskelig i den utfellende løsningen, fortrinnsvis i en konsentrasjon i området fra tilnærmet 1 mM til tilnærmet 1000 mM. Den utfellende løsningen er fortrinnsvis bufret til en pH fra tilnærmet 4,0 til tilnærmet 10,0, ofte fra tilnærmet 7,0 til 8,5, f.eks. 8,0. Spesifikke buffere som er anvendbare i den utfellende løsningen kan variere og er velkjente innen faget. Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, 3. utgave, (1994) Springer-Verlag, New York. Eksempler på anvendbare buffere omfatter, men er ikke begrenset til, HEPES, Tris, MES og acetat. Krystaller kan produseres innenfor et bredt temperaturområde, innbefattet 2 °C, 4 °C, 8 °C og 26 °C.

Antistoff: antigen-krystaller kan undersøkes ved hjelp av velkjente røntgendiffraksjonsteknikker og kan forfines ved anvendelse av datamaskin-programvare som X-PLOR (Yale Universitet, 1992, distribuert av Molecular Simulations, Inc., se f.eks. Blundell & Johnson (1985) *Meth. Enzymol.* 114 & 115, H. W. Wyckoff et al. red., Academic Press, U.S. Offentliggjorte Patentsøknad nr. 2004/0014194), og BUSTER

(Bricogne (1993) *Acta Cryst.* D49:37-60, Bricogne (1997) *Meth. Enzymol.* 276A:361-423, Carter & Sweet, red., Roversi et al. (2000) *Acta Cryst.* D56:1313-1323).

Ytterligere antistoffer som binder til den samme epitop som et antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse kan erholdes ved for eksempel analyse av antistoffer frembragt mot IL-23 for binding til epitopen eller ved immunisering av et dyr med et peptid som omfatter et fragment av humant IL-23 som omfatter epitopsekvensen. Antistoffer som binder til den samme funksjonelle epitop kan forventes å fremvise lignende biologiske aktiviteter, som blokkering av reseptorbinding, og slike aktiviteter kan bekreftes ved funksjonelle analyser av antistoffene.

Antistoffaffiniteter (f.eks. for humant IL-23) kan bestemmes ved anvendelse av standardanalyser. Foretrukne humaniserte antistoffer er antistoffer som binder humant IL-23p19 med en K_d -verdi som ikke er høyere enn tilnærmet 1×10^{-7} , fortrinnsvis ikke høyere enn tilnærmet 1×10^{-8} , mer foretrukket ikke høyere enn tilnærmet 1×10^{-9} , eller endog 1×10^{-11} M.

Antistoffene og antistofffragmentene som er anvendbare i de foreliggende sammensetningene og fremgangsmåtene er biologisk aktive antistoffer og fragmenter. Som anvendt heri viser begrepet "biologisk aktiv" til et antistoff eller antistofffragment som kan binde den ønskede antigene epitop og direkte eller indirekte utøve en biologisk virkning. Disse virkningene skyldes typisk at IL-23 ikke kan binde sin reseptor. Som anvendt heri viser begrepet "spesifikk" til den selektive binding av antistoffet til den antigene målepitop. Antistoffer kan analyseres for bindingsspesifisitet ved å sammenligne bindingen til IL-23 med bindingen til et irrelevant antigen eller en blanding av irrelevante antigener under et gitt sett av betingelser. Dersom antistoffet bindes til IL-23 minst 10, og fortrinnsvis minst 50 ganger mer enn til irrelevant antigen eller en blanding av irrelevante antigener, anses det for å være spesifikt. Et antistoff som bindes til IL-12 er ikke et IL-23-spesifikt antistoff. Et antistoff som "spesifikt bindes" til IL-23p19 bindes ikke til proteiner som ikke omfatter de IL-23p19-avledede sekvensene, dvs. at "spesifisitet" som uttrykket anvendes heri gjelder IL-23p19-spesifisitet, og ikke noen andre sekvenser som kan foreligge i proteinet det gjelder. For eksempel vil, som uttrykket anvendes heri, et antistoff som "spesifikt bindes" til IL-23p19 typisk bindes til "FLAG"-hIL-23p19, som er et fusjonsprotein som omfatter IL-23p19 og et "FLAG"-merkingspeptid, men vil ikke bindes til "FLAG"-merkingspeptidet alene eller dersom det er fusjonert til et annet protein enn IL-23p19.

Et IL-23p19-spesifikt antistoff eller et antigenbindende fragment derav ifølge foreliggende oppfinnelse, for eksempel inhiberende IL-23p19-spesifikke antistoffer, kan inhibere dets aktivitet på hvilken som helst måte, innbefattet, men ikke begrenset til, pro-

duksjonen av IL-1 β og TNF fra peritoneale makrofager og IL-17 fra TH17-T-celler. Cua og Kastelein (2006) Nat. Immunol. 7:557-559. Den inhiberende aktiviteten av modifisert anti-IL-23p19 vil være anvendbar ved behandling av inflammatoriske, autoimmune og proliferative forstyrrelser. Eksempler på slike forstyrrelser er beskrevet i de offentliggjorte PCT-patentsøknadene WO 04/081190, WO 04/071517, WO 00/53631 og WO 01/18051.

VI. Farmasøytiske sammensetninger

For fremstilling av farmasøytiske eller sterile sammensetninger som omfatter IL-23p19-antistoff, blandes cytokinanalogen eller -muteinet, antistoffet mot denne eller nukleinsyren for denne med et farmasøytisk aksepterbart bærestoff eller en farmasøytisk aksepterbart eksipiens. Se f.eks. Remington's Pharmaceutical Sciences og U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984).

Utforminger av terapeutiske og diagnostiske midler kan fremstilles ved sammenblanding med fysiologisk aksepterbare bærestoffer, eksipienser eller stabilisatorer i form av f.eks. frysetørkede pulvere, velling, vandige løsninger eller suspensjoner. Se f.eks. Hardman et al. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, NY, Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, NY, Avis et al. (red.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY, Lieberman, et al. (red.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY, Lieberman et al. (red.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY, Weiner og Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, NY.

Toksisiteten og den terapeutiske virkningen av antistoffsammensetningene, tilført alene eller i kombinasjon med et immunsupprimerende middel, kan bestemmes ved hjelp av farmasøytiske standardfremgangsmåter i cellekulturer eller forsøksdyr, for eksempel for bestemmelse av LD₅₀ (den dose som er dødelig for halvparten av populasjonen) og ED₅₀ (den dose som er terapeutisk effektiv i halvparten av populasjonen). Doseforholdet mellom toksiske og terapeutiske virkninger er den terapeutiske indeks, og den kan uttrykkes som forholdet mellom LD₅₀ og ED₅₀. Antistoffer med høy terapeutisk indeks foretrekkes. Resultatene som erholdes fra disse cellekulturanalysene og undersøkelsene i forsøksdyr kan anvendes for utforming av et doseringsområde for anvendelse i mennesker. Dosen av slike forbindelser ligger fortrinnsvis innenfor et område av konsentrasjoner i sirkulasjonen som omfatter ED₅₀ med lite eller ingen toksisitet. Dosen kan variere innenfor dette området, avhengig av den benyttede doseringsform og tilførselsvei.

Tilførselsmåten er ikke spesielt viktig. Egnede tilførselsveier kan for eksempel omfatte oral, rektal, transmukosal eller intestinal tilførsel, parenteral tilførsel, innbefattet intramuskulære, intradermale, subkutane og intramedullære injeksjoner, så vel som intratekale, direkte intraventrikulære, intravenøse, intraperitoneale, intranasale eller intraokulære injeksjoner. Tilførsel av antistoff anvendt i den farmasøytiske sammensetningen eller for utførelse av fremgangsmåten ifølge den foreliggende beskrivelse kan utføres på en rekke konvensjonelle måter, for eksempel oralt inntak, inhalering, topisk påføring eller kutan, subkutan, interperitoneal, parenteral, intraarteriell eller intravenøs injeksjon.

Alternativt kan man tilføre antistoffet på lokal snarere enn systemisk måte, for eksempel ved direkte injeksjon av antistoffet i et artrittisk ledd eller en patogenindusert lesjon med immunpatologiske endringer, ofte som et depot eller i en utforming for vedvarende frigjøring. Videre kan man tilføre antistoffet i et målstyrt medikamenttilførselssystem, for eksempel i et liposom belagt med et vevsspesifikt antistoff rettet mot f.eks. et artrittisk ledd eller en patogenindusert lesjon med immunpatologiske endringer. Liposomene vil styres til og tas opp selektivt av det rammede vev.

Utvelgelsen av et tilførselsskjema for et terapeutisk middel avhenger av flere faktorer, innbefattet molekylets omsetningshastighet i serum eller vev, symptomnivået, molekylets immunogenisitet og målcellenes tilgjengelighet i den biologiske matriks. Et tilførselsskjema maksimaliserer fortrinnsvis mengden av terapeutisk middel som tilføres pasienten, i samsvar med et akseptabelt nivå av bivirkninger. Følgelig avhenger mengden av biologisk middel som tilføres delvis av middelet det gjelder og omfanget av tilstanden som behandles. Retningslinjer for utvelgelse av egnede doser av antistoffer, cytokiner og små molekyler er tilgjengelige. Se f.eks. Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK, Kresina (red.) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY, Bach (red.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, NY, Baert et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:601-608, Milgrom et al. (1999) *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973, Slamon et al. (2001) *New Engl. J. Med.* 344:783-792, Beniaminovitz et al. (2000) *New Engl. J. Med.* 342:613-619, Ghosh et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:24-32, Lipsky et al. (2000) *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602.

Fastsettelse av den egnede dose utføres av klinikerer, f.eks. ved anvendelse av parametere eller faktorer som innen faget vites eller mistenkes å påvirke behandling eller forventes å påvirke behandling. Generelt begynner dosen med en mengde som er noe lavere enn den optimale dosen, og den økes i små trinn etter dette inntil den ønskede eller maksimale virkning oppnås relativt til eventuelle negative bivirkninger. Viktige

diagnostiske mål omfatter dem forbundet med symptomene på f.eks. betennelsen eller nivået av inflammatoriske cytokiner som produseres. Et biologisk middel som benyttes er fortrinnsvis i det vesentlige avledet fra samme art som dyret som skal behandles (f.eks. et humanisert antistoff for behandling av mennesker), slik at en eventuell immunrespons på reagenset minimaliseres.

Antistoffer, antistoffragmenter og cytokiner kan tilføres ved kontinuerlig infusjon eller i doser med et mellomrom på f.eks. en dag, 1-7 ganger i uken, ukentlig, hver annen uke, månedlig, annenhver måned osv. Dosene kan tilføres intravenøst, subkutant, topisk, oralt, nasalt, rektalt, intramuskulært, intracerebralt, intraspinalt eller ved inhaling. Et foretrukket doseringsskjema er et skjema som omfatter den maksimale dose eller doseringshyppighet som unngår vesentlige uønskede bivirkninger. En total ukentlig dose er generelt minst 0,05 µg/kg, 0,2 µg/kg, 0,5 µg/kg, 1 µg/kg, 10 µg/kg, 100 µg/kg, 0,2 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg kroppsvekt eller mer. Se f.eks. Yang et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 349:427-434, Herold et al. (2002) *New Engl. J. Med.* 346:1692-1698, Liu et al. (1999) *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67: 451-456, Portielji et al. (20003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:133-144. Den ønskede dose av et lavmolekylært terapeutisk middel, f.eks. et peptidomimetisk middel, et naturprodukt eller et organisk kjemikalium, er omtrent den samme som for et antistoff eller polypeptid, regnet som mol/kg.

Som anvendt heri omfatter ”inhibere”, ”behandle” eller ”behandling” en utsettelse av utviklingen av symptomene som er forbundet med en autoimmun sykdom eller en patogen-indusert immunsykdom og/eller en reduksjon av omfanget av slike symptomer som vil eller forventes å utvikles. Begrepene omfatter videre lindring av foreliggende ukontrollerte eller uønskede symptomer forbundet med autoimmunitet eller patogen-indusert immunsykdom, forhindring av ytterligere symptomer og lindring eller forhindring av de underliggende årsakene til slike symptomer. Begrepene angir således at et gunstig resultat har blitt overført til en vertebrat med en autoimmun sykdom, en patogenindusert immunsykdom eller et symptom på slik sykdom, eller med potensial for utvikling av en slik sykdom eller et slikt symptom.

Som anvendt heri viser ”terapeutisk effektiv mengde” eller ”effektiv mengde” til en mengde av en forbindelse som spesifikt binder IL-23p19, f.eks. et antistoff, som ved tilførsel alene eller i kombinasjon med ytterligere et terapeutisk middel til en celle, et vev eller et individ effektivt forhindrer eller lindrer den autoimmune sykdommen eller den patogen-induserte immunsykdom eller tilstand, eller utviklingen av sykdommen. En terapeutisk effektiv dose viser videre til den mengde av forbindelsen som er tilstrekkelig til å føre til en lindring av symptomer, f.eks. behandling, helbredelse, forebygging eller lindring av den angjeldende medisinske tilstanden eller en økt frekvens

av behandling, helbredelse, forebyggelse eller lindring av slike tilstander. Anvendt om en enkelt aktiv bestanddel som tilføres alene viser en terapeutisk effektiv dose til denne bestanddelen alene. Anvendt om en kombinasjon viser en terapeutisk effektiv dose til kombinerte mengder av de aktive bestanddelene som fører til den terapeutiske virkningen, enten de tilføres i kombinasjon, serielt eller samtidig. En effektiv mengde terapeutisk middel vil typisk redusere symptomene med minst 10%, vanligvis minst 20%, fortrinnsvis minst tilnærmet 30%, mer foretrukket minst 40% og mest foretrukket med minst 50%.

Fremgangsmåter for samtidig tilførsel eller behandling med et andre terapeutisk middel, f.eks. et cytokin, et antistoff, et kjemoterapeutisk middel, et antibiotikum eller strålebehandling, er velkjente innen faget, se f.eks. Hardman et al. (red.) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10. utgave, McGraw-Hill, New York, NY, Poole og Peterson (red.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA, Chabner og Longo (red.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA. Den farmasøytiske sammensetningen ifølge oppfinnelsen kan også inneholde andre immunsupprimerende eller immunmodulerende midler. Ethvert egnet immunsupprimerende middel kan benyttes, innbefattet, men ikke begrenset til, antiinflammatoriske midler, kortikosteroider, syklosporin, takrolimus (dvs. FK-506), sirolimus, interferoner, løselige cytokinreseptorer (f.eks. sTNRF og sIL-1R), midler som nøytraliserer cytokinaktivitet (f.eks. inflixmab, etanercept), mykofenolatmofetil, 15-deoksyspergualin, talidomid, glatiramer, azatioprin, leflunomid, syklofosfamid, metotreksat og lignende. Den farmasøytiske sammensetningen kan også benyttes sammen med andre terapeutiske behandlingsmetoder, for eksempel lysbehandling og stråling.

Typiske veterinærmedisinske objekter, forsøksobjekter eller forskningsobjekter omfatter apekatter, hunder, katter, rotter, mus, kaniner, marsvin, hester og mennesker.

VII. Fremstilling av antistoff

I en utførelse, for rekombinant fremstilling av antistoffene ifølge foreliggende oppfinnelse, isoleres nukleinsyrene som koder for de to kjedene og settes inn i en eller flere replikerbare vektorer for videre kloning (amplifisering av DNA) eller for ekspresjon. DNA som koder for det monoklonale antistoffet kan lett isoleres og sekvenseres ved anvendelse av konvensjonelle fremgangsmåter (f.eks. ved anvendelse av oligonukleotid-prober som kan bindes spesifikt til gener som koder for antistoffets tung- og lett-kjede). Mange vektorer er tilgjengelige. Vektorens bestanddeler omfatter generelt, men er ikke begrenset til, en eller flere av følgende: en signalsekvens, et replikasjonsorigo,

et eller flere markørgener, et enhancer-element, en promoter og en transkripsjonstermineringssekvens. I en utførelse uttrykkes både lettkjeden og tungkjeden i det humaniserte anti-IL-23p19-antistoff ifølge oppfinnelsen fra samme vektor, f.eks. et plasmid eller en adenovirusvektor.

Antistoffer ifølge foreliggende oppfinnelse kan fremstilles ved enhver fremgangsmåte som er kjent innen faget. I en utførelse uttrykkes antistoffer i pattedyrceller eller insektceller i kultur, for eksempel kinahamster-ovarieceller (CHO-celler), humane embryonale nyre (HEK)-293-celler, musemyelom-NSO-celler, hamsterungenyre (BHK)-celler eller *Spodoptera frugiperda*-ovarieceller (Sf9-celler). I en utførelse gjenvinnes antistoffer som utskilles fra CHO-celler og renses ved hjelp av kromatografiske standardmetoder, for eksempel protein A-, kationbytter-, anionbytter-, hydrofob interaksjons- og hydroksyapatitt-kromatografi. De resulterende antistoffene oppkonsentreres og lagres i 20 med mer natriumacetat pH 5,5.

I en annen utførelse fremstilles antistoffene ifølge foreliggende oppfinnelse i gjær ifølge fremgangsmåtene som beskrives i WO2005/040395. Kort beskrevet innføres vektorer som koder for de enkelte lettkjedene eller tungkjedene i et antistoff av interesse i forskjellige haploide gjærceller, f.eks. forskjellige parringstyper av gjærarten *Pichia pastoris*, hvor de haploide gjærcellene om ønskelig er komplementært auxotrofe. De transformerte haploide gjærcellene kan så parres eller fusjoneres for erholdelse av en diploid celled som kan danne både tungkjeden og lettkjeden. Den diploide stammen kan så utskille det ferdig oppbygde og biologisk aktive antistoff. Det relative ekspresjonsnivået av de to kjedene kan optimaliseres, f.eks. ved å anvende vektorer med forskjellig kopitall, anvendelse av transkripsjonspromotere med forskjellig styrke eller ved å indusere ekspresjon fra induserbare promotere som driver ekspresjonen av genene som koder for den ene eller begge kjedene.

I en utførelse innføres tungkjeder henholdsvis lettkjeder fra et stort antall forskjellige anti-IL-23p19-antistoffer i haploide gjærceller for fremstilling av et bibliotek av haploide gjærstammer av én parringstype som uttrykker et stort antall forskjellige lettkjeder, og et bibliotek av haploide gjærstammer av en annen parringstype som uttrykker et stort antall forskjellige tungkjeder. Disse bibliotekene av haploide stammer kan parres (eller fusjoneres som sfæroblaster) for fremstilling av en serie av diploide gjærceller som uttrykker et kombinatorisk bibliotek av antistoffer som omfatter de forskjellige permutasjonene av lettkjeder og tungkjeder. Det kombinatoriske antistoffbiblioteket kan så gjennomføres for å fastslå hvorvidt noen av antistoffene har egenskaper som er bedre (f. eks. høyere affinitet for EL-23) enn utgangstantistoffenes. Se f.eks. WO2005/040395.

I en annen utførelse er antistoffer ifølge foreliggende oppfinnelse humane domene-antistoffer i hvilke deler av et variabelt antistoffdomene er sammenkoblet i et polypeptid med molekylvekt tilnærmet 13 kDa. Se f.eks. U.S. Patentskrift nr. 2004/0110941. Slike enkeltdomene-midler med lav molekylvekt byr på flere fordeler når det gjelder enkel syntese, stabilitet og tilførselsvei.

VIII. Anvendelser

Den foreliggende beskrivelse tilveiebringer fremgangsmåter for anvendelse av modifiserte anti-IL-23-antistoffer og fragmenter av disse for behandling og diagnose av inflammatoriske sykdommer og tilstander, f.eks. i sentralnervesystemet, det perifere nervesystem og mage-tarmkanalen, så vel som autoimmune og proliferative forstyrrelser.

Fremgangsmåter tilveiebringes for behandling av f.eks. multipel sklerose (MS), innbefattet relapserende-remitterende MS og primær progressiv MS, Alzheimers sykdom, amyotrofisk lateralsklerose (også betegnet ALS, Lou Gehrigs sykdom), iskemisk hjerne-skade, prionsykdommer og HIV-assosiert demens. Videre tilveiebringes fremgangsmåter for behandling av nevropatisk smerte, posttraumatiske nevropatier, Guillain-Barrés syndrom (GBS), perifer polyneuropati og nervegenerasjon.

Det tilveiebringes fremgangsmåter for behandling eller lindring av et eller flere av følgende egenskaper, symptomer, aspekter, manifestasjoner eller tegn på multipel sklerose eller en annen inflammatorisk forstyrrelse eller tilstand i nervesystemet: hjernelesjoner, myelinlesjoner, demyelinisering, demyeliniserte plakk, synsforstyrrelser, tap av balanse eller koordinasjon, spastisitet, sanseforstyrrelser, inkontinens, smerte, svakhet, kronisk tretthet, paralyse, kognitiv svekkelse, bradyfreni, diplopi, optikusnevritt, parestesi, ataksisk gange, fatigue, Uhthoffs syndrom, nevralgi, afasi, apraksi, anfall, tap av synsfelt, demens, ekstrapyramidale fenomener, depresjon, velbehagsfølelse eller andre emosjonelle symptomer, kronisk progressiv myelopati og et symptom påvist ved hjelp av magnetisk resonanstomografi (MRI), innbefattet lesjoner som synliggjøres med gadolinium, evoked potensial-opptak eller undersøkelse av cerebrospinalvæske. Se f.eks. Kenealy et al. (2003) J. Neuroimmunol. 143:7-12, Noseworthy et al. (2000) New Engl. J. Med 343:938-952, Miller et al. (2003) New Engl. J. Med 348:15-23, Chang et al. (2002) New Engl. J. Med. 346:165-173, Bruck og Stadelmann (2003) Neurol. Sci. 24 Suppl. 5:S265-S267.

Videre tilveiebringer den foreliggende beskrivelse fremgangsmåter for behandling og diagnose av inflammatoriske tarmforstyrrelser, f.eks. Crohns sykdom, ulcerøs kolitt, cøliaki og irritabel tarm-syndrom. Det tilveiebringes fremgangsmåter for behandling eller lindring av et eller flere av følgende symptomer, aspekter, manifestasjoner eller

tegn på en inflammatorisk tarmforstyrrelse: malabsorpsjon av føden, endret tarmmotilitet, infeksjon, feber, buksmerter, diaré, rektalblødning, tap av kroppsvekt, tegn på feilernæring, perianal sykdom, masse i abdomen og manglende vekst, så vel som tarmkomplikasjoner som striktur, fistler, toksisk megakolon, perforasjon og kreft, og innbefattet endoskopiske funn, for eksempel skjørhet, aftøse og lineære ulcuser, brosteinutseende, pseudopolypper og affeksjon av rektum, og i tillegg anti-gjærantistoffer. Se f.eks. Podolsky, *supra*, Hanauer, *supra*, Horwitz og Fisher, *supra*.

Videre omfattes behandling av betennelsessykdommer som psoriasis, atopisk dermatitt, artritt, innbefattet reumatoid artritt, osteoartritt og psoriatisk artritt, autoimmune forstyrrelser, som systemisk lupus erythematosus og type I diabetes, og proliferative forstyrrelser, f.eks. kreft. Se f.eks. de offentliggjorte PCT-patentsøknadene WO 04/081190, WO 04/071517, WO 00/53631 og WO 01/18051.

IL-23p19-antistoffet eller det antigenbindende fragment derav ifølge foreliggende oppfinnelse kan også anvendes i kombinasjon med en eller flere antagonister av andre cytokiner (f.eks. antistoffer), innbefattet, men ikke begrenset til, IL-17A, IL-17F, IL-1 β , IL-6 og TGF- β . Se f.eks. Veldhoen (2006) *Immunity* 24:179-189, Dong (2006) *Nat. Rev. Immunol.* 6(4):329-333. I forskjellige utførelser tilføres et IL-23p19-antistoff eller et antigenbindende fragment derav ifølge oppfinnelsen, før, samtidig med eller etter tilførselen av den eller de andre antagonistene, for eksempel et anti-IL-17A-antistoff. I en utførelse anvendes en IL-17A-bindende forbindelse i behandling av de akutte tidlige fase av en skadelig immunrespons (f.eks. MS, Crohns sykdom), alene eller i kombinasjon med et antagonistisk IL-23-antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse. I dette siste tilfellet kan den IL-17A-bindende forbindelsen gradvis reduseres, mens behandlingen med antagonist av IL-23 alene fortsettes for å opprettholde undertrykkelsen av den skadelige responsen. Alternativt kan antagonister av IL-1 β , IL-6 og/eller TGF- β tilføres samtidig med, før eller etter et IL-23p19-antistoff eller et antigenbindende fragment derav ifølge foreliggende oppfinnelse. Se Cua og Kastelein (2006) *Nat. Immunol.* 7:557-559, Tato og O'Shea (2006) *Nature* 441: 166-168, Iwakura og Ishigame (2006) *J. Clin. Invest.* 116:1218-1222.

Det brede omfang av den foreliggende oppfinnelsen vil best forstås ved henvisning til de påfølgende eksemplene, som ikke er ment å skulle begrense oppfinnelsen til de spesifikke utførelsene. De spesifikke utførelsene som beskrives heri gis kun som eksempler, og oppfinnelsen skal kun være begrenset av betingelsene i de vedlagte krav, sammen med det fulle omfang av ekvivalenter som slike krav er berettiget til.

EKSEMPLER

Eksempel 1

Generelle fremgangsmåter

Standardfremgangsmåter innen molekylærbiologi er beskrevet. Maniatis et al. (1982) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, Sambrook og Russell (2001) *Molecular Cloning*, 3. utgave, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, Wu (1993) *Recombinant DNA*, bind 217, Academic Press, San Diego, CA. Standardfremgangsmåter finnes også i Ausbel et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, bind 1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, NY, som beskriver kloning i bakterieceller og DNA-mutagenese (bind 1), kloning i pattedyrceller og gjær (bind 2), glykokonjugater og protein-ekspresjon (bind 3) og bioinformatikk (bind 4).

Fremgangsmåter for proteinrensing, innbefattet immunutfelling, kromatografi, elektroforese, sentrifugering og krystallisering, er beskrevet. Coligan et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, bind 1, John Wiley and Sons, Inc., New York. Kjemisk analyse, kjemisk modifisering, post-translasjonell modifisering, fremstilling av fusjonsproteiner, glykosylering av proteiner er beskrevet. Se f.eks. Coligan et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, bind 2, John Wiley and Sons, Inc., New York, Ausubel et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, bind 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, s. 16.0.5-16.22.17, Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO, s. 45-89, Amersham Pharmacia Biotech (2001) *BioDirectory*, Piscataway, N.J., s. 384-391. Fremstilling, rensing og fragmentering av polyklonale og monoklonale antistoffer er beskrevet. Coligan et al. (2001) *Current Protocols in Immunology*, bind 1, John Wiley and Sons, Inc., New York, Harlow og Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, Harlow og Lane, *supra*. Standardteknikker for karakterisering av ligand/reseptor-interaksjoner er tilgjengelige. Se f.eks. Coligan et al. (2001) *Current Protocols in Immunology*, bind 4, John Wiley, Inc., New York.

Fremgangsmåter for væskestrømscytometri, innbefattet fluorescensaktiverte cellesorterings/-deteksjonssystemer ("FACS"), er tilgjengelige. Se f.eks. Owens et al. (1994) *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ, Givan (2001) *Flow Cytometry*, 2. utgave, Wiley-Liss, Hoboken, NJ, Shapiro (2003) *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ. Fluorescerende reagenser som er egnede for modifisering av nukleinsyrer, innbefattet nukleinsyre-primere og -prober, polypeptider og antistoffer, for anvendelse f.eks. som

diagnostiske reagenser, er tilgjengelige. Molecular Probes (2003) katalog, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, Sigma-Aldrich (2003) katalog, St. Louis, MO.

Standardfremgangsmåter for histologisk undersøkelse av immunsystemet er beskrevet. Se f.eks. Muller-Harmelink (red.) (1986) *Human Thymus: Histopathology and Pathology*, Springer Verlag, New York, NY, Hiatt, et al. (2000) *Color Atlas of Histology*, Lippincott, Williams, and Wilkins, Phila, PA, Louis, et al. (2002) *Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, New York, NY.

Programvarepakker og databaser for påvisning av f.eks. antigene fragmenter, ledersekvenser, proteinfolding, funksjonelle domener, glykosylerings seter og sekvenssammenstillinger er tilgjengelige. Se f.eks. GenBank, "Vector NTI"-pakken, (Informax, Inc, Bethesda, MD), GCG Wisconsin-pakken (Accelrys, Inc., San Diego, CA), "DeCypher" (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada, Menne et al. (2000) *Bioinformatics* 16:741-742, Menne et al. (2000) *Bioinformatics Applications Note* 16:741-742, Wren et al. (2002) *Comput. Methods Programs Biomed.* 68:177-181, von Heijne (1983) *Eur. J. Biochem.* 133:17-21, von Heijne (1986) *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690.

Eksempel 2

Frembringelse og humanisering av anti-humant IL-23p19-antistoffer

Anti-humant IL-23p19-antistoffer ble frembragt ved å immunisere IL-23p19-"knockout"-mus med kimært IL-23 (humant p19:muse-p40). Monoklonale antistoffer ble fremstilt ved standardfremgangsmåter.

Humaniseringen av de variable domenene i museantistoff 13B8 (muse-IgG1/kappa) ble i det vesentlige utført som beskrevet i de offentliggjorte PCT-patentsøknadene WO 2005/047324 og WO 2005/047326.

Kort beskrevet ble aminosyresekvensen til det ikke-humane VH-domene i antistoff 13B8 sammenlignet med en gruppe av fem humane VH-kimbane-aminosyresekvenser: en representant fra undergruppene IGHV1 og IGHV4 og tre representanter fra undergruppe IGHV3. VH-undergruppene er opplistet i M.-P. Lefranc (2001) "Nomenclature of the Human Immunoglobulin Heavy (IGH) Genes", *Experimental and Clinical Immunogenetics* 18:100-116. Antistoff 13B8 viste størst likhet med den humane kimbane-tungkjede DP-14 i undergruppe VH1.

VL-sekvensen i antistoff 13B8 er fra kappa-underklassen av VL. Aminosyresekvensen til det ikke-humane VL-domenet ble sammenlignet med en gruppe av fire humane kimbane-VL-kappa-aminosyresekvenser. Gruppen på fire består av en representant fra

hver av de fire etablerte humane VL-undergruppene som er opplistet i V. Barbie & M.-P. Lefranc (1998) "The Human Immunoglobulin Kappa Variable (IGKV) Genes and Joining (IGKJ) Segments", *Experimental and Clinical Immunogenetics* 15:171-183 og M.-P. Lefranc (2001) "Nomenclature of the Human Immunoglobulin Kappa (IGK) Genes", *Experimental and Clinical Immunogenetics* 18:161-174. De fire undergruppene tilsvarer også de fire undergruppene som er opplistet i Kabat et al. (1991 - 5. utgave) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U. S. Department of Health and Human Services, NIH Pub. 91-3242, s. 103-130. Antistoff 13B8 lignet mest på den humane kimbane-lettkjeden Z-012 i undergruppe VLkI.

Ytterligere aminosyresubstitusjoner ble innført i CDRH2, som diskutert ovenfor og vist i SEK.ID. nr. 24-26. Humaniserte variable domener fra 13B8-tungkjeden og -lettkjeden ble klonet inn i vektorer som kodet for et humant konstant $\gamma 1$ (IgG1)-tungkjededomene henholdsvis et konstant kappa-lettkjededomene. Det resulterende, humaniserte 13B8-antistoff (IgG1/kappa) bindes til IL-23 fra menneske og krabbemakak, men ikke til humant IL-12, humant p40 eller muse-IL-23.

Etter bestemmelse av mål-aminosyresekvensene i de variable tungkjedene og lettkjedene kan det fremstilles plasmider som koder for den fulle lengden av det humaniserte antistoff. Plasmidsekvenser kan endres ved anvendelse av Kunkel-mutagenese (Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 82:488-492) for å endre DNA-sekvensen til de ønskede humaniserte antistoffsekvensene. Samtidig kan en kodonoptimalisering gjennomføres for mulig oppnåelse av optimal ekspresjon.

Humaniserte former av andre antistoffer som beskrives heri kan konstrueres ved å innsubstituere de humane rammeverkene som er beskrevet for det humaniserte 13B8-antistoff eller ved å gjenta prosedyren for utvelgelse av de beste humane rammeverkene ved hjelp av fremgangsmåtene som er beskrevet i dette Eksempel. Innsubstituering av de humane rammeverkene som er beskrevet heri som deler av humanisert antistoff 13B8 er mest egnet for antistoffer med CDR-sekvenser som ligner på 13B8.

Eksempel 3

Bestemmelse av likevektsdissosiasjonskonstanten (K_d) for humanisert anti-humant IL-23 ved anvendelse av KinExA-teknologi

Likevektsdissosiasjonskonstanten (K_d) for anti-humant IL-23-antistoffer bestemmes ved anvendelse av KinExA 3000-instrumentet. Sapidyne Instruments Inc., Boise Idaho, USA. KinExA anvender prinsippet fra den kinetiske eksklusjonsanalysen, som bygger på å måle konsentrasjonen av ikke-kompleksbundet antistoff i en blanding av antistoff, antigen og antistoff-antigen-kompleks. Konsentrasjonen av fritt antistoff måles ved å

utsette blandingen for et fast fase-immobilisert antigen over et svært kort tidsrom. I praksis oppnås dette ved å la antigen-antistoff-blandingen i væskefase strømme forbi antigen-belagte partikler i en gjennomstrømningscelle. Data frembragt av instrumentet analyseres ved anvendelse av spesiallagd programvare. Likevektskonstanter beregnes ved anvendelse av en matematisk teori som bygger på følgende antakelser:

1. Bindingen følger den reversible bindingsligningen for likevekt:

$$k_{on} [Ab] [Ag] = k_{off} [AbAg]$$

2. Antistoff og antigen binder 1:1, og totalt antistoff er lik antigen-antistoff-kompleks pluss fritt antistoff.
3. Instrumentsignalet er lineært avhengig av konsentrasjonen av fritt antistoff.

98 mikrometer PMMA-partikler (Sapidyne, kat. nr. 440198) belegges med biotinyllert IL-23 ifølge Sapidyne "Protocol for coating PMMA particles with biotinylated ligands having short or nonexistent linker arms". I dette eksperimentet omfatter biotinyllert IL-23 et kompleks mellom muse-IL-12p40 og humant IL-23p19. EZ-link TFP PEO-biotin (Pierce, kat. nr. 21219) anvendes for fremstilling av biotinyllert IL-23 ifølge produsentens anbefalinger (Pierce bulletin 0874). Alle eksperimentelle prosedyrer utføres ifølge bruksanvisningen for KinExA 3000.

Bindingen av anti-IL-23p19 antistoffer anslås i en kompetitiv bindingsanalyse i hvilken antistoffer preinkuberes med ikke-sammenkoblet (nativt) humant IL-23 omfattende to disulfidsammenkoblede kjeder, humant p19 (SEK.ID. nr. 47) og humant p40 (GenBank aksesjonsbetegnelse P29460) i en serie av konsentrasjoner. De resulterende prøvene, som omfatter en blanding av ubundne antistoffer og IL-23 bundne antistoffer, får så flyte over rhIL-23-(”elastikine”)-PMMA-partiklene som er beskrevet i avsnittet ovenfor. Mengden av antistoff som innfanges av PMMA-partiklene påvises så ved anvendelse av et fluorescensmerket sekundærantistoff.

Tabell 3 viser resultatene fra KinExA-analysen, innbefattet replikatbestemmelser for hvert antistoff.

Tabell 3

K _d -verdier bestemt med KinExA	
Antistoff	K _d (pM)
m13B8	15, 52

K _d -verdier bestemt med KinExA	
Antistoff	K _d (pM)
hum13B8-a	64 ± 40, 110, 365, 447
hum13B8-b	47, 470, 520
hum13B8-c	47, 52, 470

Eksempel 4

Bestemmelse av likevektsdissosiasjonskonstanten (K_d) for humaniserte anti-humant IL-23p19-antistoffer ved anvendelse av BIAcore-teknologi

BIAcore-bestemmelser utføres i det vesentlige som beskrevet i eksempel 4 i den felles anviste, offentliggjorte U.S. Patentsøknad nr. 2007/0048315. Kort beskrevet immobiliseres ligander (anti-IL-23-mAb) til en BIAcore CM5-sensorbrikke ved anvendelse av standard aminkoblings-fremgangsmåte. IL-23 fortynnes med PBS for å oppnå forskjellige konsentrasjoner. Kinetiske konstanter for de forskjellige interaksjonene bestemmes ved anvendelse av programvaren BIAevaluation 3.1. K_d bestemmes ved anvendelse av den beregnede dissosiasjon- og assosiasjons-hastighetskonstant.

Tabell 4 gir K_d-verdiene bestemt med BIAcore, innbefattet replikatbestemmelser.

Tabell 4

K _d -bestemmelse med BIAcore	
Antistoff	K _d (pM)
m13B8	173, 228
hum13B8-a	72-104, 68-100, 81-129
hum13B8-b	77-129, 69-116
hum13B8-c	92-153

Eksempel 5

Proliferasjons-bioanalyser for vurdering av nøytraliserende anti-IL-23-antistoffer

Evnen til et monoklonalt antistoff til biologisk nøytralisering av IL-23 ble målt ved benyttelse av korttids proliferasjons-bioanalyser som benytter celler som uttrykker rekombinante IL-23-reseptorer. Den IL-23R-transfektete cellelinjen (Ba/F3-2.210-hIL-23R) uttrykker både hIL-23R og hIL-12R β 1 og responderer på både humant IL-23 og IL-23 fra krabbemakak. De transfektete Ba/F3-2.210-cellene prolifererer som respons på humant IL-23, og responsen kan inhiberes med et nøytraliserende anti-IL-23-antistoff. Et antistoff titreres mot en konsentrasjon av IL-23 valgt innenfor det lineære området av dose-responskurven, nær plataet og over EC50. Proliferasjon eller mangel på proliferasjon måles kolorimetrisk ved anvendelse av Alamar Blue, et vekstindikatorfargestoff basert på påvisning av metabolsk aktivitet. Et antistoffs evne til å nøytralisere IL-23 anslås ut fra IC50-verdien eller den konsentrasjon av antistoff som induserer en halvt maksimal inhibering av IL-23-proliferasjonen.

Ba/F3-transfektanter dyrkes i RPMI-1640-medium, 10% føtalt kalveserum, 50 μ M 2-merkaptoetanol, 2 mM L-glutamin, 50 μ g/ml penicillin-streptomycin og 10 ng/ml muse-IL-3. Ba/F3-proliferasjons-bioanalyser utføres i RPMI-1640-medium, 10% føtalt kalveserum, 50 μ M 2-merkaptoetanol, 2 mM L-glutamin og 50 μ g/ml penicillin/streptomycin.

Fremgangsmåte

Analysene utføres i 96-brønners plater med flat bunn (Falcon 3072 eller lignende) i 150 μ l pr. brønn. Anti-IL-23-antistoffer preinkuberes med IL-23 i 30-60 minutter, fulgt av tilsetning av celler og inkubering i 40-48 timer. Alamar Blue (Biosource kat. nr. DAL1100) tilsettes, og fargen får utvikles i 5-12 timer. Absorbansen avleses så ved 570 nm og 600 nm (VERSAmax mikroplateleser, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), og en OD₅₇₀₋₆₀₀ erholdes.

Cellene anvendes i en tilstand av frisk vekst, generelt ved en tetthet på $3-8 \times 10^5$ /ml. Cellene telles, nedsentrifugeres, vaskes to ganger med bioanalysemedium og suspenderes til en egnet tetthet for utsåing. En IL-23-dose-respons utføres ved anvendelse av 1:3 seriefortynninger (25:50 μ l i bioanalysemedium) av IL-23. En IL-23-konsentrasjon på 3 ng/ml (50 pM) velges for anvendelse i antistoffanalyser. Dose-respons for nøytraliserende antistoff utføres også ved anvendelse av 1:3 seriefortynninger (25:50 μ l i bioanalysemedium).

IC50-verdier bestemmes ved anvendelse av programvaren "GraphPad Prism" 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA), hvor absorbansen plottes mot konsentrasjonen av cytokin eller antistoff, og IC50-verdier bestemmes ved anvendelse av ikke-lineær regresjon (kurvetilpasning) til sigmoid dose-respons.

Tabell 5 viser IC50-verdiene for blokkering av Ba/F3-celleproliferasjon med anti-IL-23p19-antistoffer. Verdier for flere bestemmelser inngår for noen antistoffer.

Tabell 5

IC50-verdier for blokkering av Ba/F3-celleproliferasjon med anti-IL-23antistoffer	
Antistoff	IC50 (pM)
m13B8	700
hum13B8-a	1100, 1100
hum13B8-b	1200, 1100
hum13B8-c	1100, 2200

Eksempel 6

Musesplenocytanalyse for IL-23 basert på IL-17-dannelse

Den biologiske aktiviteten av anti-IL-23p19-antistoffer ifølge foreliggende oppfinnelse anslås ved anvendelse av splenocytanalysen, i det vesentlige som beskrevet i Aggarwal et al. (2003) J. Biol. Chem. 278:1910 og Stumhofer et al. (2006) Nature Immunol. 7:937. Musesplenocytanalysen måler aktiviteten av IL-23 i en prøve som nivået av IL-17 som dannes av musesplenocytene. Den inhiberende aktiviteten av anti-IL-23p19-antistoffer anslås så ved å bestemme den konsentrasjon av antistoff som er nødvendig for å redusere IL-23-aktiviteten i en gitt prøve med 50% (IC50). IC50 målt i denne analysen er høyere enn eller lik likevektsdissosiasjonsbindingskonstanten (K_d), dvs. at K_d kan være lik eller lavere enn IC50. Som alltid gjenspeiler lavere IC50- og K_d -verdier høyere aktiviteter og affiniteter.

Kort beskrevet erholdes milten fra 8-12 uker gamle C57BL/6J-hunmus (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA). Milten males, nedsentrifugeres to ganger og filtreres gjennom et celfilter (70 μ m nylon). De erholdte cellene dyrkes i 96-brønners plater (4 x 10⁵ celler/brønn) i nærvær av humant IL-23 (10 ng/ml, ~170 pM) og anti-CD3e-antistoffer fra mus (1 μ g/ml) (BD Pharmingen, Franklin Lakes, New Jersey, USA) med eller uten anti-IL-23p19-antistoffet som skal analyseres. Anti-IL-23p19-antistoffer tilsettes i en konsentrasjon på 10 μ g/ml og i 3 gangers seriefortynninger. Cellene dyrkes i 72 timer og nedsentrifugeres, og IL-17-nivået i supernatanten analyseres ved sandwich-ELISA.

IL-17-ELISA utføres som følger: Plater belegges med et anti-IL-17-innfangingsantistoff (100 ng/brønn) over natten ved 4 °C, vaskes og blokkeres. Prøver og standarder tilsettes og inkuberes i to timer ved romtemperatur under omrysting. Platene vaskes, og et biotinyllert anti-IL-17-påvisningsantistoff (100 ng/brønn) tilsettes og inkuberes i en time ved romtemperatur under omrysting. Innfangings- og påvisnings-antistoffet er forskjellige antistoffer som begge bindes til muse-IL-17, men som ikke kryssblokkerer hverandre. Platene vaskes, og bundet påvisningsantistoff påvises ved anvendelse av streptavidin-HRP (pepperrot-peroksidase) og TMB (3,3',5,5'-tetrametylbenzidin). Platen avleses så ved 450-650 nm, og konsentrasjonen av IL-17 i prøvene beregnes ved sammenligning med standarder.

IC50-verdier fra splenocytanalysen gis i Tabell 6, innbefattet noen replikatbestemmelser.

Tabell 6

IC50-verdier fra splenocytanalysen	
Antistoff-klon	IC50 (pM)
m13B8	28, 54, 64
hum13B8-a	71-108
hum13B8-b	110, 221
hum13B8-c	515

Eksempel 7

Karakterisering av et preparat av anti-IL-23p19-antistoff 13B8

Humanisert anti-IL-23p19-antistoff 13B8-b fremstilles fra pattedyrceller ved anvendelse av en vektor som inneholder sekvenser som koder for tungkjeden og lett kjeden til 13B8-b, som vist i SEK.ID. nr. 49 henholdsvis 50.

Hum13B8-b har en K_d på 297 pM for humant IL-23 målt ved BIAcore-analyse, i det vesentlige som beskrevet i Eksempel 4 (ovenfor).

Den biologiske aktiviteten til hum13B8-b anslås ved anvendelse av Ba/F3-proliferasjonsanalysen, i det vesentlige som beskrevet i eksempel 5 ovenfor, bortsett fra at det benyttes 340 pM IL-23 for å stimulere proliferasjonen, snarere enn 50 pM. Den inhiberende aktiviteten av anti-IL-23p19-antistoffer (IC50) anslås ved å bestemme den konsentrasjon av antistoff som er nødvendig for å redusere IL-23-aktiviteten i en prøve

med 50%. Som alltid gjenspeiler lavere IC₅₀-verdier høyere aktiviteter. Hum13B8-b viser en IC₅₀ på 187 pM i Ba/F3-proliferasjonsanalysen.

Den biologiske aktiviteten av hum13B8-b anslås også ved anvendelse av en human splenocytanalyse, i det vesentlige som beskrevet i Eksempel 6 ovenfor, bortsett fra at splenocytter erholdes fra milt fra menneske snarere enn mus, at det ikke benyttes anti-CD3e-antistoff og at IFN- γ avleses, snarere enn IL-17. Analysen måler aktiviteten av IL-23 i en prøve ved å bestemme nivået av IFN- γ som dannes av humane primære splenocytter. Humane splenocytter behandles med humant IL-23 (170 pM) i nærvær av forskjellige konsentrasjoner av anti-IL-23p19-antistoff hum13B8-b eller i fravær av antistoffet. IFN- γ påvises ved hjelp av sandwich-ELISA. Hum13B8-b viser en IC₅₀ på 59-144 pM i analysen med humane splenocytter.

Den biologiske aktiviteten av hum13B8-b anslås videre ved anvendelse av en KIT225 STAT-3-fosforilyringsanalyse, i det vesentlige som beskrevet i Parham et al. (2002) J. Immunol. 168:5699. Humane KIT225-celler, en leukemisk T-cellelinje, stimuleres med 138 mM humant IL-23 i nærvær av forskjellige konsentrasjoner av anti-IL-23p19-antistoff hum13B8-b eller i fravær av antistoffet. IL-23-aktiviteten måles ved å bestemme nivået av STAT3-fosforilyring. Hum13B8-b viser en IC₅₀ på 130 pM i KIT225-analysen.

Eksempel 8

Epitop for humanisert anti-IL-23p19-antistoff 13B8-b

Epitopen for binding av humanisert antistoff 13B8-b til humant IL-23p19 (SEK.ID. nr. 47) ble bestemt ved røntgenkrystallografi. Koordinater ble bestemt for et kompleks mellom et Fab-fragment av det humaniserte anti-IL-23p19-antistoff 13B8-b og ikke-koblet humant IL-23, som omfatter subenhetene p19 og p40. p40-subenheten i det IL-23 som ble anvendt for bestemmelse av strukturen har en N222Q-substitusjon, hvor Asn222 er erstattet med Gln. Sekvensen til humant IL-23p19 er vist som SEK.ID. nr. 47, og sekvensen til den modne formen av humant IL12/IL-23p40 kan finnes som aminosyrerestene 23-328 i GenBank aksjonsbetegnelse P29460. Det humaniserte anti-IL-23p19-antistoff 13B8-b omfatter den humaniserte 13B8-b-tungkjeden (SEK.ID. nr. 7) og den humaniserte 13B8-b-lettkjeden (SEK.ID. nr. 14).

Krystalliseringsbetingelsene er 15% polyetylglykol 4000, 60 mM natriumacetat, 100 mM Tris-HCl (pH 8). Krystaller kan også erholdes med andre buffere ved eller rundt pH 8.

IL-23-aminosyrerester som ligger innenfor 4,0 Å fra aminosyrerester i antistoff 13B8-b omfatter K20, T23, W26, S27, P30, E82, S95, L96, L97, P98, D99, P101, G103, Q104,

H106, A107 og L110. I tillegg lå aminosyrerestene L24, L85, T91, S100 og V102 innenfor 5,0 Å. En aminosyrerest i IL-23p19 anses å ligge innenfor en gitt avstand fra antistoffet (f.eks. 4,0 Å eller 5,0 Å) dersom koordinatene for hvilket som helst atom i aminosyreresten ligger innenfor den gitte avstanden fra koordinatene for hvilket som helst atom i antistoffet.

De fleste av disse kontakt-aminosyrerestene ligger i to ansamlinger langs primærstrukturen til IL-23p19, hvor den første ansamlingen omfatter aminosyrerestene 20-30 (hvor 6 av 11 aminosyrerester ligger innenfor 5,0 Å fra antistoffet og 5 av 11 innenfor 4,0 Å), og den andre ansamlingen omfatter aminosyrerestene 82-110 (hvor 16 av 29 aminosyrerester ligger innenfor 5,0 Å fra antistoffet og 12 av 29 innenfor 4,0 Å). Disse ansamlingene definerer epitoper som omfatter strekk av 11 eller flere på hverandre følgende aminosyrerester i IL-23p19 hvor 30%, 40%, 45%, 50%, 54% eller flere av aminosyrerestene ligger innenfor 4,0 Å eller 5,0 Å fra antistoffet.

Antistoffer som bindes til en av disse ansamlingene eller begge vil forventes å blokkere bindingen av antistoff 13B8-b og vil forventes å fremvise lignende biologiske aktiviteter.

Tabell 7 gir en kort beskrivelse av sekvensene i sekvenslisten.

Tabell 7

Sekvensnavn	
SEK.ID. nr.	Beskrivelse
1	m1A11 V _H
2	m11C1 V _H
3	m5F5 V _H
4	m21D1 V _H
5	m13B8 V _H
6	hum13B8 HC-a
7	hum13B8 HC-b
8	hum13B8 HC-c
9	m1A11 V _L
10	m11C1 V _L
11	m5F5 V _L

Sekvensnavn	
SEK.ID. nr.	Beskrivelse
12	m21D1 V _L
13	m13B8 V _L
14	hum13B8 LC
15	m1A11 CDRH1
16	m11C1 CDRH1
17	m5F5 CDRH1
18	m21D1 CDRH1
19	m13B8 CDRH1
20	m1A11 CDRH2
21	m11C1 CDRH2
22	m5F5 CDRH2
23	m21D1 CDRH2
24	m13B8 CDRH2-a
25	h13B8 CDRH2-b
26	h13B8 CDRH2-c
27	m1A11 CDRH3
28	m11C1 CDRH3
29	m5F5 CDRH3
30	m21D1 CDRH3
31	m13B8 CDRH3
32	m1A11 CDRL1
33	m11C1 CDRL1
34	m5F5 CDRL1
35	m21D1 CDRL1
36	m13B8 CDRL1
37	m1A11 CDRL2
38	m11C1 CDRL2

Sekvensnavn	
SEK.ID. nr.	Beskrivelse
39	m5F5 CDRL2
40	m21D1 CDRL2
41	m13B8 CDRL2
42	m1A11 CDRL3
43	m11C1 CDRL3
44	m5F5 CDRL3
45	m21D1 CDRL3
46	m13B8 CDRL3
47	humant IL-23p19
48	muse-IL-23p19
49	hum13B8-b HC DNA
50	hum13B8 LC DNA

P a t e n t k r a v

1. Antistoff eller antigenbindende fragment derav som binder til humant IL-23,
karakterisert ved at det omfatter:
 - a) et variabelt lettkjededomene eller et antigenbindende fragment derav, omfattende CDRL1, CDRL2 og CDRL3, hvori:

CDRL1 omfatter sekvensen ifølge SEK.ID. nr. 36

CDRL2 omfatter sekvensen ifølge SEK.ID. nr. 41 og

CDRL3 omfatter sekvensen ifølge SEK.ID. nr. 46, og
 - b) et variabelt tungkjededomene eller et antigenbindende fragment derav omfattende CDRH1, CDRH2 og CDRH3, hvori:

CDRH1 omfatter sekvensen ifølge SEK.ID. nr. 19,

CDRH2 omfatter sekvensen ifølge SEK.ID. nr. 25 og

CDRH3 omfatter sekvensen ifølge SEK.ID. nr. 31
2. Antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 1, hvor det variable lettkjededomenet omfatter aminosyrerestene 1-108 i SEK.ID. nr. 14.
3. Antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 1, hvor det variable tungkjededomenet omfatter aminosyrerestene 1-116 i SEK.ID. nr. 7.
4. Antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 1, hvor antistoffet eller fragmentet omfatter:

et variabelt antistofflettkjededomene som definert i krav 2 og

et variabelt antistofftungkjededomene som definert i krav 3.
5. Antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 4 omfattende en lettkjede og en tungkjede, hvor

lettkjeden omfatter sekvensen ifølge SEK.ID. nr. 14 og

tungkjeden omfatter sekvensen ifølge SEK.ID. nr. 7

6. Isolert nukleinsyre, **karakterisert ved at** den koder for det variable lett kjededomenet og det variable tungkjededomenet i antistoffet eller det antigenbindende fragment derav ifølge krav 1.
7. Ekspresjonsvektor, **karakterisert ved at** den omfatter nukleinsyren ifølge krav 6 operativt koblet til kontrollsekvenser som gjenkjennes av en vertscelle når vertscellen er transfektert med vektoren.
8. Vertscelle, **karakterisert ved at** den omfatter ekspresjonsvektoren ifølge krav 7.
9. Fremgangsmåte for fremstilling av et antistoff eller et antigenbindende fragment derav, **karakterisert ved at** den omfatter:
dyrking av vertscellen ifølge krav 8 i dyrkningsmedium under betingelser hvor nukleinsyresekvensen uttrykkes, slik at det dannes polypeptider som omfatter det variable lett kjede- og tungkjededomenet i antistoffet eller det antigenbindende fragment derav, og
gjenvinning av antistoffet eller det antigenbindende fragment derav fra vertscellen eller dyrkningsmediet.
10. Antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 10, hvor antistoffet eller fragmentet videre omfatter et konstant tungkjedeområde som omfatter et humant konstant $\gamma 1$ -tungkjedeområde eller en variant derav, hvor varianten av det konstant området omfatter opp til 20 konservativt modifiserte aminosyresubstitusjoner.
11. Antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 1, hvor antistoffet eller fragmentet videre omfatter et konstant tungkjedeområde som omfatter et humant konstant $\gamma 4$ -tungkjedeområde eller en variant derav, hvor varianten av det konstant området omfatter opp til 20 konservativt modifiserte aminosyresubstitusjoner.
12. Antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 1, hvor antistoffet eller det antigenbindende fragment derav er et antistofffragment utvalgt fra gruppen som består av Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂ og et diastoff.
13. Antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 1, hvor antistoffet eller fragmentet skal anvendes som et medikament.

14. Antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 1, hvor antistoffet eller fragmentet skal anvendes i behandling av en forstyrrelse utvalgt fra gruppen som består av artritt, psoriasis og inflammatorisk tarmsykdom.
15. Antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 1, hvor antistoffet eller fragmentet skal anvendes i behandling av en forstyrrelse utvalgt fra gruppen som består av multippel sklerose, systemisk lupus erythematosus og diabetes.
16. Antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 1, hvor antistoffet eller fragmentet skal anvendes i behandling av kreft.
17. Farmasøytisk sammensetning, **karakterisert ved at** den omfatter antistoffet eller det antigenbindende fragment derav ifølge krav 1 i kombinasjon med et farmasøytisk aksepterbart bærestoff eller fortynningsmiddel.
18. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 17, hvor sammensetningen videre omfatter et immunsupprimerende eller antiinflammatorisk middel.
19. Vertscelle, **karakterisert ved at** den omfatter:
 - a) en ekspresjonsvektor som omfatter en nukleinsyresekvens som koder for det variable lett kjededomenet i antistoffet eller det antigenbindende fragment derav ifølge krav 1, og
 - b) en ekspresjonsvektor som omfatter en nukleinsyresekvens som koder for det variable tungkjededomenet i antistoffet eller det antigenbindende fragment derav ifølge krav 1.
20. Fremgangsmåte for fremstilling av et antistoff eller et antigenbindende fragment derav, **karakterisert ved at** den omfatter:
 - dyrking av vertscellen ifølge krav 19 i dyrkningsmedium under betingelser hvor nukleinsyresekvensen uttrykkes, slik at det dannes polypeptider som omfatter det variable lett kjede- og tungkjededomenet i antistoffet eller det antigenbindende fragment derav, og
 - gjenvinning av antistoffet eller det antigenbindende fragment derav fra vertscellen eller dyrkningsmediet.

---CDRH1---

m1A11	EVQLQQSGPELVKTGASVNI	SCKAS	GYSFTAYYIQ	WVKQSRGKSLEWIG
m11C1	HVQLQQSGPEVVRPGASVKL	SCKAS	GYIFSAYWMT	WVKQRPQGQLEWIG
m5F5	QVQLQQSGAELARPGASVKL	SCKAS	GYTFTSYGIS	WVKQRTGQDLEWIG
m21D1	QVQLQQSGLELVKPGSSLKIS	SCKAS	GYSFTSFFIH	WLKQRPQGQLEWIG
m13B8	HVQLQQSGPELVVRPGASVEL	SCKAS	GYIFITYWMT	WMKQRPQGQLEWIG
h13B8a	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV	SCKAS	GYIFITYWMT	WVRQAPGQGLEWMG
h13B8b	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV	SCKAS	GYIFITYWMT	WVRQAPGQGLEWMG
h13B8c	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV	SCKAS	GYIFITYWMT	WVRQAPGQGLEWMG

-----CDRH2-----

m1A11	YISCYNGATRYNQKFKG	KATFTVDTSSRTAYMQFSSLTSEDSAVYFCAR
m11C1	QIFPVRGSADYNEIFEG	KATLTVDTSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCAR
m5F5	EIYPRSVNSYYNERFKG	KATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCAR
m21D1	WIFPGNHDVEYNEKFKG	KATLTADTSSTADMHLSSLTSEDSAVYFCAR
m13B8	QIFPASGSADYNEMFEG	KATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAR
h13B8a	QIFPASGSADYNEMFEG	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
h13B8b	QIFPASGSADYNEKFE	G RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
h13B8c	QIFPASGSADYAQKLQG	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR

-----CDRH3-----

m1A11	QGFYAMDY	WGQGTSVTVSS
m11C1	GGGGFAY	WGQGLTVTVSA
m5F5	GGNYGRNYGDYFDY	WGQGTTLTVSS
m21D1	GGGNL-----PY	WGQGLTVTVSA
m13B8	GGGGFAY	WGQGLTVTVSA
h13B8a	GGGGFAY	WGQGLTVTVSS
h13B8b	GGGGFAY	WGQGLTVTVSS
h13B8c	GGGGFAY	WGQGLTVTVSS

Figure 1


```

-----CDRL1-----
m1A11 NVVMTQTPLTSLVTIGQPASISC KSSQSLLDSDGKT-YLN
m11C1 DIQMTQSPASLSASVGETVTITC RASENIYS-----YLA
m5F5 SQAVVTQESALTTSPGETVTLTC RSSTGAVITSN---DAN
m21D1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC RTSENIYS-----YLA
m13B8 DIQMTQSPASLSASVGETVTITC RTSENIYS-----YLA
h13B8 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC RTSENIYS-----YLA

```

```

-CDRL2-
m1A11 WLLQRPQGSPKRLIY LVSKLDS GVPDRFTGSGSGT
m11C1 WYQEKWGKSPQLLVY NAKTLAE GVPSRFGSGSGT
m5F5 WVQEKPDHSFTGLIG GTNNRAP GVPARFSGSLIGD
m21D1 WYQQKPGKAPKLLIY NAKTLAE GVPSRFGSGSGT
m13B8 WYQQKQGKSPQLLVY NAKTLAE GVPSRFGSGSGT
h13B8 WYQQKPGKAPKLLIY NAKTLAE GVPSRFGSGSGT

```

```

--CDRL3--
m1A11 DFTLKISRVEAEDLGLYYC WQGFHFPFT FGSGTKLEIKR
m11C1 QFSLKINSLQSEDFGSYYC QHHYGTPFT FGSGTKLEIKR
m5F5 KAALTITGAQTEDEAIYFC ALWYSNHWV FGGGTKLTVLG
m21D1 DFTLTISSLQPEDFATYYC QHHYGIPFT FGQGTKVEIKR
m13B8 QFSLKINRLQPEDFGRYFC QHHYGIPFT FGSGTKLEIKR
h13B8 DFTLTISSLQPEDFATYYC QHHYGIPFT FGQGTKVEIKR

```

Figure 2

SEKVENSLISTE

<110> Schering Corporation

<120> Modifiserte anti-IL-23p19-antistoffer

<130> P32094EP-PCT

<140> PCT/US2008/002333

<141> 2008-02-20

<150> 60/891,409

<151> 2007-02-23

<160> 50

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

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

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

Tyr Ile Gln Trp Val Lys Gln Ser Arg Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Ala Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ser Arg Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gln Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

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

<210> 3

<211> 124

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

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

<210> 4

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

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

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

Phe Ile His Trp Leu Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asn His Asp Val Glu Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Asp
65 70 75 80

Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Gly Asn Leu Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ala
115

<210> 5

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

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

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

Trp Met Thr Trp Met Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Asn Glu Met Phe
50 55 60

Glu Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ala
115

<210> 6

<211> 446

<212> PRT

<213> Kunstig sekvens

<220>

<223> Humane rammeverk, CDR fra gnager

<220>

<221> DOMENE

<222> (1)..(116)

<223> variabelt domene

<400> 6

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ile Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Asn Glu Met Phe
 50 55 60
 Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 7
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Kunstig sekvens
 <220>
 <223> Humane rammeverk, CDR fra gnager
 <220>
 <221> DOMENE
 <222> (1)..(116)
 <223> Variabelt domene
 <400> 7
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ile Thr Tyr
 20 25 30

Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 8
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Kunstig sekvens
 <220>
 <223> Humane rammeverk, CDR fra gnager
 <220>
 <221> DOMENE
 <222> (1)..(116)
 <223> Variabelt domene
 <400> 8
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ile Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 9

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

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

Arg

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

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

<210> 11

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

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

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

Ser Asn Asp Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Ser Phe Thr
35 40 45

Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly
65 70 75 80

Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser
85 90 95

Asn His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 12

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Phe Gly Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Asp Leu Lys Arg
100 105

<210> 13

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

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

<210> 14

<211> 214

<212> PRT

<213> Kunstig sekvens

<220>

<223> Humane rammeverk, CDR fra gnager

<220>

<221> DOMENE

<222> (1)..(108)

<223> Variabelt domene

<400> 14

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Ile Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr Tyr Ile Gln
 1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Gly Tyr Ile Phe Ser Ala Tyr Trp Met Thr
 1 5 10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser
 1 5 10

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Phe	Phe	Ile	His
1				5					10

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

Gly	Tyr	Ile	Phe	Ile	Thr	Tyr	Trp	Met	Thr
1				5					10

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Tyr	Ile	Ser	Cys	Tyr	Asn	Gly	Ala	Thr	Arg	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Gln	Ile	Phe	Pro	Val	Arg	Gly	Ser	Ala	Asp	Tyr	Asn	Glu	Ile	Phe	Glu
1				5					10					15	

Gly

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Glu	Ile	Tyr	Pro	Arg	Ser	Val	Asn	Ser	Tyr	Tyr	Asn	Glu	Arg	Phe	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Trp Ile Phe Pro Gly Asn His Asp Val Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Asn Glu Met Phe Glu
1 5 10 15

Gly

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

<213> Kunstig sekvens

<220>

<223> CDR fra gnager med én aminosyresubstitusjon

<400> 25

Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Asn Glu Lys Phe Glu
1 5 10 15

Gly

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Kunstig sekvens

<220>

<223> CDR fra gnager med fire aminosyresubstitusjoner

<400> 26

Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 27

Gln Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 28

Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr

1 5

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 29

Gly Gly Asn Tyr Tyr Gly Arg Asn Tyr Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 30

Gly Gly Gly Asn Leu Pro Tyr

1 5

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 31

Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr

1 5

<210> 32

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 32

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 33

Arg	Ala	Ser	Glu	Asn	Ile	Tyr	Ser	Tyr	Leu	Ala
1				5					10	

<210> 34

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 34

Arg	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Ile	Thr	Ser	Asn	Asp	Ala	Asn
1				5					10				

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 35

Arg	Thr	Ser	Glu	Asn	Ile	Tyr	Ser	Tyr	Leu	Ala
1				5					10	

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 36

Arg	Thr	Ser	Glu	Asn	Ile	Tyr	Ser	Tyr	Leu	Ala
1				5					10	

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 37

Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Asp	Ser
1			5			

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 38

Asn	Ala	Lys	Thr	Leu	Ala	Glu
1			5			

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 39

Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro
1 5

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 40

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu
1 5

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 41

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu
1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 42

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 43

Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 44

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val
1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 45

Gln His His Tyr Gly Ile Pro Phe Thr
1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 46

Gln His His Tyr Gly Ile Pro Phe Thr
1 5

<210> 47

<211> 170

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Arg Ala Val Pro Gly Gly Ser Ser Pro Ala Trp Thr Gln Cys Gln Gln
1 5 10 15

Leu Ser Gln Lys Leu Cys Thr Leu Ala Trp Ser Ala His Pro Leu Val
20 25 30

Gly His Met Asp Leu Arg Glu Glu Gly Asp Glu Glu Thr Thr Asn Asp
35 40 45

Val Pro His Ile Gln Cys Gly Asp Gly Cys Asp Pro Gln Gly Leu Arg
50 55 60

Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile His Gln Gly Leu Ile Phe
65 70 75 80

Tyr Glu Lys Leu Leu Gly Ser Asp Ile Phe Thr Gly Glu Pro Ser Leu
85 90 95

Leu Pro Asp Ser Pro Val Gly Gln Leu His Ala Ser Leu Leu Gly Leu
100 105 110

Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Gly His His Trp Glu Thr Gln Gln Ile
115 120 125

Pro Ser Leu Ser Pro Ser Gln Pro Trp Gln Arg Leu Leu Leu Arg Phe
130 135 140

Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Val Ala Val Ala Ala Arg Val
145 150 155 160

Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Ser Pro
165 170

<210> 48

<211> 175

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 48

```

Val  Pro  Arg  Ser  Ser  Ser  Pro  Asp  Trp  Ala  Gln  Cys  Gln  Gln  Leu  Ser
 1      5      10     15

Arg  Asn  Leu  Cys  Met  Leu  Ala  Trp  Asn  Ala  His  Ala  Pro  Ala  Gly  His
20     25     30

Met  Asn  Leu  Leu  Arg  Glu  Glu  Glu  Asp  Glu  Glu  Thr  Lys  Asn  Asn  Val
35     40     45

Pro  Arg  Ile  Gln  Cys  Glu  Asp  Gly  Cys  Asp  Pro  Gln  Gly  Leu  Lys  Asp
50     55     60

Asn  Ser  Gln  Phe  Cys  Leu  Gln  Arg  Ile  Arg  Gln  Gly  Leu  Ala  Phe  Tyr
65     70     75     80

Lys  His  Leu  Leu  Asp  Ser  Asp  Ile  Phe  Lys  Gly  Glu  Pro  Ala  Leu  Leu
85     90     95

Pro  Asp  Ser  Pro  Met  Glu  Gln  Leu  His  Thr  Ser  Leu  Leu  Gly  Leu  Ser
100    105    110

Gln  Leu  Leu  Gln  Pro  Glu  Asp  His  Pro  Arg  Glu  Thr  Gln  Gln  Met  Pro
115    120    125

Ser  Leu  Ser  Ser  Ser  Gln  Gln  Trp  Gln  Arg  Pro  Leu  Leu  Arg  Ser  Lys
130    135    140

Ile  Leu  Arg  Ser  Leu  Gln  Ala  Phe  Leu  Ala  Ile  Ala  Ala  Arg  Val  Phe
145    150    155    160

Ala  His  Gly  Ala  Ala  Thr  Leu  Thr  Glu  Pro  Leu  Val  Pro  Thr  Ala
165    170    175

```

<210> 49

<211> 1398

<212> DNA

<213> Kunstig sekvens

<220>

<223> Humane konstante områder og rammeverkområder, CDR fra gnager

<400> 49

```

atggctgtgc tggggctgct gttctgcctg gtgacattcc caagctgtgt gctgtcccag 60
gtgcagctgg tgcagctctgg cgctgagggtg aagaagcctg gcgcctccgt gaaggctccc 120
tgcaaggctt ctggctacat cttcatcacc tactggatga cctgggtgcg gcaggccccct 180
ggccaggggc tggagtggat gggccagatc ttccctgccg gcggctctgc agactacaac 240
gagaagtctg aaggcagagt caccatgacc acagacacat ccaccagcac agcctacatg 300
gagctgagga gcctgagatc tgacgacacc gccgtgtatt actgtgccag aggcggtggc 360
ggattcgctt actggggcca gggcaccctg gtcaccgtct ccagcgtag caccaagggc 420
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac agcggccctg 480
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgctgtggaa ctcaggcgcc 540
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 600
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 660
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaatac ttgtgacaaa 720
actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc 780
ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 840
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 900
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 960
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggtgaaatg gcaaggagta caagtgaag 1020
gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1080
ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatcccggt atgagctgac caagaaccag 1140
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1260
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1380
ctgtctccgg gtaaatga 1398

```

<210> 50

<211> 702

<212> DNA

<213> Kunstig sekvens

<220>

<223> Humane konstante områder og rammeverkområder, CDR fra gnager

<400> 50

```

atggctccag tgcagctgct ggggctgctg gtgctgttcc tgccagccat gagatgtgat 60
atccagatga cccagctctc atcctccctg tctgcctctg tgggcgacag agtgaccatc 120
acctgcagga ccagcgagaa catctacagc tacctggcct ggtatcagca gaagccaggg 180
aaggccccta agctgctgat ctataacgcc aagaccctgg ctgaaggggt gccatccagg 240
ttcagcggca gcggctctgg gacagacttc accctgacca tcagcagcct gcagcctgag 300
gacttcgcca cctactactg tcagcaccac tacggaattc cattcacctt cggccagggc 360
accaaggtgg agatcaagcg tacggtggct gcaccatctg tgttcatctt ccctccatct 420
gatgagcagc tgaagtctgg aactgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 480
agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggat aagccctcc agagcggcaa ctcccaggag 540
agcgtgacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 600
agcaaagcag actacgagaa acacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca tcagggcctg 660
agcagccccg tgacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt aa 702

```