



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2099826 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.02.17
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2013.10.16
(86)	Europeisk søknadsnr	08700998.1
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.01.07
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2009.09.16
(30)	Prioritet	2007.01.05, EP, 07000211 2007.10.17, EP, 07020341 2007.01.05, US, 878831 P 2007.06.11, US, 934291 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
(73)	Innehaver	UNIVERSITY OF ZURICH, Protektorat Forschung Rämistrasse 71, 8006 Zürich, CH-Sveits
(72)	Oppfinner	NITSCH, Roger, Langwisstr. 27, CH-8126 Zumikon, CH-Sveits HOCK, Christoph, Rietstrasse 43, CH-8703 Erlenbach, CH-Sveits ESSLINGER, Christoph, Witikonerstrasse 70, 8032 Zurich, CH-Sveits KNOBLOCH, Marlen, Schaffhauserstrasse 207, 8057 Zurich, CH-Sveits TISSOT, Kathrin, Kraillinger Weg 69, 82061 Neuried, DE-Tyskland GRIMM, Jan, Bürglistr. 16, CH-8600 Dübendorf, CH-Sveits
(74)	Fullmektig	Onsagers AS, Postboks 1813 Vika, 0123 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Anti-beta amyloidantistoff og anvendelser av dette
(56)	Anførte publikasjoner	EP-A- 1 172 378 US-A1- 2006 235 207 WO-A-2005/018424 WO-A-2006/103116 DU Y ET AL: "Human anti-beta-amyloid antibodies block beta-amyloid fibril formation and prevent beta-amyloid-induced neurotoxicity" BRAIN, OXFORD UNIVERSITY PRESS, OXFORD, GB, vol. 126, no. 9, September 2003 (2003-09), pages 1935-1939, XP002360367 ISSN: 0006-8950 GEYLIS ET AL: "Immunotherapy of Alzheimer's disease (AD): From murine models to anti-amyloid beta (Abeta) human monoclonal antibodies" AUTOIMMUNITY REVIEWS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 5, no. 1, January 2006 (2006-01), pages 33-39, XP005203566 ISSN: 1568-9972 GEYLIS V ET AL: "Human monoclonal antibodies against amyloid-beta from healthy adults" NEUROBIOLOGY OF AGING, TARRYTOWN, NY, US, vol. 26, no. 5, May 2005 (2005-05), pages 597-606, XP004748495 ISSN: 0197-4580 HYMAN B T ET AL: "Autoantibodies to Amyloid-beta and Alzheimer's Disease" ANNALS OF

NEUROLOGY, BOSTON, US, vol. 49, no. 6, 2001, pages 808-810, XP001030614 ISSN: 0364-5134

MASTERS C L ET AL: "AMYLOID PLAQUE CORE PROTEIN IN ALZHEIMER DISEASE AND DOWN SYNDROME", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES (PNAS), NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, US, vol. 82, no. 12, 1 June 1985 (1985-06-01), pages 4245-4249, XP009012931, ISSN: 0027-8424, DOI: DOI:10.1073/PNAS.82.12.4245

SIMPSON J ET AL: "Antibodies to normal and Alzheimer human brain structures from non-immunised mice of various ages." FEBS LETTERS 8 JUN 1987, vol. 217, no. 1, 8 June 1987 (1987-06-08), pages 62-64, XP002430384 ISSN: 0014-5793

SIMPSON J ET AL: "Autoantibodies to Alzheimer and normal brain structures from virus-transformed lymphocytes." JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY NOV 1986, vol. 13, no. 1, November 1986 (1986-11), pages 1-8, XP002430383 ISSN: 0165-5728

WEKSLER M E ET AL: "Patients with Alzheimer disease have lower levels of serum anti-amyloid peptide antibodies than healthy elderly individuals" EXPERIMENTAL GERONTOLOGY, ELSEVIER SCIENCE, OXFORD, GB, vol. 37, no. 7, July 2002 (2002-07), pages 943-948, XP002903206 ISSN: 0531-5565

Oppfinnelsens område

[0001] Den foreliggende oppfinnelsen vedrører nye spesifikke

5 bindingsmolekyler, særlig humane antistoffer så vel som fragmenter, derivater og varianter av disse som gjenkjenner epitoper forbundet med sykdommer, inkludert neoepitoper, av proteiner som stammer fra naturlige endogene proteiner, og som er utbredt i kroppen til en pasient i en variantform og/eller ut av deres normale fysiologiske sammenheng. I tillegg vedrører den foreliggende oppfinnelsen

10 farmasøytiske sammensetninger omfattende slike bindingsmolekyler, antistoffer og etterligninger av disse i behandling av Alzheimers sykdom, amyloidoser og beta-amyloid patologi.

OPPFINNELSENS BAKGRUNN

15 **[0002]** Suksessen i å generere monoklonale antistoffer beror på effektiv og selektiv fusjon av antigen-stimulerte B-celler med en murin myelomcellelinje etterfulgt av utvelgelse av stabile antistoff-fremstillende hybrider som naturlig beskrevet av Köhler and Milstein, Nature 256 (1975) 495-497. Imidlertid er den terapeutiske nytten

20 av murint-baserte antistoffer hos mennesker hemmet av den humane anti-museantistoff (HAMA)-responsen i lys av deres ikke-humane opprinnelse. Tilnærminger for å lage menneskelige eller menneskelignende monoklonale antistoffer ble tilgjengelig ved genteknologi. Imidlertid lider metodene som har vært tilgjengelige så langt av ulempen at de ikke er egnet til å fremstille antistoffer med samme egenskaper som de som

25 fremstilles i løpet av en fysiologisk human immunrespons. Videre kan slike antistoffer ikke være spesifikke nok på grunn av kryssreaktivitet med andre proteiner og/eller målproteinet i sammenheng med normal fysiologisk funksjon. I tilfelle av for eksempel Alzheimers eller Parkinsons sykdom anses antistoffer som også kryssreagerer med høy affinitet med fysiologiske derivater av amyloid forløperprotein (APP) eller alfa-synuklein å fremvise bivirkninger relatert til de vanlige funksjonene til de fysiologiske målstrukturene. I den forbindelse ville det direkte utløst en uønsket autoimmun sykdom

30 - en knapt kalkulerbar risiko i konseptutformingen av aktive immuniseringseksperimenter som benytter proteinstrukturer som, i en variantform, også oppstår fysiologisk. Bivirkninger som ikke er forbundet med målstrukturen er for eksempel anafylaktiske reaksjoner, som er å forvente som uønskede og fryktede

35 bivirkninger av systemisk administrering av eksogene proteiner. I henhold til nyere funn, kan dette også være tilfelle i såkalte humaniserte antistoffer, som naturlig stammer fra ikke-humane organismer, vanligvis fra mus. På den annen side er aktiv immunisering med patologisk relevante antigener forbundet med den betydelige

risikoen at pasienter utvikler antistoffer og T-celleresponser som også gjenkjenner fysiologiske varianter av slike proteiner og dermed fører til en farlig og ukontrollerbar autoimmun respons.

[0003] Således er det et behov for å tilveiebringe midler som er spesifikke for et mål involvert i en lidelse, og som tolereres av menneskekroppen.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

Det tekniske problemet som ligger til grunn for den foreliggende oppfinnelsen er blitt løst ved utformingene karakterisert i kravene.

[0004] Den foreliggende oppfinnelsen gjør anvendelse av det overraskende funnet at antistoffer også kan rettes mot patofysiologisk relevante varianter av endogene proteiner, særlig mot neoepitoper, som dannes som følge av patologisk endret transkripsjon, translasjon eller post-transkripsjonell eller post-translasjonell modifikasjon, eller proteolytisk prosessering eller aggregering. Slike antistoffer rettes mot endogene proteiner som, som følge av sin nye struktur som avviker fra den normale fysiologien, blir patofysiologisk relevant ved hjelp av utvikling av patologiske effekter. Av hensyn til immuntoleranse fremviser antistoffene forbundet med den tilsvarende immunresponsen mot neoepitoper i slike patologiske varianter vanligvis ikke kryssreaktiviteter mot de fysiologisk funksjonelle proteinene, imidlertid, i motsetning til tilfellet av autoimmune sykdommer. Dette skyldes at dannelsen av potensielt kryssreaktive antistoffer spesifikt undertrykkes av de kjente toleransemekanismene, mens utviklingen av en immunrespons mot patologiske neoepitoper kan unnslippe toleranse.

[0005] Den foreliggende oppfinnelsen rettes mot humane antistoffer og antigenbindingsfragmenter av disse omfattende et variabelt tungkjedeområde (VH) og et variabelt lett kjedeområde (VL), hvori VH omfatter et første komplementaritetsbestemmende område (VHCDR1) med aminosyresekvensen SEQ ID NR: 20, et VHCDR2 med aminosyresekvensen SEQ ID NR: 21 og et VHCDR3 med aminosyresekvensen SEQ ID NR: 22, og hvori VL omfatter et VLCDR1 med aminosyresekvensen SEQ ID NR: 23, et VLCDR2 med aminosyresekvensen SEQ ID NR: 24, og et VLCDR3 med aminosyresekvensen SEQ ID NR: 25. Antistoffet er alternativt et humanisert, xenogent eller et kimærisk humant-murint antistoff, sistnevnte er særlig nyttig for diagnostikkmetoder og dyrestudier. Terapeutiske sammensetninger som inkluderer antistoffet eller aktive fragmenter av dette, eller agonister og beslektede molekyler, eller vekselvis, er antagonister for de samme og metoder for anvendelse av slike sammensetninger i forebygging, diagnose eller behandling av en sykdom ved hjelp av disse sammensetningene er også inkludert, hvori

en effektiv mengde av sammensetningen administreres til en pasient med behov for slik behandling.

[0006] Antigenbindingsfragmentet av antistoffet kan være et enkeltkjede Fv-fragment, et F(ab')-fragment, et F(ab)-fragment og et F(ab')₂-fragment, eller annet antigenbindingsfragment. I en spesifikk utforming, nedenfor, er antistoffet eller et

[0007] Den foreliggende oppfinnelsen vedrører også polynukleotider som koder for minst et variabelt område av en immunglobulinkjede av antistoffet ifølge oppfinnelsen. Det variable området omfatter minst det komplementaritetsbestemmende området (CDR) av antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelsen.

[0008] Følgelig omfatter den foreliggende oppfinnelsen også vektorer omfattende polynukleotidene og vertscellene transformert med disse, så vel som deres anvendelse for fremstilling av et antistoff og tilsvarende bindingsmolekyler som er spesifikke for neoepitoper som indikerer og/eller forårsaker Alzheimers sykdom.

[0009] Antistoffet, immunglobulinkjede(r), bindingsfragmenter av disse og antigenbinding til antistoffet kan anvendes i farmasøytiske og diagnostiske sammensetninger for henholdsvis immunterapi og diagnose. Anvendelsen av de foregående sammensetningene ved fremstilling av et medikament er imidlertid foretrukket.

[0010] Det er derfor et særlig formål med den foreliggende oppfinnelsen å tilveiebringe farmasøytiske sammensetninger for anvendelse i å behandle eller forhindre eller forsinke inntreden av sykdommer forbundet med akkumulering og avsetning av amyloid-beta-peptidet hos et individ, som *f.eks.* Alzheimers sykdom, Downs syndrom, mild kognitiv svekkelse, cerebral amyloid angiopati, vaskulær demens og multi-infarkt demens. Behandlingen omfatter å administrere en effektiv konsentrasjon av et antistoff eller antistoffderivat til individet der antistoffet binder den patologiske formen av proteinet eller proteinavsetningen med høyere affinitet enn den normale fysiologiske formen av proteinet. Ytterligere utforminger av den foreliggende oppfinnelsen vil fremgå fra beskrivelsen som følger.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

[0011] Fig. 1: Antistoff mot beta-amyloid. **A:** Humane antistoffer. **B:** Kontrollfarging med kjent antistoff mot human β -amyloid. Klinisk uvanlig stabile pasienter med Alzheimers sykdom har antistoffer mot beta-amyloidplakk. Immunhistokjemisk farging med antistoffer fra klinisk uvanlig stabile pasienter på biopsier fra pasienter med patologisk bekreftet Alzheimers sykdom avdekker antistoffer som binder til beta-amyloidplakk bekreftet av et kjent antistoff mot human β -amyloid.

[0012] Fig. 2: Antistoff mot neurofibrillære floker. **A:** Humane antistoffer. **B:** Kontrollfarging med kjent antistoff mot human tau. Friske mennesker har antistoffer mot neurofibrillære floker. Immunhistokjemisk farging med antistoffer fra friske individer på biopsier oppnådd fra pasienter med patologisk bekreftet Alzheimers sykdom avdekker antistoffer som binder til neurofibrillære floker bekreftet av et kjent antistoff mot humant tau.

[0013] Fig. 3: Antistoff mot dystrofiske neuritter. **A:** Humane antistoffer. **B:** Kontrollfarging med kjent antistoff mot human tau. Friske mennesker har antistoffer mot dystrofiske neuritter. Immunhistokjemisk farging med antistoffer fra friske individer på biopsier oppnådd fra pasienter med patologisk bekreftet Alzheimers sykdom avdekker antistoffer som binder til dystrofiske neuritter.

[0014] Fig. 4: Antistoff mot beta-amyloid. Figuren viser spesifikk binding av rekombinant humant NI-101.11-antistoff som ble isolert fra en pasient med klinisk uvanlig stabil Alzheimers sykdom mot beta-amyloidplakk i hjernen. Biopsier oppnådd fra en pasient med nevropatologisk bekreftet Alzheimers sykdom ble farget med rekombinant humant antistoff i de angitte konsentrasjonene. Antistoffbinding til beta-amyloidplakk med konsentrasjoner på 50 pM antyder binding med høy affinitet.

[0015] Fig. 5: Binding av rekombinant humant NI-101.11-antistoff til beta-amyloidplakk utkonkurreres ikke med lineære syntetiske N-terminale Abeta-polypeptider. Binding av det rekombinante antistoffet mot beta-amyloid i hjernen (0,5 nM), kan ikke utkonkurreres med N-terminalt Abeta-avledet polypeptid som representerer posisjonene 1 til 16 ved konsentrasjoner opptil 1 µM.

[0016] Fig. 6: Rekombinant humant NI-101.11-antistoff gjenkjenner en konformasjonell Abeta-epitop som ikke er til stede i monomerisk Abeta. Binding av NI-101.11 til beta-amyloidplakk på biopsier kan utkonkurreres av Abeta1-42-fibriller, men ikke lineære syntetiske Abeta1-42 monomerer.

[0017] Fig. 7: Rekombinant humant NI-101.11-antistoff binder ikke til lineær, monomerisk syntetisk Abeta på Western blott. Sammensetninger av monomerisk Abeta ble atskilt ved ikke-denaturerende PAGE. Blottet protein ble analysert med humant rekombinant antistoff mot beta-amyloid og kontrollantistoffer mot N-terminalt lineære Abeta-sekvenser (6E10). Ingen binding av NI-101.11 til monomerisk Abeta ble oppdaget. Denne observasjonen tyder på at antistoffet gjenkjenner en konformasjonell Abeta-epitop.

[0018] Fig. 8: Human NI-101.11-antistoffet binder kunstige amyloidfibriller fremstilt av syntetiske Abeta1-42 peptider. Syntetiske Abeta-fibriller eller monomerisk syntetisk Abeta belagt på ELISA-plater med like beleggtettheter ble inkubert med humane rekombinante humane antistoffer mot hjerne beta-amyloid ved de indikerte konsentrasjonene. Bindingsaktiviteten av humant antistoff mot hjerne-amyloid til kunstige amyloide fibriller (åpne kvadrater) er mer enn 100 ganger høyere i forhold til

monomerisk Abeta (fylte firkanter). Kontrollantistoffet 22C4 binder fortrinnsvis til monomerisk Abeta (fylte sirkler), og mindre godt til fibriller (åpne sirkler). Dette tyder på at NI-101.11 gjenkjenner en konformasjonell epitop som også er til stede på kunstige amyloidfibriller fremstilt av syntetiske Abeta-peptider.

[0019] Fig. 9: Fraværende kryssreaktivitet av rekombinant humant NI-101.11-antistoff til cellulær full-lengde APP eller med enhver av dens fysiologiske derivater som forekommer i dyrkede celler. I motsetning til kontrollantistoffet (6E10) som binder til celleoverflaten APP er binding av NI-101.11 til full-lengde APP til stede på cellulære overflater fraværende. Disse dataene viser fraværende kryssreaktivitet av NI-101.11 til fysiologisk, cellulær full-lengde APP.

[0020] Fig. 10A-C: Fravær av binding av NI-101.11 til monomerisk Abeta via gelfiltreringskromatografi. Figurene 10A og 10B viser ingen binding av NI-101.11 eller et ikke-forbundet kontrollantistoff mot monomerisk FITC-merket Abeta1-42 mens figur 10C viser fremtredende binding av antistoffet 22C4 som gjenkjenner en lineær epitop til stede i C-enden av Abeta.

[0021] Fig. 11: Konkurrans-ELISA viser at binding av antistoffet 6E10, et antistoff rettet mot en lineær epitop ved N-enden av Abeta kan blokkeres fullstendig ved pre-inkubering med overskytende konsentrasjoner av monomerisk Abeta-peptider mens pre-inkubering med overskuddskonsentrasjoner av disse monomerisk Abeta-peptidsammensetningene ikke avskaffet NI-101.11-binding.

[0022] Fig. 15: Rekombinant humant NI-101.11-antistoff mot hjerne-amyloid krysser blodhjernebarrieren i en transgen musemodell av Alzheimers sykdom og binder til beta-amyloid hjerneplakk *in vivo*.

[0023] Fig. 16A-B: Rekombinant humant NI-101.11-antistoff forbedrer unormal kognitiv atferd i en transgen musemodell av Alzheimers sykdom. 24 måneder gamle arcAbeta-mus ble behandlet ukentlig i.p. med 3 mg/kg antistoff i 2 måneder. Y-labyrintatferdstesting ble utført før og etter gjennomføring av behandlingen.

[0024] Fig. 17: Penetrering av blod-hjernebarrieren og dekorering av amyloidplakk ved perifert administrert NI-101.11. NI-101.11 kan krysse blodhjernebarrieren og binde til beta-amyloide avsetninger i NI-101.11-behandlede mus (venstre panel) mens ingen slik farging er synlig i dyr behandlet med humant kontrollantistoff (høyre panel). Rekombinant humant NI-101.11-antistoff reduserer beta-amyloid hjerneplakkbelastning etter systemisk behandling i to måneder.

[0025] Fig. 18: Passiv immunisering med NI-101.11 reduserer beta-amyloidbelastningen i arcAbeta-mus. (A, B) Thioflavin S og Congo Red-plakkbelastningsanalyser viser betydelige reduksjoner på mer enn 50 % sammenlignet med kontroll-antistoffbehandlede dyr (Mann-Whitney U; $p = 0,02$ for hjernebarken, $p = 0,009$ for hippocampus for ThioS og $p = 0,009$ for hjernebarken og $p = 0,04$ for hippocampus for Congo Red-analyse). Målestokk: 200 μm (C-E). Thioflavin S-analyse

avdekker en betydelig reduksjon i beta-amyloidbyrden (C), antallet beta-amyloidplakk (D) og gjennomsnittlig plakkstørrelse (E) i NI-101.11-behandlede arcAbeta-mus sammenlignet med kontrollbehandlede dyr. Mann-Whitney U-statistikk: $p = 0,02$ for plakkområdehjernebarken; $p = 0,009$ for plakkområdehippocampus; $p = 0,047$ for antallet plakk i hjernebarken; $p = 0,047$ for plakkantallet hippocampus; $p = 0,009$ for plakkantallet i hjernebarken; $p = 0,009$ for plakkantallet hippocampus.

[0026] Fig. 19: Redusert beta-amyloid belastning ledsages av redusert astrocytose og mikrogliose A) Kvantifisering av anti-GFAP-farging avdekket en signifikant reduksjon i antallet reaktive astrocytter i hjernebarken av NI-101.11-behandlede arcAbeta-mus ved sammenligning med kontrollbehandlede transgener. B) Kvantifisering av Iba-1-farging viste en trend mot et redusert antall aktiverte mikrogliia i NI-101.11-behandlede mus i hjernebarken og hippocampus. Målestokk: 200 μm .

[0027] Fig. 20: Ingen økning av mikrohjerneblødninger etter to måneders behandling med rekombinant humant NI-101.11-antistoff. 24 måneder gamle arcAbeta-mus med dokumentert massiv kongofil amyloid angiopati ble behandlet ukentlig i.p. med 3 mg/kg antistoff i 2 måneder. Et representativt bilde av en mikrohjerneblødning i arcAbeta-mus ble avdekket av Perls berlinerblå farging (til venstre). Kvantitativ analyse viser en signifikant forhøyet frekvens av mikrobldninger i arcAbeta-transgene mus i forhold til deres kullsøsken av naturlige mus. Kronisk behandling med NI-101.11 resulterte ikke i økt frekvens av mikrobldninger. Målestokk: 20 μm

[0028] Fig. 21: Det rekombinante humane NI-101.11-antistoffet hemmer dannelsen av syntetiske Abeta-fibriller *in vitro*. Effekten av det rekombinante humane NI-101.11-antistoffet på dannelsen av Abeta-fibriller ble analysert ved å måle Thioflavin S bundet til aggregert Ap ved fluorescensanalyse.

[0029] Fig. 22: Antistoff-mediert doseavhengig fagocytose av FITC-Abeta1-42- fibriller fra BV-2-mikrogliale celler ble målt ved hemming av det passiverende reseptorsystemet. NI-101.11 utløser potent doseavhengig Fcgamma-reseptor-mediert fagocytose av Abeta-fibriller.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

I. Definisjoner

[0030] Begrepene "antistoff" og "immunglobulin" anvendes om hverandre i dette dokumentet. Et antistoff eller immunglobulin er et antigenbindingsmolekyl som omfatter minst det variable domenet av en tung kjede, og omfatter vanligvis i det minste de variable domenene av en tung kjede og en lett kjede. Grunnleggende immunglobulinstrukturer i virveldyrssystemer er relativt godt forstått. Se *f.eks.* Harlow

et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2. utg. 1988).

[0031]

Som det vil bli omtalt i mer detalj nedenfor, omfatter begrepet "immunglobulin" forskjellige brede klasser av polypeptider som kan skilles biokjemisk. Fagfolk på området vil forstå at tunge kjeder klassifiseres som gamma, mu, alfa, delta eller epsilon, (γ , μ , α , δ , ϵ) med noen underklasser blant dem (*f.eks.* $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Det er innholdet i denne kjeden som bestemmer "klassen" av antistoffet som henholdsvis IgG, IgM, IgA, IgG, eller IgE. Immunglobulinunderklassene (isotyper) *f.eks.* IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, en IgA osv. er godt karakterisert og er kjent for å gi funksjonell spesialisering. Modifiserte versjoner av hver av disse klassene og isotypene er lett å skjelne for fagmannen på området i lys av den foreliggende offentliggjøringen og er følgelig innenfor omfanget av den foreliggende oppfinnelsen. Alle immunglobulinklassene er klart innenfor omfanget av foreliggende oppfinnelsen, og den følgende omtalen vil generelt rettes mot IgG-klassen av immunglobulinmolekyler. Med hensyn til IgG omfatter et standard immunglobulinmolekyl to identiske lettkjedepolypeptider med molekylvekt på omtrent 23 000 dalton og to identiske tungkjedepolypeptider med molekylvekt 53 000-70 000. De fire kjedene forbindes vanligvis ved disulfidbindinger i en "Y"-konfigurasjon hvori de lette kjedene setter i klamme de tunge kjedene som starter ved munningen av "Y" og fortsetter gjennom det variable området.

[0032]

De lette kjedene klassifiseres som enten kappa eller lambda (κ , λ). Hver klasse av tunge kjeder kan bindes med enten en lett kjede av kappa- eller lambda. Generelt er de lette og tunge kjedene kovalent bundet til hverandre og "hale"-delene av de to tunge kjedene bindes til hverandre ved kovalente disulfidbindinger eller ikke-kovalente bindinger når immunglobulinene genereres enten ved hybridomer, B-celler eller genmodifiserte vertsceller. I den tunge kjeden driver aminosyresekvensene fra en N-enden på de gaffelformede endene av Y-konfigurasjonen til C-enden i bunnen av hver kjede.

[0033]

Både de lette og tunge kjedene deles inn i områder av strukturell og funksjonell homologi. Begrepene "konstant" og "variabel" anvendes funksjonelt. I denne forbindelse vil det forstås at de variable domenene av både de lette (VL) og tunge (VH) kjededelene bestemmer antigengjenkjennelse og spesifisitet. Omvendt gir de konstante domenene av den lette kjeden (CL) og den tunge kjeden (CH1, CH2 eller CH3) viktige biologiske egenskaper, så som sekresjon, transplacentær mobilitet, Fc-reseptorbinding, komplementbinding og lignende. Konvensjonelt øker nummereringen av de konstante områdedomenene etter hvert som de fjerner seg fra antigenbindingssetet eller aminoenden til antistoffet. N-endedelen er et variabelt område, og ved C-endedelen er det et konstant område; CH3- og CL-domenene utgjør faktisk karboksyenden av henholdsvis den tunge og den lette kjeden.

[0034] Som angitt ovenfor tillater det variable området antistoffet å selektivt gjenkjenne og spesifikt binde epitoper på antigener. Det vil si at VL- og VH-domenet, eller et delsett av de komplementaritetsbestemmende områdene (CDR-ene) av et antistoff kombineres for å danne det variable området som definerer et tredimensjonalt antigenbindingssete. Denne kvaternære antistoffstrukturen danner antigenbindingssetet til stede ved slutten av hver arm av Y. Mer spesifikt defineres antigenbindingssetet ved tre CDR-er i hver av VH- og VL-kjedene. Et hvilket som helst antistoff eller immunglobulinfragment som inneholder tilstrekkelig struktur til å spesifikt bindes til et antigen er om hverandre betegnet i dette dokumentet som et "antigenbindingsfragment" eller et "immunspesifikt fragment."

[0035] I naturlig forekommende antistoffer er de seks "komplementaritetsbestemmende områdene" eller "CDR-ene" til stede i hvert antigenbindingsdomene korte, ikke-sammenhengende sekvenser av aminosyrer som er spesifikt plassert for å danne antigenbindingsdomenet når antistoffet inntar den tredimensjonale konfigurasjonen sin i et vandig miljø. Resten av aminosyrene i antigenbindingsdomenene, referert til som "ramme"-områder, viser mindre intermolekylær variabilitet. Rammeområdene adopterer i stor grad en β -ark-konformasjon og CDR-ene danner sløyfer som forbinder, og i noen tilfeller danner, en del av β -arkstrukturen. Således virker rammeområdene ved å danne et stillas som sørger for å posisjonere CDR-ene i riktig orientering ved inter-kjede, ikke-kovalente interaksjoner. Antigenbindingsdomenet dannet av de posisjonerte CDR-ene definerer en overflate komplementær med epitopen på det immunreaktive antigenet. Denne komplementære overflaten fremmer den ikke-kovalente bindingen av antistoffet til dets kognatepitop. Aminosyrene omfattende henholdsvis CDR-ene og rammeområdene kan lett identifiseres for et hvilket som helst gitt tungt- eller lett kjedevariabelt område av en fagmann på området, ettersom de har blitt definert nøyaktig (se "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E., *et al.*, U.S. Department of Health and Human Services, {1983}; og Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987).

[0036] I det tilfelle der det er to eller flere definisjoner av et begrep som anvendes og/ eller aksepteres innen faget, er definisjonen av begrepet som anvendt i dette dokumentet ment å inkludere alle slike betydninger med mindre det motsatte er uttrykkelig angitt. Et spesifikt eksempel er anvendelsen av begrepet "komplementaritetsbestemmende område" ("CDR") for å beskrive de ikke-sammenhengende antigenkombinerende setene innenfor det variable området i både polypeptidene av de tunge og lette kjedene. Dette bestemte området har blitt beskrevet av Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) og av Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) der definisjonene inkluderer overlappende eller delsett av aminosyrerester sammenlignet med hverandre. Likevel er anvendelsen av begge definisjonene for å

referere til et CDR fra et antistoff eller varianter av dette ment å være innenfor omfanget av begrepet slik det defineres og anvendes i dette dokumentet. De hensiktsmessige aminosyrerestene som omfatter CDR-ene som definert av hver av de ovennevnte siterte referansene er fremsatt nedenfor i tabell I som en sammenligning.

De nøyaktige resttallene som omfatter et bestemt CDR vil variere avhengig av sekvensen og størrelsen til CDR-et. Fagfolk på området kan rutinemessig bestemme hvilke rester som omfatter et bestemt CDR gitt aminosyresekvensen i de variable områdene av antistoffet.

Tabell 1: CDR-definisjoner¹

	Kabat	Chotia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

¹Nummereringen av alle CDR-definisjonene i tabell 1 er i henhold til nummereringskonvensjonene fastsatt av Kabat *et al.* (se nedenfor).

[0037] Kabat *et al.* definerte også et nummereringssystem for variable domenesekvenser som gjelder for ethvert antistoff. En fagmann på området kan entydig tildele dette "Kabat-nummererings"-systemet til enhver variabel domenesekvens, uten å avhenge av eksperimentelle data utover sekvensen i seg selv. Som anvendt i dette dokumentet refererer "Kabat-nummerering" til nummereringssystemet fremsatt av Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). Med mindre annet er spesifisert er henvisninger til nummereringen av spesifikke aminosyrerestposisjoner i et antistoff eller antigenbindingsfragment, en variant, eller et derivat av disse ifølge den foreliggende oppfinnelsen i henhold til Kabat-nummereringssystemet.

[0038] Antistoffer eller antigenbindingsfragmenter, immunspekifikke fragmenter, varianter eller derivater av disse ifølge oppfinnelsen inkluderer, men er ikke begrenset til, polyklonale, monoklonale, flerspekifikke, humane, humaniserte, primatiserte eller kimære antistoffer, enkeltkjedeantistoffer, epitop-bindende fragmenter, *f.eks.* Fab, Fab' og F(ab')₂, Fd, Fv-er, enkeltkjede Fv-er (scFv), enkeltkjedeantistoffer, disulfidbundede Fv-er (sdFv), fragmenter omfattende enten et VL- eller VH-domene, fragmenter fremstilt av et Fab-ekspresjonsbibliotek og anti-

idiotypiske (anti-Id) antistoffer (inkludert *f.eks.* anti-Id-antistoffer mot antistoffer offentliggjort i dette dokumentet). ScFv-molekyler er kjent innen faget og er beskrevet i *f.eks.* amerikansk patent 5 892 019. Immunglobulin eller antistoffmolekyler ifølge oppfinnelsen kan være av enhver type (*f.eks.* IgG, IgE, IgM, IgD, IgA og IgY), klasse (*f.eks.* IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 og IgA2) eller underklasse av

[0039] I en utforming er antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelsen ikke IgM eller et derivat av denne med en femverdig struktur. Spesielt, i spesifikke anvendelser av den foreliggende oppfinnelsen, spesielt terapeutisk anvendelse, er IgM-er er mindre nyttige enn IgG og andre toverdige antistoffer eller tilsvarende bindingsmolekyler siden IgM-er, som følge av deres femverdige struktur og mangel på affinitetsmodning, ofte viser uspesifikk kryssreaktivitet og meget lav affinitet.

[0040] Antistoffragmenter, inkludert enkeltkjedeantistoffer, kan omfatte de(n) variable område(ne) alene eller i kombinasjon med helheten eller en del av følgende: hengselsområde, CH1-, CH2- og CH3-domener. Også inkludert i oppfinnelsen er antigenbindingsfragmenter også omfattende enhver kombinasjon av ett eller flere variable områder med et hengselsområde, CH1-, CH2- og CH3-domener. Antistoffer eller immunspesifikke fragmenter av disse ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan være fra enhver animalsk opprinnelse, inkludert fugler og pattedyr. Fortrinnsvis er antistoffene human-, murine-, esel-, kanin-, geit-, marsvin-, kamel-, lama-, hest- eller kyllingantistoffer. I en annen utforming kan det variable området stamme fra bruskfisker (*f.eks.* haier). Som anvendt i dette dokumentet inkluderer "humane" antistoffer antistoffer med aminosyresekvensen til et humant immunglobulin og inkluderer antistoffer isolert fra humane pasienter, humane immunglobulinbiblioteker eller fra transgene dyr for ett eller flere humane immunglobuliner, og som ikke uttrykker endogene immunglobuliner, som beskrevet nedenfor, og for eksempel i amerikansk patent nr. 5 939 598 av Kucherlapati *et al.* Et humant antistoff er fortsatt "humant" selv om aminosyresubstitusjoner gjøres i antistoffet, *f.eks.* for å forbedre bindingskarakteristika.

[0041] Som anvendt i dette dokumentet inkluderer begrepet "tung kjededel" aminosyresekvenser som stammer fra en tung immunglobulinkjede. Et polypeptid omfattende en tung kjededel omfatter minst én av: et CH1-domene, et hengseldomene (*f.eks.*, øvre, midtre og/eller nedre hengseldomene), et CH2-domene, et CH3-domene eller en variant eller fragment av disse. For eksempel kan et bindingspolypeptid for anvendelse i oppfinnelsen omfatte en polypeptidkjede omfattende et CH1-domene; en polypeptidkjede omfattende et CH1-domene, minst én del av et hengseldomene, og et CH2-domene; en polypeptidkjede omfattende et CH1-domene og et CH3-domene; en polypeptidkjede omfattende et CH1-domene, minst én del av et hengseldomene og et CH3-domene, eller en polypeptidkjede omfattende et CH1-domene, minst én del av et

hengseldomene, et CH2-domene, og et CH3-domene. I en annen utforming omfatter et polypeptid ifølge oppfinnelsen en polypeptidkjede omfattende et CH3-domene. Videre kan et bindingspolypeptid for anvendelse i oppfinnelsen mangle minst én del av et CH2-domene (*f.eks.* hele eller én del av et CH2-domene). Som fremsatt ovenfor vil en fagmann på området forstå at disse domenene (*f.eks.* de tunge kjededelene) kan modifiseres slik at de varierer i aminosyresekvens fra det naturlig forekommende immunglobulinmolekylet.

[0042] I visse antistoffer, eller antigenbindingsfragmenter, varianter eller derivater av disse offentliggjort i dette dokumentet er de tunge kjededelene av en polypeptidkjede av en multimer identisk med de i en andre polypeptidkjede av multimeren. Alternativt er tunge kjededel-holdige monomerer ifølge oppfinnelsen ikke identiske. For eksempel kan hver monomer omfatte et annet målbindingssete, som for eksempel danner et bispesifikt antistoff.

[0043] De tunge kjededelene av et bindingspolypeptid for anvendelse i diagnostikk- og behandlingsmetodene offentliggjort i dette dokumentet kan stamme fra forskjellige immunglobulinmolekyler. For eksempel kan en tung kjededel av et polypeptid omfatte et CH1-domene som stammer fra et IgG1-molekyl og et hengselområde som stammer fra et IgG3-molekyl. I et annet eksempel kan en tung kjededel omfatte et hengselområde som delvis stammer fra et IgG1-molekyl og delvis fra et IgG3-molekyl. I et annet eksempel kan en tung kjededel omfatte et kimært hengsel som delvis stammer fra et IgG1-molekyl og delvis fra et IgG4-molekyl.

[0044] Som anvendt i dette dokumentet inkluderer begrepet "lett kjededel" aminosyresekvenser som stammer fra en lett immunglobulinkjede. Den lette kjededelen omfatter fortrinnsvis minst én av et VL- eller CL-domene.

[0045] Den minste størrelsen for en peptid- eller polypeptidepitop for et antistoff antas å være omtrent fire til fem aminosyrer. Peptid- eller polypeptidepitoper inneholder fortrinnsvis minst syv, mer foretrukket minst ni og mest foretrukket mellom minst omtrent 15 til omtrent 30 aminosyrer. Siden et CDR kan gjenkjenne et antigen peptid eller polypeptid i sin tertiære form må ikke aminosyrene omfattende en epitop være sammenhengende, og i noen tilfeller er de kanskje ikke engang i den samme peptidkjeden. I den foreliggende oppfinnelsen inneholder peptid- eller polypeptidepitop gjenkjent av antistoffene ifølge den foreliggende oppfinnelsen en sekvens på minst 4, minst 5, minst 6, minst 7, mer foretrukket minst 8, minst 9, minst 10, minst 15, minst 20, minst 25, eller mellom omtrent 15 til omtrent 30 sammenhengende eller ikke-sammenhengende aminosyrer av A β .

[0046] Begrepet "neoepitop" i henhold til den foreliggende oppfinnelsen betegner en epitop som er unik for et sykdomsmønster og inneholdt i eller dannet av et lidelsesforbundet protein som er en patologisk variant fra et ellers ikke-patologisk protein og/eller avviker fra fysiologien av den friske tilstanden. De patofysiologiske

variantene kan dannes ved hjelp av patologisk endret transkripsjon, patologisk endret translasjon, post-translasjonell modifikasjon, patologisk endret proteolytisk prosessering, patologisk endret kompleksdannelse med fysiologiske eller patofysiologiske interaksjonspartnere eller cellulære strukturer i betydningen av en endret co-lokalisering eller patologisk endret strukturell konformasjon - som for eksempel aggregering, oligomerisering eller fibrillering - hvis tre- eller fire-dimensjonale struktur avviker fra strukturen i det fysiologisk aktive molekylet. Videre kan en patofysiologisk variant også karakteriseres ved at den ikke lokaliseres i sitt vanlige fysiologiske miljø eller subcellulære rom. For eksempel kan neoepitoper være lokalisert i de patologisk iøynefallende strukturene i hjernevevsmrådene som åpenbart opplever eller allerede har opplevd funksjonell skade. Hvorvidt en gitt struktur, for eksempel celle eller vev, eller protein viser en neoepitop kan verifiseres ved å reversere metoden beskrevet nedenfor for å isolere og karakterisere et lidelsesforbundet proteinspesifikt bindingsmolekyl ved at et bindingsmolekyl, for eksempel antistoff identifisert av metoden, anvendes for å screene en prøve for binding til antistoffet, for å derved bestemme tilstedeværelsen av en neoepitop.

[0047] Begrepe "spesifikt sykdomsforbundet protein" og "spesifikk neoepitop" anvendes om hverandre i dette dokumentet med begrepet "spesifikt gjenkjenner en neoepitop". Som anvendt i dette dokumentet refererer begreper som "fravær av kryssreaktivitet", "spesifikk", "spesifikt gjenkjenner", "spesifikt bindende/binder", "binder fortrinnsvis" og lignende til bindingsmolekylets evne til å skjelne mellom neoepitopen av et lidelsesforbundet protein og det naturlige proteinet i dets villtypeform og naturlige sammenheng. Således har bindingsmolekylet av den foreliggende oppfinnelsen en preferensiell bindingsaffinitet til neoepitopen over det naturlige proteinantigenet med en faktor på minst 2, fortrinnsvis minst 5, vanligvis større enn en faktor på 10, særlig foretrukket med en faktor på 50 og enda mer foretrukket høyere enn 100. Videre er den relative K_D -en av bindingsmolekylet, *f.eks.* antistoffet for den spesifikke målepitopen, *f.eks.* neoepitopen fortrinnsvis minst 10 ganger mindre, mer foretrukket minst 100 ganger mindre eller mer enn K_D -en for å binde det antistoffet til andre ligander eller til den naturlige motparten av det sykdomsforbundede proteinet.

[0048] Med "binder spesifikt", eller "spesifikt gjenkjenner," anvendt om hverandre i dette dokumentet, menes generelt at et bindingsmolekyl, *f.eks.* et antistoff binder til en epitop via sitt antigenbindingsdomene, og at bindingen medfører en viss komplementaritet mellom antigenbindingsdomenet og epitopen. I henhold til denne definisjonen sies et antistoff å "binde spesifikt" til en epitop når det binder til den epitopen via sitt antigenbindingsdomene lettere enn det ville binde til en tilfeldig, ikke-forbundet epitop. Begrepet "spesifisitet" anvendes i dette dokumentet for å kvalifisere den relative affiniteten for hvilket et visst antistoff binder til en viss epitop. For

eksempel kan antistoff "A" anses å ha en høyere spesifisitet for en gitt epitop enn antistoff "B", eller antistoff "A" kan sies å binde til epitop "C" med en høyere spesifisitet enn det for forbundet epitop "D."

[0049] Med "fortrinnsvis binder" menes at bindingsmolekyl, *f.eks.*

5 antistoffet, spesifikt binder til en epitop lettere enn det ville binde til et forbundet, tilsvarende, homologt eller analogt epitop. Dermed vil et antistoff som "fortrinnsvis binder" til en gitt epitop mer sannsynlig binde til den epitopen enn til en forbundet epitop, selv om et slikt antistoff kan kryssreagere med den forbundne epitopen.

[0050] Som et ikke-begrensende eksempel kan et bindingsmolekyl, *f.eks.* et

10 antistoff, betraktes å binde en første epitop fortrinnsvis dersom det binder den første epitopen med en dissosiasjonskonstant (K_D) som er mindre enn antistoffets K_D for den andre epitopen. I et annet ikke-begrensende eksempel kan et antistoff betraktes å binde et første antigen fortrinnsvis hvis det binder den første epitopen med en affinitet som er minst én størrelsesorden mindre enn K_D -en til antistoffet for den andre epitopen. I et

15 annet ikke-begrensende eksempel kan et antistoff betraktes å binde til en første epitop fortrinnsvis dersom det binder den første epitopen med en affinitet som er minst to størrelsesordener mindre enn K_D -en til antistoffet for den andre epitopen.

[0051] I et annet ikke-begrensende eksempel kan et bindingsmolekyl, *f.eks.* et

20 antistoff, regnes for å binde fortrinnsvis en første epitop hvis det binder den første epitopen med en av-grad (eng.: off rate) ($k(av)$) (eng.: $k(off)$) som er mindre enn antistoffets $k(av)$ for den andre epitopen. I et annet ikke-begrensende eksempel kan et antistoff betraktes å binde en første epitop, fortrinnsvis dersom det binder den første epitopen med en affinitet som er minst én størrelsesorden mindre enn antistoffets $k(av)$ for den andre epitopen. I et annet ikke-begrensende eksempel kan et antistoff betraktes

25 å binde en første epitop fortrinnsvis dersom det binder den første epitopen med en affinitet som er minst to størrelsesordener mindre enn antistoffets $k(av)$ for den andre epitopen.

[0052] Et bindingsmolekyl, *f.eks.* et antistoff- eller antigenbindingsfragment, en variant, eller et derivat offentliggjort i dette dokumentet kan sies å binde et

30 målpolypeptid offentliggjort i dette dokumentet eller et fragment eller variant av disse med en av-grad ($k(av)$) på mindre enn eller lik $5 \times 10^{-2} \text{ sek}^{-1}$, 10^{-2} sek^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ sek}^{-1}$ eller 10^{-3} sek^{-1} . Mer foretrukket kan et antistoff ifølge oppfinnelsen sies å binde et målpolypeptid offentliggjort i dette dokumentet eller et fragment eller variant av dette med en av-grad ($k(av)$) på mindre enn eller lik $5 \times 10^{-4} \text{ sek}^{-1}$, 10^{-4} sek^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ sek}^{-1}$

35 eller 10^{-5} sek^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ sek}^{-1}$, 10^{-6} sek^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ sek}^{-1}$ eller 10^{-7} sek^{-1} .

[0053] Et bindingsmolekyl, *f.eks.* et antistoff- eller antigenbindingsfragment, en variant, eller et derivat offentliggjort i dette dokumentet kan sies å binde et

målpolypeptid offentliggjort i dette dokumentet eller et fragment eller en variant av disse med en på-grad (eng.: on rate) (k_{on}) (eng.: (k_{on})) på større enn eller lik $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ eller $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Mer foretrukket sies et antistoff ifølge oppfinnelsen å binde et målpolypeptid offentliggjort i dette dokumentet eller et fragment eller variant av dette med en på-grad (k_{on}) større enn eller lik $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, eller $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ eller $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

[0054] Et bindingsmolekyl, *f.eks.* et antistoff sies å kompetitivt hemme bindingen av et referanseantistoff til en gitt epitop hvis det fortrinnsvis binder til den epitopen i den grad at den blokkerer, i noe grad, binding av referanseantistoffet til epitopen. Kompetitiv hemming kan bestemmes ved enhver metode kjent innen faget, for eksempel, ELISA-konkurranseanalyser. Et antistoff kan sies å hemme bindingen av referanseantistoffet til en gitt epitop minst 90 %, minst 80 %, minst 70 %, minst 60 % eller minst 50 % kompetitivt.

[0055] Som anvendt i denne offentliggjøringen refererer begrepet "affinitet" til et mål på styrken av binding av en individuell epitop med CDR-et fra et bindingsmolekyl, *f.eks.* et immunglobulinmolekyl. Se *f.eks.* Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2. utg. 1988) side 27-28. Som anvendt i dette dokumentet refererer begrepet "aviditet" til den samlede stabiliteten av komplekset mellom en populasjon av immunglobuliner og et antigen, det vil si den funksjonelle kombinerende styrken av en immunglobulinblanding med antigenet. Se *f.eks.* Harlow på side 29-34. Aviditet er forbundet til både affiniteten av de individuelle immunglobulinmolekylene i populasjonen med spesifikke epitoper, og også valensene av immunglobulinene og antigenet. For eksempel vil interaksjonen mellom et toverdig monoklonalt antistoff og et antigen med en svært repeterende epitop struktur, som en polymer, være av høy aviditet.

[0056] Bindingsmolekyler, *f.eks.* antistoffer eller antigenbindingsfragmenter, varianter eller derivater av disse ifølge oppfinnelsen kan også beskrives eller spesifiseres ved deres kryssreaktivitet. Som anvendt i dette dokumentet refererer begrepet "kryssreaktivitet" til evnen til et antistoff, spesifikt ett antigen, for å reagere med et andre antigen; et mål på slektskap mellom to forskjellige antigene stoffer. Således er et antistoff kryssreaktivt hvis det binder til en annen epitop enn den som induserte dannelsen av den. Den kryssreaktive epitopen inneholder generelt mange av de samme komplementære strukturelle egenskapene som den induserende epitopen, og i noen tilfeller kan den faktisk passe bedre enn den naturlige.

[0057] For eksempel har visse antistoffer noe grad av kryssreaktivitet ved at de binder forbundne, men ikke-identiske epitoper, *f.eks.* epitoper med minst 95 %, minst 90 %, minst 85 %, minst 80 %, minst 75 %, minst 70 %, minst 65 %, minst 60 %, minst 55 % og minst 50 % identitet (som beregnet ved hjelp av metoder kjent innen faget og beskrevet i dette dokumentet) til en referanseepitop. Et antistoff

kan sies å ha liten eller ingen kryssreaktivitet hvis det ikke binder epitoper med mindre enn 95 %, mindre enn 90 %, mindre enn 85 %, mindre enn 80 %, mindre enn 75 %, mindre enn 70 %, mindre enn 65 %, mindre enn 60 %, mindre enn 55 % og mindre enn 50 % identitet (som beregnet ved hjelp av metoder kjent innen faget og beskrevet i dette dokumentet) med en referanseepitop. Et antistoff kan anses som "svært spesifikk" for en viss epitop, hvis det ikke binder en annen analog, ortolog eller homolog av den epitopen.

[0058] Bindingsmolekyler, *f.eks.* antistoffer eller antigenbindingsfragmenter, varianter eller derivater av disse ifølge oppfinnelsen kan også beskrives eller spesifiseres ved sin bindingsaffinitet til et polypeptid ifølge oppfinnelsen. Foretrukne bindingsaffiniteter inkluderer de med en dissosiasjonskonstant eller K_d på mindre enn 5×10^{-2} M, 10^{-2} , 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M eller 10^{-15} M.

[0059] Som indikert tidligere er delenhetsstrukturene og den tredimensjonale konfigurasjonen av de konstante områdene i de ulike immunglobulinklassene velkjente. Som anvendt i dette dokumentet inkluderer begrepet "VH-domene" det aminoterminal variable domenet av en tung immunglobulinkjede og begrepet "CH1-domene" inkluderer det første (mest aminoterminal) konstante områdedomet av en tung immunglobulinkjede. CH1-domenet er tilstøtende VH-domenet og er amino-terminal med hengselområdet av et tungt immunglobulinkjedemolekyl.

[0060] Som anvendt i dette dokumentet inkluderer begrepet "CH2-domene" delen av et molekyl av en tung kjede som strekker seg, *f.eks.* fra omtrent rest 244 til rest 360 av et antistoff ved hjelp av konvensjonelle nummereringsskjemaer (restene 244 til 360, Kabat-nummereringssystemet; og restene 231-340, EU-nummereringssystemet; se Kabat EA *et al. op. cit.* CH2-domenet er unikt ved at det ikke er tett koblet sammen med et annet domene. Snarere er to N-bundne forgrenede karbohydratkjeder plassert mellom to CH2-domener av et intakt naturlig IgG-molekyl. Det er også godt dokumentert at CH3-domenet strekker seg fra CH2-domenet til C-enden av IgG-molekylet og omfatter omtrent 108 rester.

[0061] Som anvendt i dette dokumentet inkluderer begrepet "hengselområde" den delen av et molekyl av en tung kjede som skjøter CH1-domenet til CH2-domenet. Dette hengselområdet omfatter omtrent 25 rester, og er fleksibelt, og tillater således de to N-endeantigenbindingsområdene å bevege seg uavhengig av hverandre. Hengselområdene kan underdeles i tre forskjellige domener: øvre, midtre og nedre hengseldomener (Roux *et al.*, J. Immunol. 161:4083 (1998)).

[0062] Som anvendt i dette dokumentet inkluderer begrepet "disulfidbinding" den kovalente bindingen som dannes mellom to svovelatomer. Aminosyrecysteinet

omfatter en tiolgruppe som kan danne en disulfidbinding eller bro med en andre tiolgruppe. I de fleste naturlig forekommende IgG-molekylene bindes CH1- og CL-områdene med en disulfidbinding og de to tunge kjedene bindes av to disulfidbindinger i posisjonene som tilsvare 239 og 242 ved hjelp av Kabat-nummeringssystemet (posisjon 226 eller 229, EU-nummereringssystemet).

[0063] Som anvendt i dette dokumentet refererer begrepet "modifisert antistoff" til et antistoff der det variable domenet i enten den tunge eller lette kjeden eller begge endres ved minst delvis erstatning av én eller flere CDR-er fra et antistoff av kjent spesifisitet og, om nødvendig, ved delvis rammeområdeutskifting og sekvensendring. Selv om CDR-ene kan avledes fra et antistoff fra samme klasse eller til og med underklasse som antistoffet rammeområdene stammer fra, forutsettes det at CDR-ene avledes fra et antistoff av forskjellig klasse og fortrinnsvis fra et antistoff fra en annen art. Et modifisert antistoff der én eller flere "donor"-CDR-er fra et ikke-humant antistoff av kjent spesifisitet podes inn i et humant rammeområde av tung- eller lett kjede refereres i dette dokumentet til som et "humanisert antistoff". Det er kanskje ikke nødvendig å erstatte alle CDR-ene med de komplette CDR-ene fra det donorvariable området for å overføre antigenbindingskapasiteten av et variabelt område til et annet. Snarere kan det være nødvendig å kun overføre de restene som er nødvendig for å opprettholde aktiviteten til målbindingssetet. Gitt forklaringene fremsatt i *f.eks.* amerikansk patent nr. 5 585 089, 5 693 761, 5 693 762 og 6 180 370, vil det være godt innen kompetansen til fagfolk på området, enten ved å utføre rutinemessig eksperimentering eller ved prøve- og feiltesting for å oppnå et funksjonelt konstruert eller humanisert antistoff.

[0064] Som anvendt i dette dokumentet anvendes begrepene "bundet", "fusjonert" eller "fusjon" om hverandre. Disse begrepene refererer til sammenføyningen av to elementer eller komponenter med ethvert middel, inkludert kjemisk binding eller rekombinering. En "fusjon i-ramme" refererer til sammenføyning av to eller flere åpne polynukleotidleserammer (ORF-er) for å danne en kontinuerlig lengre ORF, på en måte som opprettholder den korrekte translasjonelle leserammen av de naturlige ORF-ene. Således er et rekombinant fusjonsprotein et enkelt protein som inneholder to eller flere segmenter som svarer til polypeptider som kodes for av de naturlige ORF-ene (segmentene er vanligvis ikke sammenføyd på denne måten i naturen.) Selv om leserammen således er gjort kontinuerlig gjennom de fusjonerte segmentene, kan segmentene atskilles fysisk eller romlig ved for eksempel i-rammebindeleddsekvens. For eksempel kan polynukleotider som koder for CDR-ene av et immunglobulinvariabelt område fusjoneres i rammen, men atskilles av et polynukleotid mellom seg som koder for minst ett immunglobulinrammeområde eller flere CDR-områder, så lenge de "fusjonerte" CDR-ene co-translateres som del av et kontinuerlig polypeptid.

[0065] Som anvendt i dette dokumentet refererer begrepene "behandle" eller "behandling" til både terapeutisk behandling og profylaktiske eller forebyggende tiltak, hvori formålet er å forhindre eller saktne ned (redusere) en uønsket fysiologisk endring eller lidelse, som for eksempel utvikling eller spredning av kreft. Fordelaktige eller
 5 ønskede kliniske resultater inkluderer, men er ikke begrenset til, lindring av symptomer, forringelse av sykdomsomsfang, stabilisering (*dvs.* ikke forverring) av sykdomstilstand, forsinkelse eller bremsing av sykdomsprogresjon, bedring eller lindring av sykdomstilstand og detekterbar eller ikke-detekterbar remisjon (enten delvis eller totalt). "Behandling" kan også bety å forlenge overlevelsen sammenlignet med
 10 forventet levetid hvis det ikke mottas behandling. De som trenger behandling inkluderer de som allerede har tilstanden eller lidelsen, så vel som de som er tilbøyelige til å få tilstanden eller lidelsen eller de der manifestasjonen av tilstanden eller lidelsen skal forhindres.

[0066] Med "individ" eller "person" eller "dyr" eller "pasient" eller "pattedyr"
 15 menes ethvert individ, særlig et pattedyr, *f.eks.* en menneskelig pasient som trenger diagnose, prognose, forebygging eller behandling.

[0067] Den foreliggende oppfinnelsen vedrører et bindingsmolekyl som karakterisert i kravene, som er i stand til å selektivt gjenkjenne en epitop av et sykdomsforbundet protein inkludert en neoepitop av et sykdomsforbundet protein, som
 20 fortrinnsvis kan oppnås eller valideres av metoden ifølge den foreliggende oppfinnelsen beskrevet i det ovenstående og illustrert i eksemplene. Fordelaktig gjenkjenner ikke bindingsmolekylet ifølge den foreliggende oppfinnelsen i vesentlig grad proteinet i sin ikke-lidelsesforbundne form; se også ovenfor.

[0068] Midler og metoder for rekombinant fremstilling av bindingsmolekyler, særlig antistoffer og etterligninger av disse så vel som metoder for å screene etter
 25 konkurrerende bindingsmolekyler, som kan eller ikke kan være antistoffer, er kjent innen faget og er oppsummert i *f.eks.* internasjonal søknad WO2006/103116 med hensyn til antistoffer mot beta-amyloid og behandling/diagnostisering av Alzheimers sykdom.

[0069] Imidlertid, som beskrevet i dette dokumentet, særlig med hensyn til terapeutiske anvendelser hos mennesket, er antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelsen et humant antistoff. I denne sammenheng er det patologiske variantproteinet gjenkjent av antistoffet forbundet med en nevrologisk lidelse, *dvs.* med en lidelse i hjernen.

[0070] Videre, som vist i eksemplene 3 til 5 har bindingsmolekylet ifølge den foreliggende oppfinnelsen, særlig et antistoff, flere fordelaktige biologiske egenskaper, én eller flere av disse har blitt oppnådd av den foreliggende oppfinnelsen for første
 35 gang, det er *f.eks.* i stand til å:

- (i) krysse blodhjernebarrieren, for eksempel på setet for den patologiske hendelsen;
- (ii) binde beta-amyloidplakk, cerebrovaskulært amyloid, diffuse Abeta-avsetninger, nevrofibrillære floker, hyperfosforylisert tau, alfa-synuklein-positive Lewy-legemer eller proteinaggregater forbundet med dystrofiske neuritter;
- (iii) fjerne beta-amyloidplakk i hjernen og/eller forhindre dannelsen av amyloid plakk i hjernen;
- (iv) gjenopprette i det vesentlige normal atferd; og/eller
- (v) forårsake ingen mikrobldninger.

[0071] I en særlig foretrukket utforming kan antistoffet eller tilsvarende bindingsmolekyl ifølge den foreliggende oppfinnelsen skilles fra andre antistoffer ved én eller flere av følgende egenskaper, *f.eks.* er de i stand til å:

1. passere, i det minste i små mengder, blod-hjernebarrieren på setet for de patologiske hendelsene;
2. binde til én eller flere patofysiologisk relevante ekstracellulære strukturer eller cellestrukturer;
3. føre til reduksjon av den patofysiologisk relevante strukturen *in vitro* eller *in vivo*;
4. føre til reduksjon av den patofysiologisk relevante strukturen og til reduksjon av en toksisitet forbundet med denne;
5. føre til blokkering eller forsinkelse av en sykdomsprosess;
6. føre til regenerering av cellulære og organspesifikke og organismiske funksjoner og eventuelt til en sekundær forebygging av tilbakefallet av den naturlige patofysiologien etter degradering av toksisiteten forbundet med den patofysiologisk relevante strukturen; og/eller
7. er ikke forbundet med økte mikrobldninger.

[0072] Videre fører fravær av kryssreaktivitet med fysiologiske forløpere eller derivater til dermed at for det første er konsentrasjonene forutsigbare siden man unngår utsivningseffekter (eng.: sink effects) i friske vevstrukturer og for det andre at

5 autoimmunrespons i form av uønskede bivirkninger i det vesentlige mangler. I tillegg antydte tidligere rapporter en sammenheng mellom cerebral amyloid angiopati (CAA) med nedsatt vaskulær reaktivitet i en transgen musemodell med CAA (Mueggler *et al.*, J Neurosci 22 (2002), 7218-24.). Den alvorlige CAA-forekomsten i gamle arcA β -mus (Knobloch *et al.*, Neurobiol. Aging 28:1297-1306 (2007) epub. 31 juli. 2006) kan

10 således begrense vasodilaterende fleksibilitet av berørte blodkar. I henhold til den foreliggende oppfinnelsen må man forvente at behandling med antistoffene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan forbedre vasoreaktiviteten og hjerneblodstrømmen hos aldrende APP-transgene mus. Dette kan valideres ved hjelp av ArcA β -musemodellen beskrevet i Knobloch *et al.* (2006), ovenfor, og offentliggjort i amerikansk søknad

15 "Transgenic animal model for Alzheimer's disease" av Grimm *et al.*, serienummer 60/934,291, innlevert 11. juni 2007.

II. Antistoffer

[0073] Den foreliggende oppfinnelsen rettes videre mot bindingsmolekylene, *f.eks.* antistoffer og bindingsfragmenter, varianter og derivater av disse vist i tabell 2 og 3. Den foreliggende oppfinnelsen rettes mer spesifikt mot et antistoff, eller et antigenbindingsfragment, en variant eller derivater av disse, der antistoffet spesifikt binder til samme neoepitop av et lidelsesforbundet protein som en referanseantistoff

25 valgt fra gruppen bestående av NI-101.11.

[0074] Oppfinnelsen trekkes videre mot et antistoff, eller antigenbindingsfragment, en variant eller derivater av disse, der antistoffet kompetitivt hemmer et referanseantistoff valgt fra gruppen som består av NI-101.11 fra binding til neoepitopen av et lidelsesforbundet protein.

[0075] Oppfinnelsen trekkes også til et antistoff, eller antigenbindingsfragment, en variant eller et derivat av disse, der antistoffet omfatter et antigenbindingsdomene identisk med NI-antistoffet 101.11.

[0076] Den foreliggende oppfinnelsen gir videre eksempler på flere slike bindingsmolekyler, *f.eks.* antistoffer og bindingsfragmenter av disse, som kan

35 karakteriseres ved at de i sitt variable område er omfattende *f.eks.* bindingsdomenet, det ene komplementaritetsbestemmende området (CDR) av VH- og VL-variabelt område omfattende aminosyresekvensene som er avbildet i tabell 2 (VH) og tabell 3 (VL).

Tabell 2: Aminosyresekvensene av VH-området av beta-amyloid-spesifikke antistoffer.

Antistoff	Variabel tungkjedesequens
NI-101.11	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDTGKK YYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNTLRAEDTAVYYCARDRGIGARRGPYYMDVWGKGT TVTSS (SEQ ID NR: 6)

Tabell 3: Aminosyresekvensene av VL-området av beta-amyloid-spesifikke antistoffer.

Antistoff	Variabel lettjedequens (kappa eller lambda)
NI-101.11	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSYSTPLTFGGGTKEIKR (SEQ ID NR: 8)

[0077] De tilsvarende nukleotidsekvensene som koder for de ovenfor identifiserte variable områdene er fremsatt i den vedlagte sekvenslisten. Sett av CDR-er fra de ovennevnte aminosyresekvensene av VH- og VL-området som avbildet i tabell 2 og 3 er gitt i tabell 4. Imidlertid, som omtalt i det følgende er fagmannen på området godt klar over det faktum at det i tillegg eller alternativt kan anvendes CDR-er som skiller seg i sin aminosyresekvens fra de som er fremsatt i tabell 4 med en, to, tre eller til og med flere aminosyrer i tilfelle med CDR2 og CDR3.

Tabell 4: Benevnelse av CDR-proteinsekvenser i Kabat-nomenklaturen for VH- og VL-områder av beta-amyloidspesifikke antistoffer.

Antistoff	Variabel tungjede	Variabel lettjede
NI-101.11		
CDR1	SYGMH (SEQ ID NR: 20)	RASQSISSYLN (SEQ ID NR: 23)
CDR2	VIWFDGTTKYYTDSVKG (SEQ ID NR: 21)	AASLQS (SEQ ID NR: 24)
CDR3	DRGIGARRGPYYMDV (SEQ ID NR: 22)	QSYSTPLT (SEQ ID NR: 25)

Antistoff	Variabel tungjede	Variabel lettjede
NI-101.11		
CDR1	SYGMH (SEQ ID NR: 20)	RASQSISSYLN (SEQ ID NR: 24)
CDR2	VIWFDGTTKYYTDSVKG (SEQ ID NR: 21)	AASLQS (SEQ ID NR: 25)
CDR3	DRGIGARRGPYYMDV (SEQ ID NR: 22)	QSYSTPLT (SEQ ID NR: 26)

[0078] I en utforming er antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelsen ethvert av antistoffene omfattende en aminosyresekvens av VH- og/eller VL-området som avbildet i tabell 2 og 3. Alternativt er antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelsen et antistoff eller antigenbindingsfragment av dette, som konkurrerer om

binding til neoeptitopen med minst ett av antistoffene med VH- og/eller VL-området som vist i tabell 2 og 3. De antistoffene kan så vel være murine, men imidlertid foretrekkes humaniserte, xenogene, eller kimæriske humant-murine antistoffer, særlig for terapeutiske anvendelser. Et antigenbindingsfragment av antistoffet kan for eksempel være et enkeltkjede-Fv-fragment (scFv), et F(ab')-fragment, et F(ab)-fragment og et F(ab')₂-fragment. For noen anvendelser kreves bare de variable områdene av antistoffene, noe som kan oppnås ved å behandle antistoffet med egnede reagenser for på den måten å generere Fab'-, Fab- eller F(ab'')₂-deler. Slike fragmenter er tilstrekkelig for anvendelse, for eksempel i immundiagnostikkprosedyrer som innebærer kobling av de immunspesifikke delene av immunglobuliner for å detektere reagenser som for eksempel radioisotoper.

[0079] Den foreliggende oppfinnelsen rettes videre mot isolerte polypeptider som utgjør antistoffene ifølge den foreliggende oppfinnelsen. Antistoffene ifølge den foreliggende oppfinnelsen omfatter polypeptider, *f.eks.* aminosyresekvenser som koder for spesifikke antigenbindingsområder som avledes fra immunglobulinmolekyler. En polypeptid- eller aminosyresekvens "som avledes fra" et angitt protein henviser til opprinnelsen til polypeptidet som har en viss aminosyresekvens. I noen tilfeller har polypeptidet eller aminosyresekvensen som avledes fra en bestemt utgangspolypeptid- eller utgangsaminosyresekvens en aminosyresekvens som stort sett er identisk med utgangssekvensen eller en del av denne som består av minst 10–20 aminosyrer, minst 20–30 aminosyrer, minst 30–50 aminosyrer eller som ellers kan identifiseres av en fagmann på området til å avledes fra utgangssekvensen.

[0080] Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer et isolert polypeptid omfattende, og som i det vesentlige består av, eller består av et tungt immunglobulinkjedevariabelt område (VH) der VH-CDR1-, VH-CDR2- og VH-CDR3-områdene har polypeptidsekvenser som er identiske med VH-CDR1-, VH-CDR2- og VH-CDR3-gruppene vist i tabell 4.

[0081] I en annen utforming tilveiebringer anvendelsen et isolert polypeptid omfattende, og som i det vesentlige består av, eller består av et tungt immunglobulinkjedevariabelt område (VH) der VH-CDR1-, VH-CDR2- og VH-CDR3-områdene har polypeptidsekvenser som er identiske med VH-CDR1-, VH-CDR2- og VH-CDR3-gruppene vist i tabell 4, med unntak av en, to, tre, fire, fem eller seks aminosyresubstitusjoner i ethvert VH-CDR. I visse utforminger er aminosyresubstitusjonene konservative.

[0082] Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer et isolert polypeptid omfattende, og som i det vesentlige består av, eller består av et lett immunglobulinkjedevariabelt område (VL) der VL-CDR1-, VL-CDR2- og VL-CDR3-områdene har polypeptidsekvenser som er identiske med VL-CDR1-, VL-CDR2- og VL-CDR3-gruppene vist i tabell 4.

[0083] I en annen utforming tilveiebringer anvendelsen et isolert polypeptid omfattende, og som i det vesentlige består av, eller består av et tungt
 5 immunglobulinkjedevariabelt område (VL) der VL-CDR1-, VL-CDR2- og VL-CDR3-områdene har polypeptidsekvenser som er identiske med VL-CDR1-, VL-CDR2- og VL-CDR3-gruppene vist i tabell 4, med unntak av ett, to, tre, fire, fem eller seks aminosyresubstitusjoner i ethvert VL-CDR. I visse utforminger er aminosyresubstitusjonene konservative.

[0084] Et immunglobulin eller dets kodende cDNA-er kan modifiseres ytterligere. Således, i en ytterligere utforming, omfatter metoden ifølge den foreliggende oppfinnelsen ethvert av trinnet eller trinnene for fremstilling av et kimært antistoff, humanisert antistoff, enkelt-kjedeantistoff, Fab-fragment, bispesifikt antistoff, fusjonert antistoff, merket antistoff eller en analog av enhver av disse. Tilsvarende
 15 metoder er kjent for fagmannen på området og beskrevet i *f.eks.* Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. Når derivater av antistoffene oppnås ved bakteriofagdisplaymetoden, kan overflate-plasmonresonans som benyttet i BIAcore-systemet anvendes til å øke effektiviteten av bakteriofagantistoffer som binder samme epitop som ethvert antistoff som beskrives i dette dokumentet (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). Produksjonen av kimære antistoffer er beskrevet i for eksempel internasjonal søknad WO89/09622. Metoder for produksjon av humaniserte antistoffer er beskrevet i *f.eks.* europeisk søknad EP-A1 0 239 400 og internasjonal søknad WO90/07861. En ytterligere antistoffkilde
 25 som skal anvendes i henhold til den foreliggende oppfinnelsen er såkalte xenogene antistoffer. Det generelle prinsippet for fremstilling av xenogene antistoffer så som humane antistoffer i mus er beskrevet i *f.eks.* internasjonale søknader WO91/10741, WO94/02602, WO96/34096 og WO 96/33735. Som omtalt ovenfor kan antistoffet ifølge oppfinnelsen eksistere i en rekke former foruten komplette antistoffer; inklusive, for eksempel Fv, Fab og F(ab)₂, samt i enkeltkjeder; se *f.eks.* internasjonal søknad WO88/09344.

[0085] Antistoffene ifølge den foreliggende oppfinnelsen eller deres tilsvarende immunglobulinkjede(r) kan modifiseres ytterligere ved hjelp av konvensjonelle metoder som er kjent i faget, for eksempel ved å anvende
 35 aminosyresletting(er), innsetting(er), substitusjon(er), tilsetning(er), og/eller rekombinasjon(er) og/eller enhver annen (andre) modifikasjon(er) kjent innen faget, enten alene eller i kombinasjon. Metoder for å innføre slike endringer i DNA-sekvensen som ligger til grunn for aminosyresekvensen til en immunglobulinkjeden er velkjent for fagmannen på området; se *f.eks.* Sambrook, Molecular Cloning A

Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. og Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). Modifikasjoner av antistoffet ifølge oppfinnelsen inkluderer kjemiske og/eller enzymatiske derivatiseringer ved én eller - flere konstituerende aminosyrer, inkludert sidekjedemodifikasjoner, ryggradsmodifikasjoner og N- og C-endemodifikasjoner inkludert acetylering, hydroksylering, metylering, amidering og tilslutningen av karbohydrat- eller lipiddeler, co-faktorer og lignende. Likeledes omfatter den foreliggende oppfinnelsen fremstilling av kimære proteiner som omfatter det beskrevne antistoffet eller noe fragment av disse i aminoenden fusjonert til et heterologt molekyl så som en immunstimulerende ligand i karboksylenden, se *f.eks.* internasjonal søknad WO00/30680 for tilsvarende tekniske detaljer.

[0086] I henhold til det ovenstående vedrører den foreliggende oppfinnelsen også et polynukleotid som koder for et bindingsmolekyl ifølge den foreliggende oppfinnelsen, i tilfellet for antistoffet, minst et variabelt område av en immunglobulinkjede i antistoffet som beskrives ovenfor. Vanligvis omfatter det variable området kodet for av polynukleotidet minst ett komplementaritetsbestemmende område (CDR) av VH og/eller VL av det variable området av antistoffet. Fagmannen på området vet at hvert variabelt domene (tung kjede VH og lett kjede VL) av et antistoff omfatter tre hypervariable områder, noen ganger kalt komplementaritetsbestemmende områder eller "CDR-er" flankert av fire relativt konserverte rammeområder eller "FR-er" og refererer til aminosyrerestene av et antistoff som er ansvarlig for antigenbinding. De hypervariable områdene eller CDR-ene av den humane IgG-undertypen av antistoff omfatter aminosyrerester fra restene 24-34 (L1), 50-56 (L2) og 89-97 (L3) i det lette kjedevariable domenet og 31-35 (H1), 50-65 (H2) og 95-102 (H3) i det tunge kjedevariable domenet som beskrevet av Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. utg. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md (1991) og/eller restene fra en hypervariable løkke, *f.eks.* restene 26-32 (L1), 50-52 (L2) og 91-96 (L3) i det lette kjedevariable domenet og 26-32 (H1), 53-55 (H2) og 96-101 (H3) i det tunge kjedevariable domenet som beskrevet av Chothia *et al.* J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917. Ramme- eller FR-rester er variable domenerester som skiller seg fra og omslutter de hypervariable områdene. Begrepet "spesifikk binding" refererer til antistoffbinding til et forhåndsbestemt antigen. Vanligvis binder antistoffet med en dissosiasjonskonstant (K_D) på 10 M eller mindre, og binder til det forhåndsbestemte antigenet med en K_D som er høyst halvparten så stor som K_D -verdien dens for binding til et ikke-spesifikt antigen (*f.eks.* BSA, kasein, eller ethvert annet spesifisert polypeptid) annet enn det forhåndsbestemte antigenet. Uttrykkene "et antistoff som gjenkjenner et antigen" og "et antistoff som er spesifikt for et antigen" anvendes om hverandre i dette dokumentet med begrepet "et antistoff som spesifikt binder til et antigen". Som anvendt i dette

dokumentet betyr "svært spesifikk binding" at den relative K_D -en av antistoffet for den spesifikke målepitopen, *f.eks.* neoepitopen er minst 10 ganger mindre enn K_D -en for binding av det antistoffet mot andre ligander eller til den naturlige motparten til det sykdomsforbundede proteinet.

5 **[0087]** Affiniteten eller aviditeten av et antistoff for et antigen kan bestemmes eksperimentelt ved hjelp av en egnet metode; se for eksempel Berzofsky *et al.*, "Antibody-Antigen Interactions" i Fundamental Immunology, Paul, W. E., utg., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company New York, N Y (1992), og metoder som er beskrevet i dette dokumentet. Generelle
10 metoder for å måle affiniteten av et antistoff for et antigen inkluderer ELISA, RIA og overflateplasmonresonans. Den målte affiniteten til en bestemt antistoff-antigeninteraksjon kan variere hvis den måles under ulike forhold, *f.eks.* saltkonsentrasjon, pH. Således er målinger av affiniteten og andre antigenbindingsparametere, *f.eks.* K_D , IC_{50} , fortrinnsvis foretatt med standardiserte
15 løsninger av antistoff og antigen og en standardisert buffer.

[0088] Fagmannen på området vil lett forstå at det variable domenet til antistoffet med det ovenfor beskrevne variable domenet kan anvendes for konstruksjon av andre polypeptider eller antistoffer av ønsket spesifisitet og biologisk funksjon. Således omfatter den foreliggende oppfinnelsen også polypeptider og antistoffer
20 omfattende minst ett CDR av det ovenfor beskrevne variable domenet og som med fordel har samme eller tilsvarende bindingsegenskaper som antistoffet som er beskrevet i de vedlagte eksemplene. Fagpersonen på området vil lett forstå at ved hjelp av de variable domenene eller CDR-ene beskrevet i dette dokumentet kan antistoffer konstrueres i henhold til metoder kjent innen faget, *f.eks.* som beskrevet i de europeiske
25 patentsøknadene EP 0 451 216 A1 og EP 0 549 581 A1. Videre vet fagmannen på området at bindingsaffiniteten kan forsterkes ved å foreta aminosyresubstitusjoner innenfor CDR-ene eller innenfor de hypervariable løkkene (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917) som delvis overlapper med CDR-ene som definert av Kabat. Således vedrører den foreliggende oppfinnelsen også antistoffer hvori ett eller
30 flere av CDR-ene omfatter én eller flere, fortrinnsvis ikke mer enn to aminosyresubstitusjoner. Fortrinnsvis omfatter antistoffet ifølge oppfinnelsen i én eller begge dens immunoglobulinkjeder to eller alle tre CDR-ene av de variable områdene som fremsatt i tabell 4.

[0089] Bindingsmolekyler, *f.eks.* antistoffer eller antigenbindingsfragmenter, varianter eller derivater av disse ifølge oppfinnelsen, som kjent av fagfolk på området, kan omfatte et konstant område som medierer én eller flere effektorfunksjoner. For eksempel kan binding av C1-komponenten av komplement til et antistoffkonstant område aktivere komplementsystemet. Aktivering av komplement er viktig i opsonisering og lysing av cellepatogener. Aktivering av komplement stimulerer også

inflammatorisk respons og kan også involveres i autoimmun overfølsomhet. Videre binder antistoffer til reseptorer på forskjellige celler via Fc-området, med et Fc-reseptorbindingssete på Fc-områdene til antistoffet som bindes til en Fc-reseptor (FcR) på en celle. Det finnes mange Fc-reseptorer som er spesifikke for forskjellige klasser av antistoffer, inkludert IgG (gamma-reseptorer), IgE (epsilon-reseptorer), IgA (alfa-reseptorer) og IgM (mu-reseptorer). Binding av antistoff til Fc-reseptorer på celleoverflater utløser mange viktige og mangfoldige biologiske responser, inkludert oppsluking og ødeleggelse av antistoff-belagte partikler, utskilling av immunkomplekser, lysing av antistoff-belagte målceller ved hjelp av drepeceller (kalt antistoffavhengig celle-mediert cytotoksitet, eller ADCC), frigjøring av inflammatoriske mediatorer, placentær overføring og kontroll av immunglobulinproduksjon.

[0090] Følgelig inkluderer visse utforminger av oppfinnelsen et antistoff, eller et antigenbindingsfragment, en variant, eller et derivat av disse, der minst en brøkdel av ett eller flere av de konstante områdedomenene er blitt slettet eller på annen måte endret for å tilveiebringe ønskede biokjemiske egenskaper som reduserte effektorfunksjoner, evnen til å dimerisere ikke-kovalent, økt evne til å lokalisere på setet til en svulst, redusert serumhalveringstid eller økt serumhalveringstid sammenlignet med et helt, uendret antistoff med omtrent samme immunogenisitet. For eksempel er visse antistoffer for anvendelse i diagnostikk- og behandlingsmetodene beskrevet i dette dokumentet domeneslektede antistoffer som omfatter en polypeptidkjede som tilsvarer en tung immunglobulinkjede, men som mangler minst én del av ett eller flere tunge kjededomenene. For eksempel, i visse antistoffer, vil ett helt domene av det konstante området av det modifiserte antistoffet slettes, for eksempel vil hele eller en del av CH2-domenet slettes. I andre utforminger har visse antistoffer for anvendelse i diagnostikk- og behandlingsmetodene beskrevet i dette dokumentet et konstant område, *f.eks.* et tungt IgG-kjedekonstant område, som endres for å eliminere glykosylering, omtalt andre steder i dette dokumentet som a-glykosylerte eller "agly" antistoffer. Slike "agly"-antistoffer kan fremstilles enzymatisk, så vel som ved å konstruere de(t) samsvarende glykosyleringssete(ne) i det konstante området. Uten å være bundet til en teori antas det at "agly"-antistoffer kan ha en forbedret sikkerhets- og stabilitetsprofil *in vivo*. Metoder for å fremstille a-glykosylerte antistoffer som har ønsket effektorfunksjon finnes for eksempel i WO 2005/018572.

[0091] I visse antistoffer eller antigenbindingsfragmenter, varianter eller derivater av disse beskrevet i dette dokumentet kan Fc-delen muteres for å redusere effektorfunksjon ved hjelp av metoder kjent innen faget. For eksempel kan sletting eller inaktivering av et konstant områdedomene (gjennom punktmutasjoner eller på annen måte) redusere Fc-reseptorbindingen av det sirkulerende modifiserte antistoffet og dermed øke tumorlokaliseringen. I andre tilfeller kan det være slik at modifisering

av konstante områder i samsvar med den foreliggende oppfinnelsen modererer komplementbindingen og reduserer således serumhalveringstiden og den ikke-spesifikke forbindelsen med et konjugert cytotoxin. Enda kan andre modifikasjoner av det konstante området anvendes for å modifisere disulfidbindinger eller

oligosakkariddeler som gir mulighet for forbedret lokalisering som følge av økt antigenspesifisitet eller antistoffleksibilitet. Den resulterende fysiologiske profilen, biotilgjengeligheten og andre biokjemiske effekter av modifikasjonene, så som tumorlokalisering, biofordeling og serumhalveringstid kan lett måles og kvantifiseres ved hjelp av velkjente immunologiske metoder uten uforholdsmessig eksperimentering.

[0092] Modifiserte former av antistoffene eller antigenbindingsfragmenter, varianter eller derivater av disse ifølge oppfinnelsen kan lages av hele forløper- eller morantistoffer ved hjelp av metoder kjent innen faget. Eksempler på metoder er omtalt i mer detalj i dette dokumentet.

[0093] I visse utforminger er både de variable og konstante områdene av antistoffene, eller antigenbindingsfragmentene, varianter eller derivater av disse ifølge oppfinnelsen fullstendig humane. Fullstendig humane antistoffer kan lages ved hjelp av metoder som er kjent innen faget og som beskrevet i dette dokumentet. For eksempel kan fullt ut humane antistoffer mot et spesifikt antigen fremstilles ved administrering av antigenet til et transgent dyr som er blitt modifisert for å fremstille slike antistoffer som svar på antigenutfordring, men hvis endogene loci er blitt deaktivert. Eksempler på metoder som kan anvendes for å lage slike antistoffer er beskrevet i amerikanske patenter: 6 150 584; 6 458 592; 6 420 140. Andre metoder er kjent innen faget. Helt humane antistoffer kan likeledes fremstilles av ulike displayteknologier, *f.eks.* bakteriofagdisplayssystemer eller andre virale displayssystemer, som beskrevet i mer detalj i dette dokumentet.

[0094] Antistoffer eller antigenbindingsfragmenter, varianter eller derivater av disse ifølge oppfinnelsen kan lages eller fremstilles ved hjelp av metoder som er kjent innen faget. I visse utforminger er antistoffmolekyler eller fragmenter av disse "rekombinant fremstilt", *dvs.* fremstilt ved hjelp av rekombinant DNA-teknologi. Eksempler på metoder for fremstilling av antistoffmolekyler eller fragmenter av disse er omtalt i mer detalj andre steder i dette dokumentet.

[0095] Antistoffer eller antigenbindingsfragmenter, varianter eller derivater av disse ifølge oppfinnelsen inkluderer også derivater som modifiseres, *f.eks.* ved å binde enhver molekyltype kovalent til antistoffet slik at den kovalente bindingen ikke hindrer antistoffet fra å bindes spesifikt til kognatepitopen sin. For eksempel, men ikke som en begrensning, inkluderer antistoffderivatene antistoffer som har blitt modifisert, *f.eks.* ved glykosylering, acetylering, pegylering, fosforylering, amidering, derivatisering av kjente beskyttelsesgrupper/blokkerende grupper, proteolytisk spaltning, bindeledd til en cellulær ligand eller annet protein osv. Hvilke som helst av flere kjemiske

modifikasjoner kan utføres ved kjente metoder, inkludert, men ikke begrenset til, spesifikk kjemisk spaltning, acetylering, formylering, metabolsk syntese av tunicamycin osv. I tillegg kan derivatet inneholde én eller flere ikke-klassiske aminosyrer.

[0096] I visse utforminger vil antistoffer, eller antigenbindingsfragmenter, varianter eller derivater av disse ifølge oppfinnelsen ikke fremkalle en skadelig immunrespons i dyret som skal behandles, *f.eks.* i et menneske. I visse utforminger avledes bindingsmolekyler, *f.eks.* antistoffer eller antigenbindingsfragmenter av disse ifølge oppfinnelsen fra en pasient, *f.eks.* en menneskelig pasient, og anvendes så i samme art som de avledes fra, *f.eks.* mennesket, der de lindrer eller reduserer forekomsten av skadelige immunrespons.

[0097] De-immunisering kan også anvendes for å redusere immunogenisiteten til et antistoff. Som anvendt i dette dokumentet inkluderer begrepet "de-immunisering" endring av et antistoff for å endre T-celle-epitoper (se *f.eks.* WO9852976A1, WO0034317A2). For eksempel analyseres VH- og VL-sekvenser fra utgangsantistoffet og et humant T-celle-epitop-"kart" fra hvert V-område viser lokasjonen av epitoper i forhold til komplementaritetsbestemmende områder (CDR-er) og andre nøkkelrester i sekvensen. Individuelle T-celle-epitoper fra T-celle-epitopkartet analyseres for å identifisere alternative aminosyresubstitusjoner med en lav risiko for å endre aktiviteten av det endelige antistoffet. En rekke alternative VH- og VL-sekvenser konstrueres omfattende kombinasjoner av aminosyresubstitusjoner og disse sekvensene inkorporeres deretter i en rekke bindingspolypeptider, *f.eks.* neo-epitop-spesifikke antistoffer eller immunspesifikke fragmenter av disse for anvendelse i diagnostikk- og behandlingsmetodene offentliggjort i dette dokumentet, som deretter testes for funksjon. Vanligvis genereres og testes mellom 12 og 24 variantantistoffer. Komplette tunge og lette kjedegener omfattende modifiserte V- og humane C-områder klones deretter inn i ekspresjonsvektorer og de påfølgende plasmidene innføres i cellerlinjer for produksjon av hele antistoffet. Antistoffene sammenlignes så i hensiktsmessige biokjemiske og biologiske analyser og den optimale varianten identifiseres.

[0098] Monoklonale antistoffer kan fremstilles ved hjelp av en rekke metoder kjent innen faget inkludert anvendelsen av hybridom-, rekombinant- og bakteriofagdisplayteknologier, eller en kombinasjon av disse. For eksempel kan monoklonale antistoffer fremstilles ved hjelp av hybridom-metoder inkludert de kjent innen faget og lært i for eksempel Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2. utg. (1988); Hammerling *et al.*, i: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas Elsevier, N.Y., 563-681 (1981). Begrepet "monoklonalt antistoff" som anvendt i dette dokumentet begrenses ikke til antistoffer fremstilt ved hybridomteknologi. Begrepet "monoklonalt antistoff" refererer til et antistoff avledet fra en enkeltklon, inkludert enhver eukaryot-, prokaryot- eller

bakteriofagklon og ikke metoden den fremstilles av. Således begrenses ikke begrepet "monoklonalt antistoff" til antistoffer fremstilt gjennom hybridomteknologi.

Monoklonale antistoffer kan fremstilles ved hjelp av en rekke metoder kjent innen faget. I visse utforminger avledes antistoffene ifølge den foreliggende oppfinnelsen fra humane B-celler som er blitt udødeliggjort via transformasjon med Epstein-Barr-virus, som beskrevet i dette dokumentet.

[0099] I den velkjente hybridomprosessen (Kohler *et al.*, *Nature* 256:495 (1975)) fusjoneres de relativt kortvarige eller dødelige lymfocytene fra et pattedyr, *f.eks.* B-celler fra et menneske som beskrevet i dette dokumentet, med en udødelig tumorcellelinje (*f.eks.* en myelomcellelinje), og fremstiller således hybridceller eller "hybridomer" som er både udødelige og i stand til å fremstille det genetisk kodede antistoffet av B-cellen. De resulterende hybridene segregeres inn i enkle genetiske stammer ved utvelgelse, fortynning og gjenvekst med hver individuelle stamme omfattende spesifikke gener for dannelsen av et enkelt antistoff. De fremstiller antistoffer, som er homogene mot et ønsket antigen og kalles "monoklonale" på grunn av det rent genetiske opphavet deres.

[00100] Således fremstilte hybridomceller sås og dyrkes i et egnet kulturmedium som fortrinnsvis inneholder én eller flere stoffer som hemmer veksten eller overlevelsen av de ufusjonerte mormyelomcellene. Fagfolk på området vil forstå at reagenser, cellelinjer og medier for dannelse, utvelgelse og vekst av hybridomer er kommersielt tilgjengelige fra en rekke kilder og standardiserte protokoller er godt etablert. Generelt analyseres dyrkingsmedium der hybridomcellene vokser for fremstilling av monoklonale antistoffer mot det ønskede antigenet.

Bindingsspesifisiteten av de monoklonale antistoffene fremstilt av hybridomcellene bestemmes av *in vitro*-analyser så som immunutfelling, radioimmunanalyse (RIA) eller enzym-bundet immunabsorbentanalyse (ELISA), eller neoepitopbindingsanalyser som beskrevet i dette dokumentet. Etter hybridomcellene er identifisert som fremstiller antistoffer med den ønskede spesifisiteten, affiniteten og/eller aktiviteten kan klonene delklones ved å begrense fortynningsprosedyrer og dyrkes ved hjelp av standardmetoder (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, s. 59-103 (1986)). Det vil videre forstås at de monoklonale antistoffene utskilt av subklonene kan atskilles fra dyrkingsmedium, ascitesvæske eller serum ved konvensjonelle rensingsprosedyrer så som for eksempel protein-A, hydroksylapatitkromatografi, gelelektroforese, dialyse eller affinitetskromatografi.

[00101] Antistoff-fragmenter som gjenkjenner spesifikke epitoper kan genereres ved kjente metoder. For eksempel kan Fab- og F(ab')₂-fragmenter fremstilles rekombinant eller ved proteolytisk spaltning av immunglobulinmolekyler, ved hjelp av enzymer så som papain (for å fremstille Fab-fragmenter) eller pepsin (for å fremstille

F(ab')₂-fragmenter). F(ab')₂-fragmenter inneholder det variable området, det lette kjedekonstante området og CH1-domenet av den tunge kjeden.

[00102] Fullstendig humane antistoffer, så som beskrevet i dette dokumentet er spesielt ønskelig for terapeutisk behandling av humane pasienter. Humane antistoffer kan fremstilles ved et mangfold metoder kjent innen faget inkludert bakteriofagdisplaymetodene beskrevet ovenfor ved hjelp av antistoffbibliotek som avledes fra humane immunglobulinsekvenser. Se også amerikanske patent nr. 4 444 887 og 4 716 111; og PCT-publikasjonene WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, 96 WO/34096, WO 96/33735 og WO 91/10741.

Humane antistoffer ifølge den foreliggende oppfinnelsen isoleres *f.eks.* fra pasienter som er symptomfrie, men påvirket av risiko for å utvikle en lidelse, *f.eks.* Alzheimers sykdom, eller en pasient med lidelsen, men med et uvanlig stabilt sykdomsforløp.

[00103] I en annen utforming kan DNA som koder for ønskede monoklonale antistoffer lett isoleres og sekvenseres ved hjelp av konvensjonelle metoder (*f.eks.* ved å anvende oligonukleotidprober som er i stand til å binde spesifikt til gener som koder for de tunge og lette kjedene av murine antistoffer). De isolerte og subklonede hybridomcellene tjener som en foretrukket kilde for slikt DNA. Når DNA-et er isolert kan det plasseres i ekspresjonsvektorer, som så transfekteres i prokaryote eller eukaryote vertsceller så som, men ikke begrenset til, *E. coli*-celler, COS-apeceller, eggstokkceller fra kinesisk dverghamster (CHO) eller myelomceller som ikke ellers fremstiller immunglobuliner. Mer spesielt kan det isolerte DNA-et (som kan være syntetisk som beskrevet i dette dokumentet) anvendes til å klonе konstante og variable områdesekvenser for fremstillingsantistoffene som beskrevet i Newman *et al.*, amerikansk patent nr. 5 658 570, innlevert den 25. januar 1995. Dette innebærer hovedsakelig ekstraksjon av RNA fra de valgte cellene, konvertering til cDNA og forsterkning av PCR ved hjelp av Ig-spesifikke primere. Det er også beskrevet egnede primere for dette formålet i amerikansk patent nr. 5 658 570. Som det vil omtales i mer detalj nedenfor kan omdannede celler som uttrykker det ønskede antistoffet dyrkes opp i relativt store mengder for å tilveiebringe kliniske og kommersielle forsyninger av immunglobulinet.

[00104] I en spesifikk utforming kan aminosyresekvensen av tunge og/eller lette kjedevARIABLE domener inspiseres for å identifisere sekvensene til det komplementaritetsbestemmende området (CDR) ved hjelp av metoder som er godt kjent innen faget, *f.eks.* ved å sammenligne med kjente aminosyresekvenser av andre tunge og lette kjedevARIABLE områder for å bestemme områdene av sekvenshypervariabilitet. Ved hjelp av rutinemessige rekombinante DNA-metoder kan én eller flere av CDR-ene settes inn i rammeområder, *f.eks.* inn i humane rammeområder. Rammeområdene kan være naturlig forekommende områder eller konsensusrammeområder og fortrinnsvis humane rammeområder (se *f.eks.* Chothia

et al., J. Mol. Biol. 278:457-479 (1998) for en oppføring av humane rammeområder). I visse utforminger koder polynukleotidet generert av kombinasjonen av rammeområdene og CDR-ene for et antistoff som spesifikt binder til minst én epitop av et ønsket polypeptid. I visse utforminger kan én eller flere aminosyresubstitusjoner lages inne i rammeområdene for å *f.eks.* bedre binding av antistoffet til antigenet sitt. I tillegg kan slike metoder anvendes for å lage aminosyresubstitusjoner eller delesjoner av ett eller flere variable område-cysteinrester som deltar i en disulfidbinding innen kjeden for å generere antistoffmolekyler som mangler én eller flere disulfidbindinger innen kjeden. Andre endringer av polynukleotidet er omfattet av den foreliggende oppfinnelsen og fagfolk på området.

[00105] Alternativt kan metoder beskrevet for fremstilling av enkeltkjedeantistoffer (amerikansk patent nr. 4 694 778; Bird, Science 242:423-442 (1988); Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); og Ward *et al.*, Nature 334:544-554 (1989)) tilpasses for å fremstille enkeltkjedeantistoffer.

Enkeltkjedeantistoffer dannes ved å binde tunge og lette fragmenter av Fv-området sammen ved hjelp av en aminosyrebrot, som gir et enkeltkjedeantistoff. Metoder for montering av funksjonelle Fv-fragmenter i *E. coli* kan også anvendes (Skerra *et al.*, Science 242:1038-1041 (1988)).

[00106] I en annen utforming kan lymfocytter velges ved mikromanipulasjon og de variable genene isoleres. For eksempel kan perifere blodmononukleære celler isoleres fra et immunisert eller naturlig immunpattedyr, *f.eks.* et menneske, og dyrkes i ca. 7 dager *in vitro*. Kulturene kan screenes for spesifikke IgG-er som oppfyller screeningskriteriene. Celler fra positive brønner kan isoleres. Individuelle Ig-fremstillende B-celler kan isoleres ved FACS eller ved å identifisere dem i en komplement-mediert hemolytisk plakkanalyse. Ig-fremstillende B-celler kan mikromanipuleres inn i et rør og VH- og VL-genene kan forsterkes ved hjelp av *f.eks.* RT-PCR. VH- og VL-genene kan klones inn i en antistoffekspresjonsvektor og transfekteres inn i celler (*f.eks.* eukaryote eller prokaryote celler) for ekspresjon.

[00107] Alternativt kan antistoff-fremstillende cellelinjer velges og dyrkes ved hjelp av metoder velkjent for fagmannen på området. Slike metoder er beskrevet i en rekke laboratoriemanualer og primære publikasjoner. I dette henseende er metodene egnet for anvendelse i oppfinnelsen, som beskrevet nedenfor, beskrevet i Current Protocols in Immunology, Coligan *et al.*, utg., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991).

[00108] Antistoffene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan fremstilles ved enhver metode kjent innen faget for syntesen av antistoffer, særlig ved kjemisk syntese eller fortrinnsvis ved rekombinante ekspresjonsmetoder som beskrevet i dette dokumentet.

[00109] I en utforming omfatter et antistoff, eller antigenbindingsfragment, variant eller derivat av disse ifølge oppfinnelsen et syntetisk konstant område hvori ett eller flere domener helt eller delvis slettes ("domene-slettede antistoffer"). I visse utforminger vil kompatible modifiserte antistoffer omfatte domeneslettede konstrukter eller varianter hvori hele CH2-domenet har blitt fjernet (Δ CH2-konstrukter). For andre utforminger kan et kort tilkoblingspeptid substitueres for det slettede domenet for å tilveiebringe fleksibilitet og bevegelsesfrihet for det variable området. Fagfolk på området vil forstå at slike konstrukter er særlig foretrukket som følge av de regulerende egenskapene til CH2-domenet på den katabolske hastigheten av antistoffet.

Domeneslettede konstrukter kan avledes ved hjelp av en vektor som koder for et IgG₁-humant konstant domene (se *f.eks.* WO 02/060955A2 og WO02/096948A2). Denne vektoren er konstruert for å slette CH2-domenet og tilveiebringe en syntetisk vektor som uttrykker et domeneslettet IgG₁-konstant område.

[00110] I visse utforminger er antistoffer, eller antigenbindingsfragmenter, varianter eller derivater av disse ifølge den foreliggende oppfinnelsen minilegemer. Minilegemer kan lages ved hjelp av metodene som er beskrevet i faget (se *f.eks.* amerikansk patent 5 837 821 eller WO 94/09817A1).

[00111] I en utforming omfatter et antistoff, eller antigenbindingsfragment, variant eller derivat av disse ifølge oppfinnelsen en tung immunglobulinkjedesletting eller substitusjon av noen få eller til og med en enkelt aminosyre så lenge den tillater forbindelse mellom de monomeriske delenheterne. For eksempel kan mutasjonen av en enkelt aminosyre i utvalgte områder av CH2-domenet være nok til å vesentlig redusere Fc-binding og derved øke tumorlokalisering. Tilsvarende kan det være ønskelig å bare fjerne den delen av ett eller flere konstante område-domener som styrer effektorfunksjonen (*f.eks.* komplementbinding) til å moduleres. Slike delvise slettinger av de konstante områdene kan forbedre utvalgte egenskaper til antistoffet (serumhalveringstid) og samtidig la andre ønskelige funksjoner forbundet med det individkonstante området forbli intakte. Videre, som antydnet ovenfor, kan de konstante områdene av de offentliggjorte antistoffene være syntetiske gjennom mutasjon eller substitusjon av én eller flere aminosyrer som forbedrer profilen av det resulterende konstruktet. I denne forbindelse kan det være mulig å forstyrre aktiviteten tilveiebrakt av et konservert bindingssete (*f.eks.* Fc-binding), mens man i det vesentlige opprettholder konfigurasjonen og den immungene profilen av det modifiserte antistoffet. Enda ytterligere utforminger omfatter tilsetning av én eller flere aminosyrer til det konstante området for å øke ønskelige egenskaper så som effektorfunksjon eller sørge for mer cytotoxin- eller karbohydratvedlegg. I slike utforminger kan det være ønskelig å sette inn eller replikere spesifikke sekvenser avledet fra utvalgte konstante områdedomener.

[00112] Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer også antistoffer som omfatter, består i det vesentlige av, eller består av varianter (inkludert derivater) av antistoffmolekyler (*f.eks.* VH-områder og/eller VL-områder) beskrevet i dette dokumentet, der antistoffer eller fragmenter av disse binder immunspesifikt til et lidelsesforbundet polypeptid eller fragment eller variant av disse. Standardmetoder kjent for fagfolk på området kan anvendes for å innføre mutasjoner i nukleotidsekvensen som koder for et antistoff, inkludert, men ikke begrenset til, seterettet mutagenese og PCR-mediert mutagenese som resulterer i aminosyresubstitusjoner. Fortrinnsvis koder variantene (inkludert derivater) for mindre enn 50 aminosyresubstitusjoner, mindre enn 40 aminosyresubstitusjoner, mindre enn 30 aminosyresubstitusjoner, mindre enn 25 aminosyresubstitusjoner, mindre enn 20 aminosyresubstitusjoner, mindre enn 15 aminosyresubstitusjoner, mindre enn 10 aminosyresubstitusjoner, mindre enn 5 aminosyresubstitusjoner, mindre enn 4 aminosyresubstitusjoner, mindre enn 3 aminosyresubstitusjoner eller mindre enn 2 aminosyresubstitusjoner i forhold til VH-referanseområdene, VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-område, VL-CDR1, VL-CDR2 eller VL-CDR3. En "konservativ aminosyresubstitusjon" er en der aminosyreresten erstattes med en aminosyrerest som har en sidekjede med en tilsvarende ladning. Familier av aminosyrerester som har sidekjedene med tilsvarende ladninger er blitt definert innen faget. Disse familiene inkluderer aminosyrer med grunnleggende sidekjedene (*f.eks.* lysin, arginin, histidin), sure sidekjedene (*f.eks.* asparaginsyre, glutaminsyre), uladete polare sidekjedene (*f.eks.* glycin, asparagin, glutamin, serin, treonin, tyrosin, cystein), ikke-polare sidekjedene (*f.eks.* alanin, valin, leucin, isoleucin, prolin, fenylalanin, metionin, tryptofan), beta-forgrenede sidekjedene (*f.eks.* treonin, valin, isoleucin) og aromatiske sidekjedene (*f.eks.* tyrosin, fenylalanin, tryptofan, histidin). Alternativt kan mutasjoner innføres tilfeldig langs hele eller deler av den kodende sekvensen, så som ved metningsmutagenese, og de resulterende mutantene kan screenes for biologisk aktivitet for å identifisere mutanter som beholder aktivitet (*f.eks.* evnen til å binde et lidelsesforbundet polypeptid).

[00113] Det er for eksempel mulig å introdusere mutasjoner bare i rammeområder eller bare i CDR-områder av et antistoffmolekyl. Introduserte mutasjoner kan være tause eller nøytrale missense-mutasjoner, *f.eks.* ha ingen eller liten effekt på evnen til et antistoff for å binde antigen, faktisk endrer noen slike mutasjoner ikke aminosyresekvensen i det hele tatt. Disse mutasjonstypene kan være nyttige for å optimalisere kodonanvendelse, eller forbedre en antistoffproduksjonen til et hybridom. Kodon-optimaliserte kodende områder som koder for antistoffene ifølge den foreliggende oppfinnelsen offentliggjøres andre steder i dette dokumentet. Alternativt kan ikke-nøytrale missense-mutasjoner endre antistoffets evne til å binde antigen. Plasseringen av de mest stillegående og nøytrale missense-mutasjonene er sannsynlig å

være i rammeområdene, mens plasseringen av de fleste ikke-nøytrale missense-mutasjonene er sannsynlig å være i CDR, men dette er ikke et absolutt krav.

Fagpersoner på området vil være i stand til å utforme og teste mutante molekyler med ønskede egenskaper, så som ingen endring i antigenbindingsaktivitet eller endring i bindingsaktivitet (*f.eks.* forbedringer i antigenbindingsaktivitet eller endring i antistoffspesifisitet). Etter mutagenese kan proteinet det kodes for uttrykkes rutinemessig og den funksjonelle og/eller biologiske aktiviteten til proteinet det kodes for (*f.eks.* evnen til å binde immunspesifikk minst én epitop av et lidelsesforbundet polypeptid) kan bestemmes ved hjelp av metoder beskrevet i dette dokumentet eller ved rutinemessig modifisering av metoder kjent innen faget.

IV. Polynukleotider som koder for antistoffer

[00114] I henhold til det ovenstående vedrører den foreliggende oppfinnelsen også et polynukleotid som koder for et bindingsmolekyl ifølge den foreliggende oppfinnelsen, *f.eks.* et antistoff. I tilfelle antistoffet kan polynukleotid kode for minst et variabelt område av en immunglobulinkjede av antistoffet beskrevet ovenfor.

Polynukleotidet ifølge oppfinnelsen som koder for det ovenfor beskrevne antistoffet kan være *f.eks.* DNA, cDNA, RNA eller syntetisk fremstilt DNA eller RNA eller et rekombinant fremstilt kimært nukleinsyremolekyl omfattende hvilket som helst av disse polynukleotidene, enten alene eller i kombinasjon. Polynukleotidet er fortrinnsvis en del av en vektor. Slike vektorer kan omfatte ytterligere gener så som markørgener som gjør det mulig å velge vektoren i en egnet vertscelle og under egnede betingelser. Fortrinnsvis bindes polynukleotidet ifølge oppfinnelsen operativt til

ekspresjonskontrollsekvenser som tillater ekspresjon i prokaryote eller eukaryote celler. Ekspresjon av polynukleotidet omfatter transkripsjon av polynukleotidet i et translaterbart mRNA. Regulatoriske elementer som sikrer ekspresjon i eukaryote celler, fortrinnsvis pattedyrceller, er velkjent for fagfolk på området. De omfatter vanligvis regulatoriske sekvenser som sikrer oppstart av transkripsjon og eventuelt poly-A-signaler som sikrer opphør av transkripsjonen og stabilisering av transkriptet. Andre regulatoriske elementer kan inkludere transkripsjonelle forsterkere så vel som translasjonsforsterkere, og/eller naturlig forbundne eller heterologe promotorområder.

[00115] Et polynukleotid som koder for et antistoff, eller antigenbindingsfragment, en variant, eller et derivat av disse kan settes sammen av ethvert polyribonukleotid eller polydeoksribonukleotid, som kan være umodifisert RNA eller DNA eller modifisert RNA eller DNA. For eksempel kan det settes sammen et polynukleotid som koder for et antistoff- eller antigenbindingsfragment, en variant eller et derivat av disse av enkelt- og dobbel-trådet DNA, DNA som er en blanding av enkelt- og dobbel-trådede områder, enkelt- og dobbel-trådet RNA, og RNA som er

blanding av enkelt- og dobbel-trådede områder, hybride molekyler omfattende DNA og RNA som kan være enkelt-trådet eller, mer typisk, dobbel-trådet eller en blanding av enkelt- og dobbel-trådede områder. I tillegg kan et polynukleotid som koder for et antistoff, eller antigenbindingsfragment, en variant, eller et derivat av disse settes sammen av trippel-trådede områder omfattende RNA eller DNA eller både RNA og DNA. Et polynukleotid som koder for et antistoff, eller antigenbindingsfragment, en variant eller et derivat av disse kan også inneholde én eller flere modifiserte baser eller DNA- eller RNA-ryggrader modifisert for stabilitet eller andre grunner. "Endrede" baser inkluderer for eksempel tritylerte baser og uvanlige baser så som inosin. En rekke modifikasjoner kan gjøres av DNA og RNA; således omfavner "polynukleotid" kjemiske, enzymatiske eller metabolsk modifiserte former.

[00116] Et isolert polynukleotid som koder for en ikke-naturlig variant av et polypeptid avledet fra et immunglobulin (*f.eks.* en tung immunglobulinkjededel eller -lett kjededel) kan lages ved å innføre én eller flere nukleotidsubstitusjoner, tillegg eller delesjoner i nukleotidsekvensen av immunglobulinet slik at én eller flere aminosyresubstitusjoner, tillegg eller delesjoner innføres i proteinet det kodes for. Mutasjoner kan innføres ved standardmetoder, så som seterettet mutagenese og PCR-mediert mutagenese. Fortrinnsvis fortas konservative aminosyresubstitusjoner i én eller flere ikke-essensielle aminosyrerester.

[00117] Som velkjent kan RNA isoleres fra de naturlige hybridomcellene eller fra andre transformerte celler ved standardmetoder, så som guanidiniumisotiocyanatekstraksjon og utfelling etterfulgt av sentrifugering eller kromatografi. Der ønskelig kan mRNA isoleres fra total-RNA ved standardmetoder så som kromatografi på oligo-dT-cellulose. Egnede metoder er kjent innen faget.

[00118] I en utforming kan cDNA-ene som koder for de lette og tunge kjedene i antistoffet lages, enten samtidig eller hver for seg, ved hjelp av revers transkriptase og DNA-polymerase i henhold til velkjente metoder. PCR kan initieres ved konsensuskonstante områdeprimere eller ved mer spesifikke primere basert på de publiserte tunge- og lette DNA-kjede- og aminosyresekvensene. Som omtalt ovenfor kan PCR også anvendes til å isolere DNA-kloner som koder for den lette og den tunge kjeden til antistoffet. I dette tilfellet kan bibliotekene screenes ved konsensusprimere eller større homologe sonder, som for eksempel musekonstante områdesonder.

[00119] DNA, typisk plasmid-DNA, kan isoleres fra cellene ved hjelp av metoder kjent innen faget, restriksjonskartlagt og sekvensert i henhold til standard velkjente metoder fremsatt i detalj, *f.eks.* i de foregående referansene forbundet til rekombinante DNA-metoder. Selvfølgelig kan DNA-et være syntetisk i henhold til den foreliggende oppfinnelsen på ethvert punkt i løpet av isolasjonsprosessen eller den påfølgende analysen.

[00120] Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer et isolert polynukleotid omfattende, og som i det vesentlige består av, eller består av en nukleinsyre som koder for et lett immunglobulinkjedevariabelt område (VL), som har VL-CDR1-, VL-CDR2- eller VL-CDR3-polypeptidsekvenser vist i tabell 4.

[00121] Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer et isolert polynukleotid omfattende, som i det vesentlige består av, eller består av en nukleinsyre som koder for et tungt immunglobulinkjedevariabelt område (VH) der VH-CDR1-, VH-CDR2- og VH-CDR3-områdene har polypeptidsekvenser som er identiske med VH-CDR1-, VH-CDR2- og VH-CDR3-gruppene vist i tabell 4.

Tabell 5: Polynukleotidsekvenser av VH-området av Abeta-spesifikke antistoffer.

Antistoff	Variabel tungkjedesequens
NI-101.11 (SEQ ID NR: 56)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCGTCTGGATTGCGCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA AGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATGTTTATGGAATAAAAAATACTATACAGACTCCGTG AAGGGCAGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACACTGTATCTGCAAAATGAACACCCT GAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGGTATAGGAGCTCGGCGGGG GCCGTACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
NI-101.11 (SEQ ID NR: 5) (kodon- optimalisert)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGGGCGGTGGTGCAGCCCCGGCCGAGCCTGCGGCTGAG CTGCGCCGCCAGCGGCTTCGCCTTCAGCAGCTACGGCATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCCCGG CAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCGTGATCTGTTTCGACGGCACCAAGAAGTACTACACCGACAGC GTGAAGGGCCGGTTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACA CCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCGGGACCGGGGCATCGGCGCCCCGG CGGGGCCCTACTACATGGACGTGTGGGGCAAGGGCACCAACCGTGACCGTGAGCAGC

Tabell 6: Polynukleotidsekvenser av VL-området av Abeta-spesifikke antistoffer.

Antistoff	Variabel lett kjedesequens (kappa eller lambda)
NI-101.11 (SEQ ID NR: 7)	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT TGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAACAGAAACCAGGGAAAGCCCC TAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGTTTCAGTGGCAGTG GATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTGCAACTTATTACT GTCAGCAGAGTTACAGTACCCCTCTCACTTTGCGCGGAGGGACCAAGCTCGAGATCAAACGTAC G

[00122] I denne henseende vil fagpersonen på området lett forstå at polynukleotidene som koder for minst det variable domenet til den lette og/eller tunge kjeden kan kode for de variable domenene av begge immunglobulinkjedene eller bare ett. Likeledes kan polynukleotidene være under kontroll av samme promotor, eller kan styres separat for ekspresjon. Mulige regulatoriske elementer som tillater uttrykking i prokaryote vertsceller omfatter *f.eks.* PL-, lac-, trp- eller tac-promotoren i E. coli og eksempler på regulatoriske elementer som tillater ekspresjon i eukaryote vertsceller er AOX1- eller GAL1-promotoren i gjær eller CMV-, SV40- eller RSV-promotoren,

CMV-forsterkeren, SV40-forsterkeren eller en globinintron i pattedyr- og andre dyreceller. Ved siden av elementer som er ansvarlige for initiering av transkripsjon kan slike regulatoriske elementer også omfatte transkripsjonssluttsignaler, så som SV40-poly-A-setet eller tk-poly-A-setet, nedstrøms polynukleotidet. Videre, avhengig av

ekspressjonssystemet som anvendes, kan ledersekvenser som er i stand til å dirigere polypeptidet til et cellulært rom eller sekrere det til mediet tilsettes til den kodende sekvensen av polynukleotidet ifølge oppfinnelsen og er velkjent innen faget. Ledersekvensen(e) monteres i hensiktsmessig fase med translasjons-, initierings- og endesekvenser og fortrinnsvis en ledersekvens i stand til å dirigere sekresjon av translatert protein, eller en del av disse, inn i det periplasmiske rommet eller det ekstracellulære mediet. Eventuelt kan den heterologe sekvensen kode for et fusjonsprotein inkludert et C- eller N-terminalt identifikasjonspeptid som bibringer de ønskede egenskapene, *f.eks.* stabilisering eller forenklet rensing av uttrykt rekombinant produkt. I denne sammenheng er egnede ekspressjonsvektorer kjent innen faget så som

Okayama-Berg cDNA-ekspressjonsvektoren pcDV1 (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen), eller pSPORT1 (GIBCO BRL). Fortrinnsvis vil ekspressjonskontrollsekvensene være eukaryote promotorsystemer i vektorer som er i stand til å transformere eller transfektere eukaryote vertsceller, men kontrollsekvenser for prokaryote verter kan også anvendes. Når vektoren er blitt innført i den

hensiktsmessige verten, opprettholdes verten under betingelser egnet for ekspressjon på høyt nivå av nukleotidsekvensene, og, som ønsket, kan oppsamling og rensing av immunglobulinlettkjedene, de tunge kjedene, lette-/tunge kjededimerer eller intakte antistoffer, bindingsfragmenter eller andre immunglobulinformer følge; se Beychok, *Cells of Immunglobulin Synthesis*, Academic Press, N.Y., (1979).

[00123] Den foreliggende oppfinnelsen inkluderer også fragmenter av polynukleotidene ifølge oppfinnelsen, som beskrevet andre steder. Ytterligere polynukleotider som koder for fusjonspolynukleotider, Fab-fragmenter og andre derivater som beskrevet i dette dokumentet er også omfattet av oppfinnelsen.

[00124] Polynukleotidene kan fremstilles eller tilvirkes ved enhver metode kjent innen faget. Hvis for eksempel nukleotidsekvensen av antistoffet er kjent, kan et polynukleotid som koder for antistoffet settes sammen fra kjemisk syntetiserte oligonukleotider (*f.eks.* som beskrevet i Kutmeier *et al.* *BioTechniques* 17:242 (1994)), som kort fortalt innebærer syntese av overlappende oligonukleotider som inneholder deler av sekvensen som koder for antistoffet, hybridisere og sammenbinde oligonukleotidene, og deretter forsterke de sammenbundne oligonukleotidene med PCR.

[00125] Alternativt kan et polynukleotid som koder for et antistoff, eller antigenbindingsfragment, en variant, eller et derivat av disse genereres fra nukleinsyre fra en egnet kilde. Hvis en klon inneholdende en nukleinsyre som koder for et bestemt

antistoff ikke er tilgjengelig, men sekvensen av antistoffmolekylet er kjent, kan en nukleinsyre som koder for antistoffet syntetiseres kjemisk eller oppnås fra en egnet kilde (*f.eks.* et cDNA-antistoffbibliotek eller et cDNA-bibliotek generert fra, eller nukleinsyre, fortrinnsvis poly A + RNA, isolert fra, ethvert vev eller celler som uttrykker det neoantigenspesifikke antistoffet, så som hybridomceller valgt for å uttrykke et antistoff) ved PCR-forsterkning ved hjelp av syntetiske primere hybridiserbare til 3'- og 5'-endene av sekvensen eller ved kloning ved hjelp av en oligonukleotidsonde spesifikk for den bestemte gensekvensen for å identifisere, *f.eks.* et cDNA-klon fra et cDNA-bibliotek som koder for antistoffet. Forsterkede nukleinsyrer generert av PCR kan så klones inn i repeterbare kloningsvektorer ved hjelp av enhver metode velkjent innen faget.

[00126] Når nukleotidsekvensen og tilsvarende aminosyresekvens av antistoffet, eller et antigenbindingsfragment, en variant, eller et derivat av disse bestemmes, kan nukleotidsekvensen til denne manipuleres ved hjelp av metoder velkjent innen faget for manipulering av nukleotidsekvenser, *f.eks.* rekombinante DNA-metoder, seterettet mutagenese, PCR osv. (se for eksempel metodene beskrevet i Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2.utg., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990) og Ausubel *et al.*, utg., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1998), for å generere antistoffer som har en annen aminosyresekvens, for eksempel for å skape aminosyresubstitusjoner, deleasjoner og/eller innsettinger.

V. Ekspresjon av antistoffpolypeptider

[00127] Den foreliggende oppfinnelsen innebærer også en metode for å fremstille celler i stand til å uttrykke et antistoff ifølge oppfinnelsen eller dets tilsvarende immunoglobulinkjede(r) omfattende genmodifiserte celler med polynukleotidet eller vektoren ifølge oppfinnelsen. Cellene som kan oppnås ved metoden ifølge oppfinnelsen kan anvendes for eksempel til å «å teste hvordan antistoffet ifølge oppfinnelsen interagerer med antigenet sitt».

[00128] Etter manipulering av det isolerte genetiske materialet for å tilveiebringe antistoffer, eller antigenbindingsfragmenter, varianter eller derivater av disse ifølge oppfinnelsen, settes vanligvis polynukleotidene som koder for antistoffene inn i en ekspresjonsvektor for innføring inn i vertsceller som kan anvendes til å fremstille den ønskede faststoffmengden.

[00129] Rekombinant ekspresjon av et antistoff, eller fragment, derivat eller analog av disse, *f.eks.* en tung eller lett kjede av et antistoff som binder et målmolekyl er beskrevet i dette dokumentet. Når et polynukleotid som koder for et antistoffmolekyl eller en tung- eller lett kjede av et antistoff, eller del av disse (som fortrinnsvis

inneholder det tunge eller lette kjedevariable domenet) ifølge oppfinnelsen er oppnådd, kan vektoren for fremstilling av antistoffmolekylet fremstilles ved rekombinant DNA-teknologi ved hjelp av metoder som er velkjent innen teknikken. Således er det beskrevet metoder for fremstilling av et protein ved å uttrykke et polynukleotid som inneholder et antistoff som koder for en nukleotidsekvens i dette dokumentet.

Metodene, som er velkjente for fagfolk på området, kan anvendes til å konstruere ekspresjonsvektorer som inneholder antistoff-kodende sekvenser og hensiktsmessig transkripsjonelle og translasjonelle kontrollsignaler. Disse metodene inkluderer for eksempel *in vitro*-rekombinante DNA-metoder, syntetiske metoder og *in vivo*-genetisk rekombinasjon. Oppfinnelsen tilveiebringes således replikerbare vektorer omfattende en nukleotidsekvens som koder for et antistoffmolekyl ifølge oppfinnelsen, eller en tung- eller lett kjede av disse, eller et tung- eller lettkjedevariabelt domene, operativt bundet til en promotor. Slike vektorer kan inkludere nukleotidsekvensen som koder for det konstante området' av antistoffmolekylet (se *f.eks.* PCT-publikasjon WO 86/05807, PCT-publikasjon WO 89/01036; og amerikansk patent nr. 5 122 464) og det variable domenet av antistoffet kan klones inn i en slik vektor for ekspresjon av hele den tunge eller lette kjeden.

[00130] Den foreliggende oppfinnelsen vedrører vektorer, særlig plasmider, kosmider, virus og bakteriofager som anvendes konvensjonelt i genteknologi som omfatter et polynukleotid som koder for antigenet eller fortrinnsvis et variabelt domene av en immunglobulinkjede av et antistoff ifølge oppfinnelsen; eventuelt i kombinasjon med et polynukleotid ifølge oppfinnelsen som koder for det variable domenet av den andre immunglobulinkjeden av antistoffet ifølge oppfinnelsen. Fortrinnsvis er vektoren en ekspresjonsvektor og/eller en genoverføring- eller målrettingsvektor.

Ekspresjonsvektorer avledet fra virus så som retrovirus, vaccinia virus, adeno-forbundet virus, herpes-virus, eller bovint papillomvirus, kan anvendes for levering av polynukleotidene eller vektoren ifølge oppfinnelsen til målrettet cellepopulasjon. Metodene som er velkjente for fagfolk på området kan anvendes til å konstruere rekombinante virale vektorer; se for eksempel metodene beskrevet i Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. og Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). Alternativt kan polynukleotidene og vektorene ifølge oppfinnelsen rekonstitueres i liposomer for levering til målceller. Vektorene som inneholder polynukleotidene ifølge oppfinnelsen (*f.eks.* tung- og/eller lettvariable domene(r) av immunglobulinkjedene som koder for sekvenser og ekspresjonskontrollsekvenser) kan overføres til vertscellen ved velkjente metoder, som varierer avhengig av typen av cellulær vert. For eksempel kan kalsiumkloridtransfeksjon allment benyttes for prokaryote celler, mens

kalsiumfosfatbehandling eller elektroporering kan anvendes for andre cellulære verter; se Sambrook, ovenfor.

[00131] Begrepet "vektor" eller "ekspresjonsvektor" anvendes i dette dokumentet for å bety vektorer som anvendes i henhold til den foreliggende oppfinnelsen som et vehikkel for å innføre og uttrykke et ønsket gen i en vertscelle. Som kjent for fagfolk på området kan slike vektorer velges lett fra gruppen bestående av plasmider, fager, virus og retrovirus. Generelt vil vektorer som er compatible med den foreliggende oppfinnelsen omfatte en utvelgelsesmarkør, hensiktsmessige restriksjonssteder for å lette kloning av det ønskede genet og evnen til å gå inn i og/eller replikere seg i eukaryote eller prokaryote celler.

[00132] For formålene ifølge denne oppfinnelsen kan det anvendes tallrike ekspresjonsvektorsystemer. For eksempel anvender en klasse av vektorer DNA-elementer som avledes fra dyrevirus så som bovint papillomvirus, polyomvirus, adenovirus, vaccinia virus, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV eller MOMLV) eller SV40-virus. Andre innebærer anvendelsen av polycistroniske systemer med interne ribosombindingssteder. I tillegg kan celler som har integrert DNA-et i sine kromosomer velges ved å innføre én eller flere markører som tillater utvelgelse av transfekterte vertsceller. Markøren kan sørge for prototrofi til en auksotrof vert, biocidresistens (*f.eks.* antibiotika) eller resistens overfor tungmetaller så som kobber. Det utvelgbare markørgenet kan enten bindes direkte til DNA-sekvensene som skal uttrykkes, eller innføres i den samme cellen ved co-transformasjon. Ytterligere elementer kan også være nødvendig for optimal syntese av mRNA. Disse elementene kan inkludere signalsekvenser, spleisesignaler, så vel som transkripsjonelle promotorer, forsterkere og termineringssignaler.

[00133] I særlig foretrukne utforminger innføres de klonede variable områdegenene inn i en ekspresjonsvektor sammen med de tunge og lette kjedekonstante områdegenene (fortrinnsvis menneske) syntetisk som omtalt ovenfor. I en utforming gjøres dette ved hjelp av en patentbeskyttet uttrykingsvektor fra Biogen IDEC, Inc., referert til som NEOSPLA (offentliggjort i amerikansk patent 6 159 730). Denne vektoren inneholder cytomegaloviruspromotoren/forsterkeren, den murine hovedpromotoren av betaglobin, SV40-replikasjonsopprinnelsen, den bovine veksthormonpolyadenyleringssekvensen, neomycinfosfotransferase ekson 1 og ekson 2, dihydrofolatreduktasegenet og ledersekvensen. Denne vektoren er blitt funnet å resultere i svært høye ekspresjonsnivåer av antistoffer ved innføring av variable og konstante områdegener, transfeksjon i CHO-celler, etterfulgt av utvelgelse i G418-holdige medium og metotreksatforsterkning. Enhver ekspresjonsvektor som er i stand til å frembringe ekspresjon i eukaryote celler kan selvsagt anvendes i den foreliggende oppfinnelsen. Eksempler på egnede vektorer inkluderer, men er ikke begrenset til, plasmider pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2,

pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1 og pZeoSV2 (tilgjengelig fra Invitrogen, San Diego, CA), og pCI-plasmid (tilgjengelig fra Promega, Madison, WI). Generelt er det rutineeksperimentering å screene et stort antall transformerte celler for å finne dem som uttrykker hensiktsmessig høy konsentrasjon av tunge og lette
 5 immunglobulinkjeder, og dette kan utføres for eksempel med robotsystemer. Man lærer også om vektorsystemer i amerikansk patent nr. 5 736 137 og 5 658 570, som hver er innført som referanse i sin helhet i dette dokumentet. Dette systemet sørger for høye ekspresjonsnivåer, *f.eks.* > 30 pg/celle/dag. Andre eksempler på vektorsystemer offentliggjøres i *f.eks.* amerikansk patent 6 413 777.

10 **[00134]** I andre foretrukne utforminger kan antistoffene eller antigenbindingsfragmentene, varianter eller derivater av disse ifølge oppfinnelsen uttrykkes ved hjelp av polycistroniske konstrukter som for eksempel de offentliggjort i amerikansk patentsøknad med publikasjon nr. 2003-0157641 A1, innlevert 18. november 2002. I disse nye ekspresjonssystemene kan flere genprodukter av interesse
 15 så som tunge og lette kjeder av antistoffer fremstilles fra et enkelt polycistronisk konstrukt. Disse systemene anvender fordelaktig et internt ribosominngangssted (IRES) for å tilveiebringe relativt høye antistoffnivåer. Kompatible IRES-sekvenser er offentliggjort i amerikansk patent nr. 6 193 980. Fagfolk på området vil forstå at slike ekspresjonssystemer kan anvendes for å effektivt fremstille det fullstendige området av
 20 antistoffer offentliggjort i den foreliggende søknaden.

[00135] Mer generelt, når vektoren eller DNA-sekvensen som koder for en monomerisk subenhet av antistoffet er blitt fremstilt, kan ekspresjonsvektoren innføres i en hensiktsmessig vertscelle. Innføring av plasmidet inn i vertscellen kan utføres ved forskjellige metoder velkjente for fagfolk på området. Disse inkluderer, men er ikke
 25 begrenset til, transfeksjon (inkludert elektroforese og elektroporering), protoplastfusjon, utfelling med kalsiumfosfat, cellefusjon med innhyllt DNA, mikroinjeksjon og infeksjon med intakt virus. Se Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Vectors, Rodriguez and Denhardt, utg., Butterworths, Boston, Mass., kapittel 24.2, s. 470-472 (1988). Vanligvis skjer innføring av plasmid i verten
 30 via elektroporering. Vertscellene som har uttrykingskonstruksjonen dyrkes under betingelser som hensiktsmessig egner seg for fremstillingen av de lette kjedene og tunge kjedene, og analyseres for den tunge og/eller lette kjedeproteinsyntesen. Eksempler på analysemetoder inkluderer enzym-bundne immunsorbentanalyse (ELISA), radioimmunanalyse (RIA) eller fluorescens-aktivert celledsorteringsanalyse (FACS), immunhistokjemi og lignende.
 35

[00136] Ekspresjonsvektoren overføres til en vertscelle ved hjelp av konvensjonelle metoder og de transfekteerte cellene dyrkes deretter ved konvensjonelle metoder for å fremstille et antistoff for anvendelse i metodene beskrevet i dette dokumentet. Således inkluderer oppfinnelsen vertsceller som inneholder et

polynukleotid som koder for et antistoff ifølge oppfinnelsen, eller en tung eller lett kjede av disse, operativt bundet til en heterolog promotor. I foretrukne utforminger for ekspresjonen av dobbelt-kjedede antistoffer kan vektorer som koder for både de tunge og lette kjedene co-uttrykkes i vertscellen for ekspresjon av hele

5 immunglobulinmolekylet, som beskrevet nedenfor.

[00137] Den foreliggende oppfinnelsen vedrører videre vertsceller transformert

med et polynukleotid eller en vektor ifølge oppfinnelsen. Vertscellen kan være en prokaryot eller eukaryot celle. Polynukleotidet eller vektoren ifølge oppfinnelsen som er til stede i vertscellen kan enten integreres i genomet til vertscellen eller det kan

10 opprettholdes ekstrakromosomalt. Vertscellen kan være enhver prokaryot eller eukaryot celle, så som en bakterie-, insekt-, sopp-, plante-, dyre- eller humancelle.

Foretrukne soppceller er *f.eks.* de av *Saccharomyces*-slekten, særlig de av *S. cerevisiae*-artene. Begrepet "prokaryot" menes å inkludere alle bakterier som kan transformeres

eller transfekteres med DNA- eller RNA-molekyler for ekspresjonen av et antistoff ifølge oppfinnelsen eller de tilsvarende immunglobulinkjedene. Prokaryote verter kan

15 inkludere gram-negative så vel som gram-positive bakterier så som for eksempel *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* og *Bacillus subtilis*. Begrepet "eukaryot" er

ment å inkludere gjær-, høyere plante-, insekt- og fortrinnsvis pattedyrceller, mest foretrukket HEK-293-, NSO- og CHO-celler. Avhengig av verten som benyttes i en

20 rekombinant fremstillingsprosedyre kan antistoffene eller immunglobulinkjedene kodet for av polynukleotidet ifølge den foreliggende oppfinnelsen glykosyleres eller kan ikke-glykosyleres. Antistoffene ifølge oppfinnelsen eller de tilsvarende

immunglobulinkjedene kan også inkludere en initiell metioninaminosyrerest. Et polynukleotid ifølge oppfinnelsen kan anvendes til å transformere

eller transfektere verten ved hjelp av enhver av metodene som er allment kjent for

25 fagfolk på området. Videre er metodene for fremstilling av fusjonerte, operabelt bundne gener og som uttrykker dem i *f.eks.* pattedyrceller og bakterier velkjent innen faget (Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989). De genetiske konstruktene og metodene

30 beskrevet deri kan anvendes for ekspresjon av antistoffet ifølge oppfinnelsen eller de tilsvarende immunglobulinkjedene i eukaryote eller prokaryote verter. Generelt anvendes ekspresjonsvektorer som inneholder promotorsekvenser som letter effektiv transkripsjon av det innsatte polynukleotidet i forbindelse med verten.

Ekspresjonsvektoren inneholder vanligvis en replikasjonsopprinnelse, en promotor, og

35 en endedel, så vel som spesifikke gener som er i stand til å tilveiebringe fenotypisk utvelgelse av de transformerte cellene. Egnede kildeceller for DNA-sekvensene og vertscellene for immunglobulinekspresjon og sekresjon kan oppnås fra en rekke kilder, så som American Type Culture Collection ("Catalogue of Cell Lines and Hybridomas", femte utgave (1985) Rockville, Maryland, U.S.A. Videre kan transgene dyr,

fortrinnsvis pattedyr, omfattende celler ifølge oppfinnelsen anvendes for storskalaframstilling av antistoffet ifølge oppfinnelsen.

[00138] Således, i en ytterligere utforming, vedrører den foreliggende oppfinnelsen en metode for fremstilling av et lidelsesforbundet proteinspesifikt bindingsmolekyl, *f.eks.* et antistoff eller et bindingsfragment eller immunglobulinkjede(r) av disse, metoden er omfattende

- (a) dyrkning av en celle som beskrevet ovenfor; og
- (b) isolere antigenet, bindingsmolekylet, antistoffet eller fragmentet, eller immunglobulinkjede(ne) av disse fra kulturen.

[00139] De transformerte vertene kan dyrkes i fermentorer og dyrkes ifølge metodene kjent innen faget for å oppnå optimal cellevekst. Når de uttrykkes kan hele antistoffene, deres dimerer, individuelle lette og tunge kjeder, eller andre immunglobulinformer av den foreliggende oppfinnelsen renses i henhold til standardprosedyrer innen faget, inkludert ammoniumsulfatutfelling, affinitetskolonner, kolonnekromatografi, gelelektroforese og lignende; se Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982). Antistoffet eller dets tilsvarende immunglobulinkjede(r) ifølge oppfinnelsen kan deretter isoleres fra vekstmediet, de cellulære lysatene, eller de cellulære membranfraksjonene. Isolering og rensing av *f.eks.* de rekombinant uttrykte antistoffene eller immunglobulinkjedene kan ifølge oppfinnelsen være ethvert vanlig middel så som for eksempel preparative kromatografiske separasjoner og immunologiske separasjoner så som de som innebærer anvendelse av monoklonale eller polyklonale antistoffer rettet mot *f.eks.* det konstante området av antistoffet ifølge oppfinnelsen. Det vil være klart for fagfolk på området at antistoffene ifølge oppfinnelsen videre kan kobles til andre deler for *f.eks.* medikamentmålrettings- og bildebehandlingsanvendelser. En slik kobling kan utføres kjemisk etter ekspresjon av antistoffet eller antigenet til festepunktet eller koblingsproduktet kan konstrueres inn i antistoffet eller antigenet ifølge oppfinnelsen på DNA-nivået. DNA-ene uttrykkes deretter i et egnet vertssystem og de uttrykte proteinene samles og renatureres om nødvendig.

[00140] I det vesentlige foretrekkes rene immunglobuliner med minst ca. 90 til 95 % og 98 til 99 % eller mer homogenitet er mest foretrukket for farmasøytiske anvendelser. Når de er rensset, delvis eller til homogenitet som ønsket, kan antistoffene deretter anvendes terapeutisk (inkludert ekstrakorporelt) eller for å utvikle og å utføre analyseprosedyrer.

[00141] Vertscellen kan co-transfekteres med to ekspresjonsvektorer ifølge oppfinnelsen, den første vektoren koder for et tungt kjedeavledet polypeptid og den andre vektoren koder for et lett kjedeavledet polypeptid. De to vektorene kan inneholde identiske utvelgbare markører som muliggjør lik ekspresjon av tunge og lette

kjedepolypeptider. Alternativt kan det anvendes en enkeltvektor som koder for både tunge og lette kjedepolypeptider. I slike situasjoner plasseres den lette kjeden fordelaktig før den tunge kjeden for å unngå et overskudd av giftige frie tunge kjeder (Proudfoot, Nature 322:52 (1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197 (1980)). De kodende sekvensene for de tunge og lette kjedene kan omfatte cDNA eller genomisk DNA.

[00142] Som anvendt i dette dokumentet refererer "vertsceller" til celler som rommer vektorer konstruert ved hjelp av rekombinante DNA-metoder og som koder for minst ett heterologt gen. I beskrivelser av prosesser for isolasjon av antistoffer fra rekombinante verter anvendes begrepene "celle" og "cellekultur" om hverandre for å betegne antistoffkilden med mindre noe annet er klart spesifisert. Med andre ord kan å utvinne polypeptidet fra "cellene" bety enten fra nedsentrifugerte helceller eller fra cellekulturen som inneholder både mediet og de suspenderte cellene.

[00143] Mange vertsekspresjonsvektorsystemer kan anvendes for å uttrykke antistoffmolekyler for anvendelse i metodene beskrevet i dette dokumentet. Slike vertsekspresjonssystemer representerer vehikler der kodingssekvensene av interesse kan fremstilles og deretter renses; men også representere celler som kan, når de transformeres eller transfekteres med de hensiktsmessig nukleotidkodingssekvensene, uttrykke et antistoffmolekyl ifølge oppfinnelsen *in situ*. Dette inkluderer, men er ikke begrenset til mikroorganismer så som bakterier (*f.eks.* E. coli, B. subtilis) transformert med rekombinant bakteriofage DNA-, plasmid DNA- eller kosmid DNA-ekspresjonsvektorer som inneholder antistoffkodingssekvensene; gjær (*f.eks.* Saccharomyces, Pichia) transformert med rekombinante gjærekspresjonsvektorer som inneholder antistoffkodingssekvensene; insektcellesystemer infisert med rekombinante virusekspresjonsvektorer (*f.eks.* baculovirus) som inneholder antistoffkodingssekvensene; plantecellesystemer infisert med rekombinante virusekspresjonsvektorer (*f.eks.* blomkålmosaikkvirus, CaMV; tobakkmosaikkvirus, TMV) eller transformert med rekombinante plasmidekspresjonsvektorer (*f.eks.* Ti-plasmid) som inneholder antistoffkodingssekvenser; eller pattedyrcellelinjesystemer (*f.eks.* COS-, CHO-, BLK-, 293-, 3T3-celler) med rekombinante ekspresjonskonstruksjoner som inneholder promotorer avledet fra genomet til pattedyrceller (*f.eks.* metallotioneinpromotor) eller fra pattedyrvirus (*f.eks.* den sene adenoviruspromotoren; vaccinia virus 7,5K-promotoren). Fortrinnsvis anvendes bakterieceller så som Escherichia coli og mer foretrukket eukaryote celler, særlig for ekspresjon av helrekombinant antistoffmolekyl, for ekspresjon av et rekombinant antistoffmolekyl. For eksempel er pattedyrceller så som eggstokkceller fra kinesisk dverghamster (CHO), i forbindelse med en vektor så som det store mellomliggende tidlige genpromotorelementet fra humant

cytomegalovirus, et effektivt ekspresjonssystem for antistoffer (Foecking *et al.*, Gene 45:101 (1986); Cockett *et al.*, Bio/Technology 8:2 (1990)).

[00144] Vertscellelinjen som anvendes for å uttrykke proteiner er ofte av pattedyropprinnelse; fagfolk på området innehar evnen til å preferensielt bestemme bestemte vertscellelinjer som er best egnet for det ønskede genproduktet som skal uttrykkes deri. Eksempler på vertscellelinjer inkluderer, men er ikke begrenset til, CHO (eggstokkceller fra kinesiske dverghamstere), DG44 og DUXB11 (eggstokkcellestammer fra kinesisk dverghamster, DHFR minus), HELA (humant cervikalt karsinom), CVI (apenyrestamme), COS (et derivat av CVI med SV40 T-antigen), VERY, BHK (nyre fra hamsterunger), MDCK, 293, WI38, R1610 (fibroblaster fra kinesisk dverghamster) BALBC/3T3 (musefibroblast), HAK (hamsternyrestamme), SP2/O (musemyelom), P3x63-Ag3,653 (musemyelom), BFA-1c1BPT (bovine endotelceller), RAJI (humane lymfocytter) og 293 (human nyre). CHO-celler er særlig foretrukket. Vertscellelinjer er vanligvis tilgjengelig fra kommersielle tjenester, the American Tissue Culture Collection eller fra publisert litteratur.

[00145] I tillegg kan det velges en vertscellestamme som modulerer ekspresjonen av de innførte sekvensene, eller modifiserer og prosesserer genproduktet på den spesifikt ønskede måten. Slike modifikasjoner (*f.eks.* glykosylering) og prosessering (*f.eks.* spalting) av proteinproduktene kan være viktig for proteinfunksjonen. Forskjellige vertsceller har karakteristiske og spesifikke mekanismer for post-translasjonell prosessering og modifikasjon av proteiner og genprodukter. Hensiktsmessige cellelinjer eller vertssystemer kan velges for å forsikre korrekt modifikasjon og prosessering av det fremmede proteinet som uttrykkes. For dette formålet kan det anvendes eukaryote vertsceller som besitter det cellulære maskineriet for riktig prosessering av det primære transkriptet, glykosyleringen og fosforyleringen av genproduktet.

[00146] For langsiktig, høy-ytelsesproduksjon av rekombinante proteiner foretrekkes stabil ekspresjon. For eksempel kan cellelinjer som stabilt uttrykker antistoffmolekylet konstrueres. Snarere enn å anvende ekspresjonsvektorer som inneholder viral replikasjonsopprinnelse, kan vertscellene transformeres med DNA kontrollert av hensiktsmessige ekspresjonskontrollelementer (*f.eks.* promotor, forsterker, sekvenser, transkripsjonsterminatorer, polyadenyleringsseter osv.), og en utvelgbar markør. Etter innføring av det fremmede DNA-et kan de konstruerte cellene få vokse i 1-2 dager i et anrikt medium, og deretter kobles til et selektivt medium. Den utvelgbare markøren i det rekombinante plasmidet medfører resistens til utvelgelsen og tillater celler å stabilt integrere plasmidet i deres kromosomer og vokse til å danne *foci* som i sin tur kan kloneres og ekspanderes inn i cellelinjer. Denne metoden kan

fordelaktig anvendes til å konstruere cellelinjer som stabilt uttrykker antistoffmolekylet.

[00147] En rekke utvelgelsessystemer kan også anvendes, inkludert, men ikke begrenset til, herpes simplex-virus tymidinkinase (Wigler *et al.*, Cell 11:223 (1977)), hypoxantin-guaninfosforibosyltransferase (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sd USA 48:202 (1992)), og adeninfosforibosyltransferasegener (Lowy *et al.*, Cell 22:817 1980) kan benyttes i henholdsvis tk-, hgprt- eller aprt-celler. Dessuten kan anti-metabolittmotstand anvendes som grunnlag for utvelgelse av de følgende genene: dhfr, som gir resistens mot metotreksat (Wigler *et al.*, Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980); O'Hare *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)); gpt, som gir resistens mot mykofenolsyre (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)); neo, som gir resistens mot aminoglykosidet G-418 Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu and Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan, Science 260:926-932 (1993); og Morgan and Anderson, Ann. Rev Biochem. 62:191-217 (1993), TIB TECH 11(5):155-215 (mai 1993); og hygromycin (Santerre *et al.*, Gene 30:147 (1984). Metoder allment kjent innen faget av rekombinant DNA-teknologi som kan anvendes er beskrevet i Ausubel *et al.* (utg.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); og i kapitlene 12 og 13, Dracopoli *et al.* (utg.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin *et al.*, J. Mol. Biol. 150:1 (1981).

[00148] Ekspresjonsnivåene av et antistoffmolekyl kan økes av vektorforsterkning (for en gjennomgang, se Bebbington og Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Academic Press, New York, bind 3. (1987)). Når en markør i vektorsystemet som uttrykker antistoff er amplifiserbar vil økning i nivået av inhibitor til stede i kulturen i vertscellen øke antallet kopier av markørgenet. Ettersom det forsterkede området er forbundet med antistoffgenet, vil produksjonen av antistoffet også øke (Crouse *et al.* Mol. Cell. Biol. 3:257 (1983)).

[00149] *In vitro*-fremstilling tillater oppskalering for å gi store mengder av de ønskede polypeptidene. Metoder for pattedyrcelledyrkingsprosessen under vevskulturbetingelser er kjent innen faget og inkluderer homogen suspensjonskultur, *f.eks.* i en trykklufttransportreaktor eller i en kontinuerlig omrøringsreaktor eller immobilisert eller innfanget i cellekultur, *f.eks.* i hule fibre, mikrokapsler, på agarosemikrokuler eller keramiske patroner. Om nødvendig og/eller ønskelig kan polypeptidløsningene renses ved vanlige kromatografiske metoder, for eksempel gelfiltrering, ionebytterkromatografi, kromatografi på DEAE-cellulose eller (immun)affinitetskromatografi, *f.eks.* etter preferensiell biosyntese av et syntetisk

hengselområdepolypeptid eller før eller etter HIC-kromatografitrinnet beskrevet i dette dokumentet.

[00150] Gener som koder for antistoffer, eller antigenbindingsfragmenter, varianter eller derivater av disse ifølge oppfinnelsen, kan også uttrykkes i andre celler enn pattedyrceller, som bakterie-, insekt-, gjær- eller planteceller. Bakterier som lett tar opp nukleinsyrer inkluderer medlemmer av enterobacteriaceae, så som stammer av *Escherichia coli* eller *Salmonella*, *Bacillaceae*, så som *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* og *Haemophilus-influenta*. Det vil videre forstås at de heterologe polypeptidene vanligvis blir en del av inklusjonslegemer når de uttrykkes i bakterier. De heterologe polypeptidene må isoleres, renses og deretter settes sammen til funksjonelle molekyler. Når fireverdige former av antistoffer er ønskelig vil delenheterne selvmontere seg i fireverdige antistoffer (WO02/096948A2).

[00151] I bakterielle systemer kan en rekke ekspresjonsvektorer fordelaktig velges avhengig av den tiltenkte anvendelsen for antistoffmolekylet som uttrykkes. Når for eksempel en stor mengde av et slikt protein skal fremstilles kan vektorer som dirigerer ekspresjon av høye nivåer av fusjonsproteinprodukter som lettere renses være ønskelig for generering av farmasøytiske sammensetninger av et antistoffmolekyl. Slike vektorer inkluderer, men er ikke begrenset til, *E. coli*-ekspresjonsvektoren pUR278 (Ruther *et al.*, EMBO J 2:1791 (1983)), der den antistoff-kodende sekvensen kan sammenbindes individuelt inn i vektoren i ramme med det lacZ-kodende området slik at det fremstilles et fusjonsprotein; pIN-vektorer (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24:5503-5509 (1989)), og lignende. pGEX-vektorer kan også anvendes for å uttrykke fremmede polypeptider som fusjonsproteiner med glutathion S-transferase (GST). Generelt er slike fusjonsproteiner løselige og kan lett renses fra lyserte celler ved å adsorbere og binde dem til en matriks av glutathion-agarosekuler og så eluere dem i tilstedeværelsen av fritt glutathion. pGEX-vektorene utvikles for å inkludere trombin eller faktor Xa-protease-spaltningsseter, slik at det klonede målgenproduktet kan frigjøres fra GST-delen.

[00152] I tillegg til prokaryoter kan eukaryote mikrober også anvendes. *Saccharomyces cerevisiae*, eller vanlig bakegjær, er den mest allment anvendte blant eukaryote mikroorganismer, selv om en rekke andre stammer er allment tilgjengelige, f.eks. *Pichia pastoris*.

[00153] For ekspresjon i *Saccharomyces* er YRp7-plasmidet, for eksempel (Stinchcomb *et al.*, Nature 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, Gene 7:141 (1979), Tschemper *et al.*, Gene 10:157 (1980)) allment anvendt. Dette plasmidet inneholder allerede TRP1-genet som tilveiebringer en utvelgelsesmarkør for en mutant stamme av gjær som mangler evnen til å vokse i tryptofan, for eksempel ATCC nr. 44076 eller PEP4-1 (Jones, Genetics 85:12 (1977)). Tilstedeværelsen av trp1-lesjonen som en

karakteristikk for gjærvertscellegenomet tilveiebringer så et effektivt miljø for påvisning av transformasjon ved vekst i fravær av tryptofan.

[00154] I et insektsystem anvendes vanligvis nukleært polyhedrose-virus fra *Autographa californica*- (AcNPV) som en vektor for å uttrykke fremmede gener.

5 Viruset vokser i *Spodoptera frugiperda*-celler. Antistoffet som koder for sekvensen kan klones individuelt inn i ikke-essensielle områder (for eksempel polyhedringenet) til viruset og plasseres under kontroll av en AcNPV-promotor (for eksempel polyhedrinpromotoren).

[00155] Når et antistoffmolekyl ifølge oppfinnelsen er blitt rekombinant uttrykt
10 kan det renses ved enhver metode kjent innen faget for rensing av et immunglobulinmolekyl, for eksempel ved kromatografi, (*f.eks.* ionebytte, affinitet, særlig ved affinitet for det spesifikke antigenet etter protein A, og størrelseskolonnekromatografi), sentrifugering, differensiell løselighet eller ved enhver annen standardmetode for rensing av proteiner. Alternativt er en foretrukket metode for
15 å øke affiniteten av antistoffene ifølge oppfinnelsen offentliggjort i amerikansk patent 2002 0123057 A1.

VI. Fusjonsproteiner og konjugater

20 **[00156]** Antistoffene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan omfatte et ytterligere domene, domenet bindes ved kovalente eller ikke-kovalente bindinger. Bindeleddet kan være basert på genetisk fusjon i henhold til metodene kjent innen faget og beskrevet ovenfor eller kan utføres ved *f.eks.* kjemisk kryssbinding, som beskrevet i *f.eks.* internasjonal søknad WO94/04686. Det ekstra domenet til stede i
25 fusjonsproteinet omfattende antistoffet ifølge oppfinnelsen kan fortrinnsvis bindes sammen av et fleksibelt bindeledd, fortrinnsvis et polypeptidbindeledd, der polypeptidbindeleddet omfatter flere hydrofile, peptid-bundne aminosyrer som er lange nok til å strekke seg over avstanden mellom den C-terminale enden av det ytterligere domenet og den N-terminale enden av antistoffet ifølge oppfinnelsen eller omvendt.
30 Det terapeutisk eller diagnostisk aktive midlet kan kobles til antistoffet ifølge oppfinnelsen eller et antigenbindingsfragment av disse på ulike måter. Dette inkluderer for eksempel enkelt-kjedede fusjonsproteiner omfattende de variable områdene av antistoffet ifølge oppfinnelsen koblet med kovalente metoder, så som peptidbindinger, til det terapeutisk eller diagnostisk aktive midlet. Ytterligere eksempler inkluderer
35 molekyler som omfatter minst et antigenbindingsfragment koblet til flere molekyler kovalent eller ikke-kovalent inkludert de i den følgende ikke-begrensende illustrerende listen. Traunecker, Int. J. Cancer Surp. SuDP 7 (1992), 51-52, beskriver den bispesifikke reagensen janusin der Fv-området rettet mot CD3 kobles til løselig CD4 eller til andre ligander så som OVCA og IL-7. På samme måte kan de variable

områdene av antistoffet ifølge oppfinnelsen konstrueres inn i Fv-molekyler og kobles til alternative ligander så som de som er illustrert i den siterte artikkelen. Higgins, J. Infect Disease 166 (1992), 198-202, beskrev et hetero-konjugatantistoff sammensatt av OKT3 kryssbundet til et antistoff rettet mot en spesifikk sekvens i V3-området av GP120. Slike hetero-konjugerte antistoffer kan også konstrueres ved hjelp av minst de variable områdene som finnes i antistoffet ifølge metodene i oppfinnelsen. Andre eksempler på spesifikke antistoffer inkluderer de beskrevet av Fanger, Cancer Treat. Res. 68 (1993), 181-194 og av Fanger, Crit. Rev. Immunol. 12 (1992), 101-124.

[00157] I en ytterligere utforming av den foreliggende oppfinnelsen merkes bindingsmolekylet, antistoffet, immunglobulinkjeden eller et bindingsfragment av disse eller antigenet detekterbart. Merkemidler kan kobles enten direkte eller indirekte til antistoffene eller antigenene ifølge oppfinnelsen. Ett eksempel på indirekte kobling er ved hjelp av en avstandsstykkedel.

[00158] Derfor foreslår den biologiske aktiviteten til bindingsmolekylene, *f.eks.* antistoffene som er identifisert i dette dokumentet, at de har tilstrekkelig affinitet til å gjøre de til potensielle kandidater for medikamentlokalisering til celler som uttrykker de hensiktsmessige overflatestrukturene i henholdsvis den syke cellen og vevet. Denne målrettingen og bindingen til celler kan være nyttige for å levere terapeutisk eller diagnostisk aktive midler og genterapi/genlevering.

Molekyler/partikler med et antistoff ifølge oppfinnelsen vil binde spesifikt til celler/vev som uttrykker variantformen av det patologiske proteinet, og kan ha derfor ha diagnostisk og terapeutisk anvendelse. Således kan bindingsmolekylet, *f.eks.* antistoff- eller antigenbindingsfragmentet av disse ifølge den foreliggende oppfinnelse merkes (*f.eks.* fluorescerende, radioaktivt, enzym, kjernemagnetisk, tungmetall) og anvendes til å detektere spesifikke mål *in vivo* eller *in vitro* inkludert "immunkjemi" som analyser *in vitro*. De kan anvendes *in vivo* på en måte som ligner på nukleærmedisinbildebehandlingsmetoder for å detektere vev, celler eller andre materialer som uttrykker neoepitopen. Således, i en ytterligere utforming vedrører den foreliggende oppfinnelsen anvendelsen av et bindingsmolekyl eller et antistoff ifølge den foreliggende oppfinnelsen eller bindingsfragment av disse for fremstilling av en sammensetning for *in vivo*-deteksjon av eller målretting av et terapeutisk og/eller diagnostisk middel til et lidelsesforbundet protein i hjernen, og detekterer, undertrykker dannelsen av eller reduserer patologiske proteinaggregater eller konformasjoner i et individ, for å forbedre kognisjon eller bremse eller reversere kognitiv svikt forbundet med sykdommer, eller for å trekke ut patologiske forbindelser eller forløpere av dem fra kroppsvæsker utenfor kroppen.

[00159] I visse utforminger omfatter antistoffpolypeptidet en aminosyresekvens eller én eller flere deler som normalt ikke forbindes med et antistoff. Eksempler på modifikasjoner er beskrevet i mer detalj nedenfor. For eksempel kan et

enkeltkjede fv-antistoff-fragment i henhold til oppfinnelsen omfatte en fleksibel bindeleddsekvens, eller kan modifiseres for å legge til en funksjonell del (*f.eks.* PEG, et medikament, et toksin, eller en merking).

[00160] Et antistoffpolypeptid ifølge oppfinnelsen kan omfatte, i det vesentlige
 5 bestå av, eller bestå av et fusjonsprotein. Fusjonsproteiner er kimære molekyler som omfatter for eksempel et immunglobulinantigenbindingsdomene med minst ett målbindingssete, og minst én heterolog del, *dvs.* en del den ikke naturlig bindes til i naturen. Aminosyresekvensene kan normalt eksistere i separate proteiner som bringes sammen i fusjonspolypeptidet eller de kan normalt finnes i det samme proteinet, men
 10 plasseres i et nytt arrangement i fusjonspolypeptidet. Fusjonsproteiner kan skapes, for eksempel ved kjemisk syntese eller ved å skape og translatere et polynukleotid der det kodes for peptidområdene i det ønskede forholdet.

[00161] Begrepet "heterolog" som anvendt for et polynukleotid eller et polypeptid, betyr at polynukleotidet eller polypeptidet avledes fra en selvstendig enhet
 15 fra den for resten av enheten som den sammenlignes med. For eksempel, slik det anvendes i dette dokumentet, avledes et "heterologt polypeptid som skal fusjoneres til et antistoff, eller et antigenbindingsfragment, en variant eller analog av disse fra et ikke-immunglobulinpolypeptid av samme art, eller et immunglobulin- eller ikke-immunglobulinpolypeptid av en annen art.

[00162] Som omtalt i mer detalj annensteds i dette dokumentet kan antistoffer, eller antigenbindingsfragmenter, varianter eller derivater av disse ifølge oppfinnelsen videre fusjoneres rekombinant til et heterologt polypeptid ved N- eller C-terminalen eller konjugeres kjemisk (inkludert kovalente og ikke-kovalente konjugeringer) til polypeptider eller andre sammensetninger. For eksempel kan antistoffer fusjoneres
 25 rekombinant eller konjugeres til molekyler nyttige som merking i deteksjonsanalyser og effektormolekyler så som heterologe polypeptider, medikamenter, radionuklider eller toksiner. Se *f.eks.* PCT-publikasjonene WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; amerikansk patent nr. 5 314 995; og britisk patent 396 387.

[00163] Antistoffer eller antigenbindingsfragmenter, varianter eller derivater av
 30 disse ifølge oppfinnelsen kan settes sammen av aminosyrer sammenføydd til hverandre ved hjelp av peptidbindinger eller modifiserte peptidbindinger, *dvs.* peptidisosterer, og kan inneholde andre aminosyrer enn de 20 gen-kodede aminosyrene. Antistoffer kan modifiseres ved naturlige prosesser, så som posttranslasjonell prosessering, eller ved kjemiske modifikasjonsmetoder som er velkjent innen faget. Slike modifikasjoner er
 35 godt beskrevet i vanlige tekster og i mer detaljerte monografier, så vel som i en voluminøs forskningslitteratur. Modifikasjoner kan forekomme hvor som helst i antistoffet, inkludert peptidryggraden, aminosyresidekjedene og amino- eller karboksylendene, eller på deler, så som karbohydrater. Det vil forstås at samme type modifikasjon kan være til stede i samme eller i en variantform ved flere seter i et gitt

antistoff. Dessuten kan et gitt antistoff inneholde mange typer modifikasjoner. Antistoffer kan forgrenes, for eksempel som et resultat av ubikvitinering, og de kan være sykliske, med eller uten forgrening. Sykliske, forgrenede og forgrenede sykliske antistoffer kan resultere fra naturlige posttranslasjonsprosesser eller kan lages ved syntetiske metoder. Modifikasjoner inkluderer acetylering, acylering, ADP-ribosylering, amidering, kovalent binding av flavin, kovalent binding av en heme-del, kovalent binding av et nukleotid- eller nukleotidderivat, kovalent binding av et lipid eller lipidderivat, kovalent binding av fosfotidylinositol, kryssbinding, syklisering, disulfidbindingsdannelse, demetylering, dannelse av kovalente kryssbindinger, dannelse av cystein, dannelse av pyroglutamat, formylering, gamma-karboksylering, glykosylering, GPI-ankerdannelse, hydroksylering, jodinering, metylering, myristoylering, oksidering, pegylering, proteolytisk prosessering, fosforylering, prenylering, rasemisering, selenoylering, sulfation, overførings-RNA-mediert tilsetning av aminosyrer til proteiner så som arginylering og ubikvitinering. (se *f.eks.* Proteins - Structure And Molecular Properties, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York 2. utg., (1993); Posttranslational Covalent Modification Of Proteins, B. C. Johnson, utg., Academic Press, New York, s. 1-12 (1983); Seifter *et al.*, Meth Enzymol 182:626-646 (1990); Rattan *et al.*, Ann NY Acad Sci 663:48-62 (1992)).

[00164] Den foreliggende oppfinnelsen sørger også for fusjonsproteiner omfattende et antistoff, eller antigenbindingsfragment, en variant, eller et derivat av disse, og et heterologt polypeptid. I en utforming omfatter, består i det vesentlige av, eller består et fusjonsprotein ifølge oppfinnelsen av et polypeptid med aminosyresekvensen til enhver én eller flere av VH-områdene av et antistoff ifølge oppfinnelsen eller aminosyresekvensen av ett eller flere av VL-områdene av et antistoff ifølge oppfinnelsen eller fragmenter eller varianter av disse, og en heterolog polypeptidsekvens. I en annen utforming omfatter, består i det vesentlige av, eller består et fusjonsprotein for anvendelse i diagnostikk- og behandlingsmetodene offentliggjort i dette dokumentet av et polypeptid med aminosyresekvensen av ethvert av det ene VH-CDR-et, de to eller de tre VH-CDR-ene av et antistoff, eller fragmenter, varianter eller derivater av disse, eller aminosyresekvensen til enhver av den ene, de to eller de tre VL-CDR-ene fra et antistoff, eller fragmenter, varianter eller derivater av disse, og en heterolog polypeptidsekvens. I en utforming omfatter fusjonsproteinet et polypeptid med aminosyresekvensen av et VH-CDR3 av et antistoff ifølge den foreliggende oppfinnelsen, eller fragment, derivat eller variant av disse, og en heterolog polypeptidsekvens, der fusjonsproteinet binder spesifikt til minst én neoepitop av et lidelsesforbundet protein. I en annen utforming omfatter et fusjonsprotein et polypeptid med aminosyresekvensen av minst et VH-område av et antistoff ifølge oppfinnelsen og aminosyresekvensen av minst ett VL-område av et antistoff ifølge oppfinnelsen eller fragmenter, derivater eller varianter av disse, og en heterolog polypeptidsekvens.

Fortrinnsvis tilsvarende VH- og VL-områdene av fusjonsproteinet et enkeltkildeantistoff (eller scFv- eller Fab-fragment) som spesifikt binder minst én neoepitop av et lidelsesforbundet protein. I nok en annen utforming omfatter et fusjonsprotein for anvendelse i diagnostikk- og behandlingsmetodene offentliggjort i dette dokumentet et polypeptid med aminosyresekvensen av ett, to, tre eller flere av VH-CDR-ene av et antistoff og aminosyresekvensen av ett, to, tre eller flere av VL-CDR-ene av et antistoff, eller fragmenter eller varianter av disse, og en heterolog polypeptidsekvens. Fortrinnsvis tilsvarende to, tre, fire, fem, seks eller flere av VH-CDR(-ene) eller VL-CDR(-ene) enkeltkildeantistoff (eller scFv- eller Fab-fragment) ifølge oppfinnelsen. Nukleinsyremolekyler som koder for disse fusjonsproteinene omfattes også av oppfinnelsen.

[00165] Eksempler på fusjonsproteiner angitt i litteraturen inkluderer fusjoner av T-celle-reseptoren (Gascoigne *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2936-2940 (1987)); CD4 (Capon *et al.*, Nature 337:525-531 (1989); Traunecker *et al.*, Nature 339:68-70 (1989); Zettmeissl *et al.*, DNA Cell Biol. USA 9:347-353 (1990); og Byrn *et al.*, Nature 344:667-670 (1990)); L-selektin (målsøkingsreseptoren) (Watson *et al.*, J. Cell. Biol. 110:2221-2229 (1990); og Watson *et al.*, Nature 349:164-167 (1991)); CD44 (Aruffo *et al.*, Cell 61:1303-1313 (1990)); CD28 og B7 (Linsley *et al.*, J. Exp. Med. 173:721-730 (1991)); CTLA-4 (Lisley *et al.*, J. Exp. Med. 174:561-569 (1991)); CD22 (Stamenkovic *et al.*, Cell 66:1133-1144 (1991)); TNF-reseptor (Ashkenazi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539 (1991); Lesslauer *et al.*, Eur. J. Immunol. 27:2883-2886 (1991); og Peppel *et al.*, J. Exp. Med. 174:1483-1489 (1991)); og IgE-reseptor α (Ridgway and Gorman, J. Cell. Biol. Vol. 115, sammendrag nr. 1448 (1991)).

[00166] Som omtalt annensteds i dette dokumentet, kan antistoffer eller antigenbindingsfragmenter, varianter eller derivater av disse ifølge oppfinnelsen fusjoneres til heterologe polypeptider for å øke *in vivo*-halveringstiden av polypeptidene eller for anvendelse i immunanalyser ved hjelp av metodene kjent innen faget. I en utforming kan for eksempel PEG konjugeres til antistoffene ifølge oppfinnelsen for å øke deres halveringstid *in vivo*. Leong, S.R., *et al.*, Cytokine 16:106 (2001); Adv. in Drug Deliv. Rev. 54:531 (2002); eller Weir *et al.*, Biochem. Soc. Transactions 30:512 (2002).

[00167] Videre kan antistoffer, eller antigenbindingsfragmenter, varianter eller derivater av disse ifølge oppfinnelsen fusjoneres til markørsekvenser, så som et peptid for å lette deres rensing eller detektering. I foretrukne utforminger er markøraminosyresekvensen et hekso-histidinpeptid, så som merkingen tilveiebrakt i en pQE-vektor (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), blant andre, hvorav mange er kommersielt tilgjengelig. Som beskrevet i Gentz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989), sørger for eksempel hekso-histidin for

praktisk rensing av fusjonsproteinet. Andre peptidmerkinger nyttige for rensing inkluderer, men er ikke begrenset til "HA"-merkingen, som svarer til en epitop avledet fra influensahemagglutininproteinet (Wilson *et al.*, Cell 37:767 (1984)) og "flagg"-merkingen.

5 **[00168]** Fusjonsproteiner kan fremstilles ved hjelp av metoder velkjent innen faget (se for eksempel amerikansk patent nr. 5 116 964 og 5 225 538). Det nøyaktige setet der fusjonen lages kan velges empirisk for å optimalisere sekresjonen eller bindingsegenskapene av fusjonsproteinet. DNA som koder for fusjonsproteinet transfekteres deretter inn i en vertscelle for ekspresjon.

10 **[00169]** Antistoffer ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan anvendes i ikke-konjugert form eller kan konjugeres til minst én av en rekke molekyler, *f.eks.* for å forbedre de terapeutiske egenskapene til molekylet, for å lette måldetektering, eller for bildebehandling eller behandling av en pasient. Antistoffer eller antigenbindingsfragmenter, varianter eller derivater av disse ifølge oppfinnelsen kan

15 merkes eller konjugeres enten før eller etter rensing, når rensingen er utført.

[00170] Særlig kan antistoffer eller antigenbindingsfragmenter, varianter eller derivater av disse ifølge oppfinnelsen konjugeres til terapeutiske midler, promedikamenter, peptider, proteiner, enzymer, virus, lipider, biologiske responsmodifikatorer, farmasøytiske midler eller PEG.

20 **[00171]** Konjugater som er immuntoksiner inkludert vanlige antistoffer har blitt beskrevet i stor grad innen faget. Toksinene kan kobles til antistoffene ved hjelp av konvensjonelle koblingsmetoder eller immuntoksiner som inneholder proteintoksindeler kan fremstilles som fusjonsproteiner. Antistoffene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan anvendes på tilsvarende måte for å oppnå slike

25 immuntoksiner. Illustrerende for slike immuntoksiner er de beskrevet av Byers, Seminars Cell. Biol. 2 (1991), 59-70 og av Fanger, Immunol. Today 12 (1991), 51-54.

[00172] Fusjonsproteinet som beskrives ovenfor kan også omfatte et spaltbart bindeledd eller spaltningssete for proteinaser. Disse avstandsstykkene kan etter hvert

30 være løselige eller uløselige (Diener *et al.*, Science 231 (1986), 148) og kan velges for å muliggjøre medikamentfrigivelse fra antigenet ved målsetet. Eksempler på terapeutiske midler som kan kobles til antistoffene og antigenene ifølge den foreliggende oppfinnelsen for immunterapi er medikamenter, radioisotoper, lektiner og toksiner. Medikamentene som med hvilke kan konjugeres til antistoffene og antigenene

35 ifølge den foreliggende oppfinnelsen inkluderer forbindelser som fra gammelt av er omtalt som medikamenter, som mitomycin C, daunorubicin og vinblastin. Ved hjelp av radioisotopisk konjugerte antistoffer eller antigener ifølge oppfinnelsen for eksempel immunterapi kan visse isotoper være mer fordelaktige fremfor andre, avhengig av slike faktorer som leukocyttfordeling så vel som stabilitet og emisjon.

Avhengig av den autoimmune responsen, kan enkelte emittere være fordelaktige fremfor andre. I immunterapien foretrekkes generelt α - og β -partikkelemitterende radioisotoper. A-emittere med kort rekkevidde og høy energi som for eksempel ^{212}Bi foretrekkes. Eksempler på radioisotoper som kan bindes til antistoffene eller antigenene ifølge oppfinnelsen for terapeutiske formål inkluderer, men er ikke begrenset til, ^{125}I , ^{131}I , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{64}Cu , ^{212}Bi , ^{212}At , ^{211}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd og ^{188}Re . Andre terapeutiske midler som kan kobles til bindingsmolekylet, *f.eks.* antistoff- eller antigenbindingsfragment av disse ifølge oppfinnelsen, så vel som *ex vivo*- og *in vivo*-terapeutiske protokoller, er kjente, eller kan lett konstateres av fagfolk på området. Der det er hensiktsmessig kan fagmannen på området anvende et polynukleotid ifølge oppfinnelsen som koder for ethvert av de ovenfor beskrevne antistoffene, antigenene eller de tilsvarende vektorene i stedet for det proteinholdige materialet i seg selv.

[00173] Fagfolk på området vil forstå at konjugater også kan settes sammen ved hjelp av en rekke metoder avhengig av det valgte midlet som skal konjugeres. For eksempel fremstilles konjugater med biotin *f.eks.* ved å omsette et bindingspolypeptid med en aktivert ester av biotin så som biotin-N-hydroksysuksinimidesteren. Tilsvarende kan det fremstilles konjugater med en fluorescerende markør i tilstedeværelsen av et koblingsmiddel, *f.eks.* de som er oppført i dette dokumentet, eller ved omsetning med et isotiocyanat, fortrinnsvis fluorescein-isotiocyanat. Konjugater av antistoffene eller antigenbindingsfragmentene, variantene eller derivatene av disse ifølge oppfinnelsen fremstilles på en analog måte.

[00174] Den foreliggende oppfinnelsen omfatter videre antistoffer eller antigenbindingsfragmenter, varianter eller derivater av disse ifølge oppfinnelsen konjugert til et diagnostisk eller terapeutisk middel. Antistoffene kan anvendes diagnostisk for å for eksempel overvåke utviklingen eller progresjonen av en nevrologisk sykdom som del av en klinisk testprosedyre for å *f.eks.* bestemme effekten av et gitt behandlings- og/eller forhindringsregime. Deteksjon kan lettes ved å koble antistoffet eller antigenbindingsfragmentet, varianten eller derivatet av disse til et detekterbart stoff. Eksempler på detekterbare stoffer inkluderer ulike enzymer, proteasegrupper, fluorescerende materialer, luminescerende materialer, bioluminescerende materialer, radioaktive materialer, positron-emitterende metaller ved hjelp av ulike positronemisjonstomografier og ikke-radioaktive paramagnetiske metallioner. Se *f.eks.* amerikansk patent nr. 4 741 900 for metallioner som kan konjugeres til antistoffer for anvendelse som diagnostikk ifølge den foreliggende oppfinnelsen. Eksempler på egnede enzymer inkluderer pepperrotperoksidase, alkalisk fosfatase, β -galaktosidase eller acetylkolinesterase; eksempler på egnede protetiske gruppekomplekser inkluderer streptavidin/biotin og avidin/biotin; eksempler på egnede fluorescerende materialer inkluderer umbelliferon, fluorescein, fluoresceinisotiocyanat, rodamin, diklortriazinylaminfluorescein, dansylklorid eller fykoerytrin; et eksempel på

et luminescerende materiale inkluderer luminol; eksempler på bioluminescerende materialer inkluderer luciferase, luciferin, og aequorin; og eksempler på egnede radioaktive materialer inkluderer ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In eller ^{99}Tc .

[00175] Et antistoff eller antigenbindingsfragment, en variant, eller et derivat av disse kan også merkes detekterbart ved å koble det til en kjemiluminescerende forbindelse. Tilstedeværelsen av det kjemiluminescensmerkede antistoffet bestemmes så ved å detektere tilstedeværelsen av luminescens som oppstår i løpet av en kjemisk reaksjon. Eksempler på særlig nyttige kjemiluminescerende merkingsforbindelser er luminol, isoluminol, teromatiske akridiniumester, imidazol, akridiniumsalt og oksalatester.

[00176] Én av måtene et antistoff eller antigenbindingsfragment, variant, eller derivat av disse kan merkes detekterbart er ved å binde det samme til et enzym og anvende det bundne produktet i en enzymimmunanalyse (EIA) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md., Diagnostic Horizons 2:1-7 (1978)); Voller et. al., J. Clin. Pathol. 31:507-520 (1978); Butler, J. E., Meth. Enzymol. 73:482-523 (1981); Maggio, E. (utg.), Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, E. *et al.*, (utg.), Enzyme Immunoassay, Kagaku Shoin, Tokyo (1981). Enzymet, som er bundet til antistoffet vil reagere med et hensiktsmessig substrat, fortrinnsvis et kromogent substrat, på en måte for å fremstille en kjemisk del som kan detekteres ved for eksempel spektrofotometriske, fluorimetriske eller visuelle måter. Enzymer som kan anvendes til å detekterbart merke antistoffet inkluderer, men er ikke begrenset til, malatdehydrogenase, stafylokokknuklease, delta-5-steroidisomerase, gjæralkoholdehydrogenase, alfa-glycerofosfat, dehydrogenase, triosefosfatisomerase, pepperrotperoksidase, alkalisk fosfatase, asparaginase, glukoseoksidase, beta-galaktosidase, ribonuklease, urease, katalase, glukose-6-fosfatdehydrogenase, glukoamylase og acetylkolinesterase. I tillegg kan detekteringen oppnås ved kolorimetriske metoder som benytter et kromogent substrat for enzymet. Detekteringen kan også oppnås ved visuell sammenligning av graden av enzymatisk reaksjon av et substrat sammenlignet med lignende preparerte standarder.

[00177] Detektering kan også oppnås ved hjelp av enhver av en rekke andre immunanalyser. Ved for eksempel radioaktiv merking av antistoffet eller antigenbindingsfragmentet, varianten eller derivatet av disse, er det mulig å detektere antistoffet ved hjelp av en radioimmunanalyse (RIA) (se for eksempel Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, (mars 1986)). Den radioaktive isotopen kan detekteres ved måter som inkluderer, men ikke er begrenset til, en gammateller, en scintillasjonsteller eller autoradiografi.

[00178] Et antistoff eller antigenbindingsfragment, en variant, eller et derivat av disse kan også merkes detekterbart med fluorescensemitterende metaller så som ¹⁵²Eu, eller andre metaller fra lantanid-serien. Disse metallene kan festes til antistoffet ved hjelp av metall-gelaterende grupper som dietylentriaminpentaeddiksyre (DTPA) eller etylendiamintetraeddiksyre (EDTA).

[00179] Metoder for å konjugere de ulike delene til et antistoff, eller et antigenbindingsfragment, en variant, eller et derivat av disse er velkjente, se *f.eks.* Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", i Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (utg.), s. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", i Controlled Drug Delivery (2. utg.), Robinson *et al.* (utg.), Marcel Dekker, Inc., s. 623-53 (1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", i Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (utg.), s. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", i Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (utg.), Academic Press s. 303-16 (1985) og Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62:119-58 (1982).

[00180] I visse utforminger kan det konjugeres en del som forsterker stabiliteten eller effekten av et bindingsmolekyl, *f.eks.* et bindingspolypeptid, *f.eks.* et antistoff eller fragment av disse. For eksempel i en utforming kan PEG konjugeres til bindingsmolekylene ifølge oppfinnelsen for å øke deres halveringstid *in vivo*. Leong, S.R., *et al.*, Cytokine 16:106 (2001); Adv. in Drug Deliv. Rev. 54:531 (2002); eller Weir *et al.*, Biochem. Soc. Transactions 30:512 (2002).

VII. Sammensetninger og anvendelsesmetoder

[00181] Videre vedrører den foreliggende oppfinnelsen sammensetninger omfattende det ovennevnte bindingsmolekylet, *f.eks.* antistoff- eller antigenbindingsfragment av disse ifølge den foreliggende oppfinnelsen eller kjemiske derivater av disse, eller polynukleotidet, vektor eller celle ifølge oppfinnelsen. Sammensetningen ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan ytterligere omfatte en farmasøytisk akseptabel bærer. Begrepet "kjemisk derivat" beskriver et molekyl som inneholder ytterligere kjemiske rester som vanligvis ikke er en del av basismolekylet. Slike deler kan forbedre løseligheten, halveringstiden, absorpsjonen osv. av basismolekylet. Alternativt kan delene dempe uønskede bivirkninger av basismolekylet eller redusere toksisiteten til basismolekylet. Videre kan den farmasøytiske sammensetningen ifølge den foreliggende oppfinnelsen omfatte ytterligere midler så som interleukiner eller interferoner avhengig av den tiltenkte anvendelsen av den

farmasøytiske sammensetningen. For eksempel, for anvendelse i behandlingen av Alzheimers sykdom, kan det ytterligere midlet velges fra gruppen som består av små organiske molekyler, anti-Abeta-antistoffer og kombinasjoner av disse. Derfor, i en særlig foretrukket utforming vedrører den foreliggende oppfinnelsen anvendelse av bindingsmolekylet, *f.eks.* antistoff- eller antigenbindingsfragment av disse ifølge den foreliggende oppfinnelsen eller av et bindingsmolekyl som i det vesentlige har de samme bindingsspesifisitetene av enhver av disse, polynukleotidet, vektoren eller cellen ifølge den foreliggende oppfinnelsen for fremstilling av en farmasøytisk eller diagnostisk sammensetning for behandling eller forebygging av progresjonen av Alzheimers sykdom; for lindring av symptomer forbundet med Alzheimers sykdom; for diagnostisering eller screening av et individ for tilstedeværelsen av Alzheimers sykdom eller for å bestemme et individs risiko for å utvikle Alzheimers sykdom. Den farmasøytiske sammensetningen kan utformes for å administreres intravenøst, intramuskulært, subkutant, intraperitonealt, intranasalt, parenteralt eller som en aerosol; se også nedenfor.

[00182] En særlig fordel med den terapeutiske tilnærmingen for den foreliggende oppfinnelsen ligger i det faktum at antistoffer avledet fra B-celler eller B-minneceller fra en frisk preklinisk eller klinisk uvanlig stabil organisme er, med en viss sannsynlighet, i stand til å hindre en klinisk manifestert sykdom, eller for å redusere risiko for forekomsten av en klinisk manifestert sykdom eller for å forsinke tidspunktet for forekomsten av en klinisk manifestert sykdom. Vanligvis har slike antistoffer også allerede gjennomgått vellykket somatisk modning, *dvs.* optimalisering med hensyn til selektivitet og effektivitet i den høye affinitetsbindingen til målmolekylet ved hjelp av somatisk variasjon av de variable områdene i antistoffet.

[00183] Kunnskapen om at slike celler *in vivo*, *f.eks.* i et menneske, ikke er blitt aktivert ved hjelp av forbundne eller andre fysiologiske proteiner eller cellestrukturer i betydningen av at en autoimmunologisk eller allergisk reaksjon er også av stor medisinsk betydning siden dette innebærer en betydelig økt sjanse for å kunne leve godt gjennom de kliniske testfasene. Så å si har effektivitet, akseptbarhet og toleranse allerede vært vist før den prekliniske utviklingen av det profylaktiske eller terapeutiske antistoffet hos minst ett menneske. Det kan således forventes at med en prosedyre ifølge den foreliggende oppfinnelsen øker både den målstrukturspesifikke effekten av et antistoff som terapeutisk middel og dets reduserte sannsynlighet for bivirkninger i vesentlig grad dens kliniske sannsynlighet for suksess.

[00184] Fra det foregående er det åpenbart at den foreliggende oppfinnelsen omfatter enhver anvendelse av et sykdomsspesifikt bindingsmolekyl omfattende minst ett CDR av det ovenfor beskrevne antistoffet, særlig for å diagnostisere og/eller behandle en lidelse forbundet til henholdsvis Alzheimers sykdom og Abeta-avsetning. Fortrinnsvis er bindingsmolekylet et antistoff ifølge den foreliggende oppfinnelsen

eller en immunglobulinkjede av disse. I tillegg vedrører den foreliggende oppfinnelsen anti-idiotypiske antistoffer av ethvert antistoff beskrevet i det ovenstående. Disse er antistoffer eller andre bindingsmolekyler som binder til den unike antigeniske peptidsekvensen lokalisert på et variabelt område til antistoffet nær

5 antigenbindingssetet.

[00185] I en annen utforming vedrører den foreliggende oppfinnelsen en diagnostisk sammensetning omfattende enhver av de ovenfor beskrevne bindingsmolekylene, antistoffene, antigenbindingsfragmentene, polynukleotidene, vektorene eller cellene ifølge oppfinnelsen, og eventuelt egnede midler for deteksjon så som reagenser som vanligvis anvendes i immun- eller nukleinsyrebaserte diagnostikkmetoder. Antistoffene ifølge oppfinnelsen er for eksempel egnet for anvendelse i immunanalyser der de kan anvendes i flytende fase eller bindes til en fastfasebærer. Eksempler på immunanalyser som kan anvende antistoffet ifølge oppfinnelsen er konkurrerende og ikke-konkurrerende immunanalyser i enten et direkte eller indirekte format. Eksempler på slike immunanalyser er radioimmunanalysen (RIA), sandwich (immunometrisk analyse), strømningscytometri og Western blott-analyse. Antigenene og antistoffene ifølge oppfinnelsen kan bindes til mange forskjellige bærere og anvendes til å isolere celler som spesifikt bindes dertil. Eksempler på velkjente bærere inkluderer glass, polystyren, polyvinylklorid, polypropylen, polyetylen, polykarbonat, dekstran, nylon, amyloser, naturlige og modifiserte celluloser, polyakrylamider, agaroser og magnetitt. Bæreren kan være enten løselig eller uløselig for oppfinnelsens formål. Mange forskjellige merker og merkingmetoder er kjent for fagfolk på området. Eksempler på merkingstypene som kan anvendes i den foreliggende oppfinnelsen inkluderer enzymer, radioisotoper, kolloidale metaller, fluorescerende forbindelser, kjemiluminescerende forbindelser og bioluminescerende forbindelser; se også utformingene omtalt i det foregående.

[00186] I en ytterligere utforming kan bindingsmolekylene, særlig antistoffene i henhold til den foreliggende oppfinnelsen også anvendes i en metode for diagnostisering av en lidelse hos et individ ved å oppnå en kroppsvæskeprøve fra det testede individet som kan være en blodprøve, en lymfeprøve eller annen kroppsvæskeprøve og som kommer i kontakt med kroppsvæskeprøven med et antistoff ifølge den foreliggende oppfinnelsen under betingelser som muliggjør dannelse av antistoff-antigen-komplekser. Graden av slike komplekser bestemmes deretter ved hjelp av metoder kjent innen faget, et nivå vesentlig høyere enn det som dannes i en kontrollprøve som indikerer sykdommen hos det testede individet. På samme måte kan det spesifikke antigenet bundet av antistoffene ifølge oppfinnelsen også anvendes. Således vedrører den foreliggende oppfinnelsen en *in vitro*-immunanalyse omfattende bindingsmolekylet, *f.eks.* antistoff- eller antigenbindingsfragment av disse ifølge oppfinnelsen.

[00187] I denne sammenheng vedrører den foreliggende oppfinnelsen også midler spesifikt utviklet for dette formålet. For eksempel kan det anvendes en protein- eller antistoffbasert oppstilling, som for eksempel lastes med enten antigener avledet fra det lidelsesforbundne proteinet og som inneholder neoepitopen for å detektere autoantistoffer som kan være til stede hos pasienter som lider av *f.eks.* en nevrologisk lidelse, særlig Alzheimers sykdom, eller med antistoffer eller tilsvarende antigenbindingsmolekyler ifølge den foreliggende oppfinnelsen som spesifikt gjenkjenner enhver av disse proteinene. For eksempel har antigenmikrooppstillingsprofilering av autoantistoffer ved revmatoid artritt blitt berettet av Hueber *et al.*, *Arthritis Rheum.* 52 (2005), 2645-2655. Utforming av mikrooppstillingsimmunanalyser er oppsummert i Kusnezow *et al.*, *Mol. Cell Proteomics* 5 (2006), 1681-1696. Følgelig vedrører den foreliggende oppfinnelsen også mikrooppstillinger lastet med bindingsmolekyler eller antigener identifisert i henhold til den foreliggende oppfinnelsen.

[00188] Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer også henholdsvis en/et farmasøytisk og diagnostisk pakning eller sett omfattende én eller flere beholdere fylt med én eller flere av de ovenfor beskrevne bestanddelene, *f.eks.* bindingsmolekyl, antistoff eller bindingsfragment av disse, antigen, polynukleotid, vektor eller celle ifølge den foreliggende oppfinnelsen. I forbindelse med slik(e) beholder(e) kan det foreligge et varsel i form av et brev foreskrevet av en statlig etat som regulerer fremstilling, anvendelse eller salg av medikamenter eller biologiske produkter, der varslet gjenspeiler godkjenning fra fremstillingsbyrået, anvendelse eller salg for menneskelig administrering. I tillegg eller alternativt omfatter settet reagenser og/eller instruksjoner for anvendelse i egnede diagnostiske analyser. Sammensetningen, *f.eks.* settet ifølge den foreliggende oppfinnelsen, er naturligvis særlig egnet for diagnose, forhindring og behandling av en lidelse som ledsages med tilstedeværelsen av et lidelsesforbundet protein som definert ovenfor, særlig amyloidose og særlig anvendelig for behandling av Alzheimers sykdom (AD).

[00189] Begrepene "behandling", "behandle" og lignende anvendes i dette dokumentet for generelt å bety å oppnå en ønsket farmakologisk og/eller fysiologisk effekt. Effekten kan være profylaktisk ved å fullstendig eller delvis hindre en sykdom eller symptom av disse og/eller kan være terapeutisk ved å delvis eller fullstendig helbrede en sykdom og/eller ugunstig effekt tilskrevet sykdommen. Begrepet "behandling" som anvendt i dette dokumentet dekker enhver behandling av en sykdom hos et pattedyr, særlig et menneske, og inkluderer: (a) å forhindre sykdommen fra å oppstå i et individ som kan være predisponert for sykdommen, men ennå ikke har blitt diagnostisert som å ha den; (b) hemming av sykdommen, *f.eks.* stanse utviklingen av den; eller (c) lindre sykdommen, *f.eks.* forårsake tilbakegang av sykdommen.

[00190] Videre refererer begrepet "individ" og "pasient" til et pattedyr, fortrinnsvis et menneske, med behov for behandling av en tilstand, lidelse eller sykdom.

[00191] De farmasøytiske sammensetningene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan formuleres i henhold til metoder velkjent innen faget; se for eksempel Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) av the University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472. Eksempler på egnede farmasøytiske bærere er velkjent innen faget og inkluderer fosfatbufrede saltløsninger, vann, emulsjoner, så som olje-/ vannemulsjoner, forskjellige typer fuktemidler, sterile løsninger osv. Sammensetninger omfattende slike bærere kan formuleres av velkjente konvensjonelle metoder. Disse farmasøytiske sammensetningene kan administreres til individet i en egnet dose. Administrering av de egnede sammensetningene kan utføres ved forskjellige veier, *f.eks.* ved intravenøs, intraperitoneal, subkutan, intramuskulær, topisk eller intradermal administrering. Aerosolformuleringer så som nesesprayformuleringer inkluderer rensede vandige eller andre løsninger av det aktive midlet med konserveringsmidler og isotoniske midler. Slike formuleringer justeres fortrinnsvis til en pH og isoton tilstand kompatibel med neseslimhinnene. Formuleringer for rektal eller vaginal administrering kan presenteres som en stikkpille med en egnet bærer.

[00192] Videre, mens den foreliggende oppfinnelsen inkluderer nå-standard (men heldigvis sjeldent) prosedyren for å bore et lite hull i skallen for å administrere et medikament ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan bindingsmolekylet, i et foretrukket aspekt, særlig et antistoff eller antistoffbasertmedikament ifølge den foreliggende oppfinnelsen, krysse blod-hjernebarrieren, noe som tillater intravenøs eller oral administrering.

[00193] Doseringsregimet vil bestemmes av den behandlende legen og kliniske faktorer. Som velkjent innen det medisinske faget, avhenger dosering for enhver pasient av mange faktorer, inkludert pasientens størrelse, kroppsoverflate, alder, den bestemte forbindelsen som skal administreres, kjønn, tid og administreringsvei, generell helse og andre medikamenter som administreres samtidig. En typisk dose kan for eksempel være i området fra 0,001 til 1 000 µg (eller av nukleinsyre for ekspresjon eller for hemming av ekspresjon i dette området); men det kan forespeiles doser under eller over dette eksempelområdet, særlig med tanke på de ovennevnte faktorene. Dosen kan generelt variere, *f.eks.* fra omtrent 0,0001 til 100 mg/kg, og mer vanlig 0,01 til 5 mg/kg (*f.eks.* 0,02 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg osv.), av vertskroppsvekten. Doseringene kan være for eksempel 1 mg/kg kroppsvekt eller 10 mg/kg kroppsvekt, eller innen området 1-10 mg/kg, fortrinnsvis minst 1 mg/kg. Mellomliggende doser i de ovenfor angitte områdene er også ment å være innenfor omfanget ifølge oppfinnelsen. Individet kan administreres med slike doser daglig, på

alternierende dager, ukentlig eller ifølge enhver annen plan bestemt ved empirisk analyse. Et eksempel på behandling medfører administrering i flere doser over en lengre periode, for eksempel minst seks måneder. Andre eksempler på behandlingsregimer innebærer administrering én gang annenhver uke eller én gang i måneden eller én gang hver 3. til 6. måneder. Eksempler på doseringsplaner inkluderer 1-10 mg/kg eller 15 mg/kg på påfølgende dager, 30 mg/kg annenhver dag eller 60 mg/kg ukentlig. I noen metoder administreres to eller flere monoklonale antistoffer med forskjellige bindingsspesifisiteter samtidig, i dette tilfelle faller doseringen av hvert administrerte antistoff innenfor de angitte områdene. Forløpet kan overvåkes ved periodevis evaluering. Sammensetninger for parenteral administrering inkluderer sterile vandige eller ikke-vandige løsninger, suspensjoner og emulsjoner. Eksempler på ikke-vandige løsningsmidler er propylenglykol, polyetylglykol, vegetabiliske oljer så som olivenolje og injiserbare organiske estere så som etyloleat. Vandige bærere inkluderer vann, alkoholiske/vandige løsninger, emulsjoner eller suspensjoner, inkludert saltvann og bufrede medier. Parenterale vehikler inkluderer natriumkloridløsning, Ringers dekstrose, dekstrose og natriumklorid, laktatert Ringers eller fikserte oljer. Intravenøse vehikler inkluderer væske- og næringsstofferfyllingstanker, elektrolyttfyllingstanker (*f.eks.* basert på Ringers dekstrose) og lignende. Konserveringsmidler og andre additiver kan også være til stede, så som for eksempel antimikrobielle midler, antioksidanter, gelaterende midler og inerte gasser og lignende. Videre kan den farmasøytiske sammensetningen ifølge oppfinnelsen omfatte ytterligere midler, så som dopamin eller psykofarmakologiske medikamenter, avhengig av den tiltenkte anvendelsen av den farmasøytiske sammensetningen. Videre kan den farmasøytiske sammensetningen også formuleres som en vaksine, hvis for eksempel den farmasøytiske sammensetningen ifølge oppfinnelsen omfatter et anti-A β -antistoff for passiv immunisering.

[00194] I tillegg kan samtidig administrering eller sekvensiell administrering av andre midler være ønskelig. En terapeutisk effektiv dose eller mengde refererer til den mengden av den aktive bestanddelen som er tilstrekkelig til å bedre symptomene eller tilstanden. Terapeutisk effekt og toksisitet av slike forbindelser kan bestemmes ved standard farmasøytiske prosedyrer i cellekulturer eller forsøksdyr, *f.eks.* ED₅₀ (dosen er terapeutisk effektiv hos 50 % av befolkningen) og LD₅₀ (dosen er dødelig for 50 % av befolkningen). Den terapeutiske indeksen er doseforholdet mellom terapeutiske og giftige effekter, og den kan uttrykkes som forholdet LD₅₀/ED₅₀. Det terapeutiske midlet i sammensetningen er fortrinnsvis til stede i en mengde tilstrekkelig til å gjenopprette normal atferd og/eller kognitive egenskaper i tilfelle av Alzheimers sykdom.

[00195] Disse og andre utforminger er offentliggjort og omfattet av beskrivelsen og eksemplene ifølge den foreliggende oppfinnelsen. Ytterligere litteratur

som angår ethvert av materialene, metodene, anvendelsene og forbindelsene som skal benyttes i henhold til den foreliggende oppfinnelsen kan gjenvinnes fra offentlige biblioteker og databaser, ved hjelp av for eksempel elektroniske enheter. For eksempel kan den offentlige databasen "Medline" anvendes, som vertes av National Center for
 5 Biotechnology Information og/eller National Library of Medicine ved National Institutes of Health. Ytterligere databaser og web-adresser, så som de i det europeiske instituttet for bioinformatikk (EBI), som er en del av European Molecular Biology Laboratory (EMBL) er kjent for fagpersonen på området, og kan også oppnås ved hjelp av internettsøkemotorer. En oversikt over patentinformasjon i bioteknologi og en
 10 oversikt over relevante kilder for patentinformasjon nyttig for retrospektive søk og for nåværende bevissthet er gitt i Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364.

[00196] Offentliggjøringen ovenfor beskriver generelt den foreliggende oppfinnelsen. Med mindre annet er angitt har et begrep som anvendes i dette dokumentet definisjonen tilveiebrakt i Oxford Dictionary of Biochemistry and
 15 Molecular Biology, Oxford University Press, 1997, revidert 2000 og gjengitt 2003, ISBN 0 19 850673 2. Flere dokumenter er sitert gjennom teksten i denne beskrivelsen. Fullstendige bibliografiske siteringer kan finnes ved slutten av beskrivelsen umiddelbart før kravene.

[00197] En mer fullstendig forståelse kan oppnås ved referanse til de følgende spesifikke eksemplene som er tilveiebrakt i dette dokumentet for illustrasjonsformål og
 20 er ikke ment å begrense omfanget av oppfinnelsen.

EKSEMPLER

[00198] Eksemplene som følger illustrerer oppfinnelsen ytterligere, men skal ikke tolkes som å begrense omfanget av oppfinnelsen på noen måte. Detaljerte beskrivelser av vanlige metoder, så som de som benyttes i dette dokumentet kan finnes i den siterte litteraturen; se også "The Merck Manual of Diagnosis and Therapy", 17. utgave av Beers og Berkow (Merck & Co, Inc. 2003).

[00199] Utøvelsen av den foreliggende oppfinnelsen vil benytte, dersom ikke annet er angitt, vanlige metoder for cellebiologi, cellekultur, molekylærbiologi, transgen biologi, mikrobiologi, rekombinant DNA og immunologi, som er innenfor teknikkens stand. For nærmere utdypning av de generelle metodene nyttige ved utøvelsen av denne oppfinnelsen, kan den praktiserende legen henvise til standard
 35 lærebøker og referat i cellebiologi og vevskultur; se også referansene sitert i eksemplene. Generelle metoder i molekylær og cellulær biokjemi kan finnes i slike standard lærebøker som Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3. utg. (Sambrook *et al.*, Harbor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4. utg. (Ausubel *et al.* utg., John Wiley & Sons 1999); DNA Cloning, bind I og II (Glover

utg., 1985); Oligonucleotide Synthesis (Gait utg., 1984); Nucleic Acid Hybridization (Hames and Higgins utg. 1984); Transcription And Translation (Hames and Higgins utg. 1984); Culture Of Animal Cells (Freshney and Alan, Liss, Inc., 1987); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller and Calos, utg.); Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 3. utg. utgave (Ausubel *et al.*, utg.); og Recombinant DNA Methodology (Wu, utg., Academic Press). Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (Miller and Calos, utg., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, bind. 154 og 155 (Wu *et al.*, utg.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); avhandlingen, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, utg., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, bind I-IV (Weir and Blackwell, utg., 1986). Protein Methods (Bollag *et al.*, John Wiley & Sons 1996); Non-viral Vectors for Gene Therapy (Wagner *et al.* utg., Academic Press 1999); Viral Vectors (Kaplitt & Loewy utg., Academic Press 1995); Immunology Methods Manual (Lefkovits utg., Academic Press 1997); og Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998). Reagenser, kloningsvektorer og sett for genetisk manipulering referert til i denne offentliggjøringen er tilgjengelig fra kommersielle leverandører som BioRad, Stratagene, Invitrogen, Sigma-Aldrich, og ClonTech. Generelle metoder i cellekultur og mediasamling er skissert i Large Scale Mammalian Cell Culture (Hu *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol. 8 (1997), 148); Serum-free Media (Kitano, Biotechnology 17 (1991), 73); Large Scale Mammalian Cell Culture (Curr. Opin. Biotechnol. 2 (1991), 375); og Suspension Culture of Mammalian Cells (Birch *et al.*, Bioprocess Technol. 19 (1990), 251); Extracting information from cDNA arrays, Herzel *et al.*, CHAOS 11 (2001), 98-107.

[00200] De følgende eksperimentene er illustrert og beskrevet med hensyn til antistoffet NI-101.11. Imidlertid er antistoffet NI 101.10 strukturelt likt og kan således forventes å tilveiebringe sammenlignbare resultater.

Supplerende metoder

ELISA

[00201] 96-brønners mikroplater med halvparten så stort overflateareal som vanlig. (Corning) ble belagt med syntetisk Abeta-peptid i en standard konsentrasjon på 1 µg/ml i beleggbuffer (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9,42) over natten ved 4 °C. Platene ble vasket og ikke-spesifikke bindingssteder ble blokkert i 1 t ved RT med PBS inneholdende 2 % BSA (Sigma, Buchs, Sveits). B-cellekondisjonert medium ble

overført fra dyrkingsplater for B-minneceller til ELISA-plater og ble inkubert i 2 timer ved romtemperatur. Binding av humane antistoffer ble bestemt ved hjelp av pepperrotperoksidase (HRP)-konjugert polyklonale anti-humane IgG-antistoffer fra esler (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Cambridgeshire, UK), etterfulgt av måling av HRP-aktiviteten i en standard kolorimetrisk analyse.

Molekylær kloning av antistoffer som fremviser spesifisitet av interesse

[00202] Levende B-celler fra utvalgte B-minnecellekulturer høstes ved hjelp av en celledortorer. Det fremstilles mRNA og tunge og lette immunglobulinsekvenser oppnås ved hjelp av Ig-rammespesifikke primere for alle humane variable tung- og lett kjederamme 1-familie (FR1) som 5'-primere i kombinasjon med primere spesifikke for alle humane J-H-segmenter som 3'-primere (Marks *et al.*, Mol. Biol. 222 (1991), 581-597). Alternativt kan enkelt-celle RT-PCR av enkelt-sorterte celler fra minne-B-cellekulturen anvendes som kilde for Ig-tunge- og lette kjedesequens (Babcock *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996), 7843-7848; Brezinschek *et al.*, J. Immunol. 155 (1995), 190-202; Coronella *et al.*, Nucleic Acids Research 28 (2000); Owens, *et al.*, J. Immunol. 171 (2003), 2725-2733).

Enkeltcelledortering bevarer den korrekte sammenkoblingen av tunge og lette immunglobulinkjeder av antistoffklonene naturlig fremstilt i B-cellekulturen.

[00203] Identifisering av antistoffklonen med den ønskede spesifisiteten utføres ved re-screening på mikrotiter-kompatibel vevmikrooppstilling og ELISA ved rekombinant ekspresjon av komplette antistoffer. Rekombinant ekspresjon av komplette IgG1- antistoffer oppnås ved innføring av de variable tunge og lette kjedesequensene i den korrekte leserammen inn i ekspresjonsvektorer som komplementerer den variable områdesequensen med en sekvens som koder for et signalpeptid ved 5'-primerenden og ved 3'-enden med en sekvens som koder for de(n) hensiktsmessig konstante domene(ne). For dette formålet inneholdt primerne restriksjonssteder utviklet for å lette kloning av de variable tunge og lette kjedesequensene i antistoffekspresjonsvektorene. Tungt kjedeimmunglobulin uttrykkes ved å sette det tunge immunglobulinkjede RT-PCR-produktet i ramme inn i en tung kjedeekspresjonsvektor som bærer et signalpeptid og de konstante domenene av det humane immunglobulinet. Lett kappa-immunglobulin uttrykkes ved å sette den RT-PCR-fremstilte lett kappa-kjeden i ramme inn i en uttrykkingsvektor for den lette kjeden som tilveiebringer et signalpeptid og det konstante domenet 1 av human-kappa-lett kjedeimmunglobulin. Alternativt uttrykkes det lette lambda-immunglobulinet ved å sette den RT-PCR-fremstilte lett lambda-kjeden i ramme i en uttrykkingsvektor for den lette lambda-kjeden som tilveiebringer et signalpeptid og det konstante domenet 1 av humant lett lambda-immunglobulin.

[00204] Funksjonelle rekombinante monoklonale antistoffer oppnås ved co-transfeksjon i HEK 293-celler (eller enhver annen egnet mottakercellelinje) av en Ig-tung kjedeekspresjonsvektor og en kappa- eller lambda-Ig-lett kjedeekspresjonsvektor. Rekombinant humant monoklonalt antistoff blir deretter rensset fra det kondisjonerte mediet ved anvendelse av en standard protein A-kolonnerensing. Rekombinant humant monoklonalt antistoff kan fremstilles i ubegrensede mengder ved hjelp av enten forbigående eller stabilt transfekterte celler. Cellelinjer som fremstiller rekombinant humant monoklonalt antistoff kan etableres enten ved hjelp av Ig-ekspresjonsvektorene direkte eller ved re-kloning av Ig-variable områder i forskjellige ekspresjonsvektorer. Derivater så som F(ab), F(ab)₂ og scFv kan også genereres fra disse Ig-variable områdene.

Eksperimentell protokoll:

Masse-RT-PCR av B-celler

[00205] Levende celler som identifisert av deres fremmad- og sideveis-lysspredingsegenskaper av utvalgte minne B-cellekulturer ble sortert i porsjoner på 100-2 000 celler direkte i 0,2 ml PCR-rør fylt med 20 µl RNAlater (Ambion, Huntingdon, UK) ved hjelp av en MoFlo-cellesorter. mRNA ble fremstilt ved anvendelse av mRNA-Direct Micro Kit (Dyna, Invitrogen, Basel, Sveits). cDNA ble fremstilt ved hjelp av "RT for PCR"-settet (Clontech BectonDickinson, Basel, Sveits) og PCR av immunglobulin (Ig) tung- og lettkjedevariable sekvenser ble utført ved anvendelse av Advantage 2 PCR-setet (Clontech) ved hjelp av spesifikke primere for alle humane variable tung- og lettkjederamme 1 (FR1) familier som 5'-primere i kombinasjon med primere spesifikke for de konstante domenene av humant tungt Ig eller lett kappa- eller lambda-Ig som 3'-primere. Primere ble kjøpt fra Microsynth (Balgach, Sveits).

[00206] Et signalpeptid som ble anvendt i alle ekspresjonsvektorene ble avledet fra den lette humane kappa immunglobulinkjedefamilien 1 L5-sekvensen (MDMRVPAQLLGLLLWFPGSRC, SEQ ID NR: 2), som beskrevet ved V-base og utformet for å tilveiebringe Xba 1-restriksjonssetet for å lette kloningen av de PCR-forsterkede variable områdene (ATGGACATGCGGGTGCCCGCCCAGCTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGTTCCCGGCTCTAGATGC; SEQ ID NR: 1). Xba1 ble introdusert ved stille mutagenese. Som et 3'-restriksjonssete anvendt for kloning av variable tunge kjedeområder ble Sal1-restriksjonssetet innført i C1 av IgG1 tilveiebrakt av vektoren. Tilsvarende ble restriksjonssetet BsiW1 innført i C1 av kappa-lettkjeden og Xho1 ble innført i C1 av lambda-lettkjeden. Restriksjonsdigerering av PCR-produktene og sammenbinding til

mottakervektorene ble utført i henhold til standard prosedyrer. Plasmid DNA ble fremstilt ved hjelp av standardsett (Quiagen, Hombrechtikon, Sveits). Mottakervektorene inneholdt en CMV-promotor for ekspresjon av antistoffgener i pattedyrceller.

5

Ekspresjon av funksjonelle rekombinante monoklonale antistoffer

[00207] Antistoffene kan fremstilles i tilstrekkelige mengder ved rekombinant ekspresjon ved anvendelse av teknologier kjent innen faget (Trill *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol. 6 (1995), 553-601). Rekombinant humant monoklonalt antistoff opptil 1 mg ble fremstilt ved transient transfeksjon av HEK 293-celler. Rekombinant humant monoklonalt antistoff opptil 100 mg ble fremstilt ved stabil transduksjon av HEK 293-celler eller de murine NSO-cellene ved anvendelse av rekombinante lentivirale vektorer.

15

Småskalafremstilling av humant rekombinant antistoff ved forbigående transfeksjon

[00208] Ig-tung kjedevektor- og Ig-lett kjedevektorene ble co-transfektet inn i HEK 293-celler ved hjelp av standardkalsiumfosfat-co-presipiteringsmetoden. De rekombinante antistoffene ble rensset fra medium kondisjonert med transfektete HEK 293-celler ved hjelp av protein A-kolonnerensing (GE-Healthcare, Otelfingen, Sveits).

20

Storskalafremstilling av humant rekombinant antistoff ved stabil transduksjon

[00209] Her ble et lentivirus-basert transfeksjonssystem benyttet for å generere stabilt transduserte cellelinjer som fremstiller humant rekombinant antistoff (Zufferey *et al.*, J. Virol. 72. (1998), 9873-9880). HEK 293-celler ble co-transdusert med to distinkte lentivektorer der den ene bærer en ekspresjonskassett for Ig-tungkjeden og den andre en kassett for Ig-lettkjeden av et rekombinant antistoff. Denne transduksjonsmetoden kan anvendes i et bredt utvalg av pattedyrcellelinjer, som *f.eks.* CHO- og NSO-celler.

25

30

Validering i transgene musmodeller av sykdommer hos mennesker

[00210] Transgene mus ble generert som tidligere beskrevet (Knobloch *et al.*, Neurobiol. Aging 28. juli (2006)) på en hybrid bakgrunn av C57Bl/6 og DBA2. Testgruppen ble kryssset tilbake en gang til C57Bl/6. Musene ble holdt under standard levestandard med reversert 12t:12t lys/mørkesyklus og hadde fri tilgang til mat og vann.

35

Behandlingsgruppene ble balansert for alder (24 måneder ved første testing, 26 måneder ved andre testing) og kjønn. Musene behandles med antistoffer (3 mg/kg kroppsvekt) ved intraperitoneale injeksjoner én gang i uken over et tidsrom på 2 måneder som resulterer i 8 injeksjoner per dyr.

5

Atferdstesting i Y-labyrinten

[00211] Den spontane alterneringsfrekvensen vurderes ved hjelp av en Y-formet plastlabyrint, med 40 cm x 20 cm x 10 cm armstørrelser. Under 5 minutters øktene registreres rekkefølgen av gangvalget; alternering ble definert som etterfølgende valg av de tre gangene i labyrinten, i overlappende trippelsett. Den prosentvise vekslingen ble beregnet som forholdet mellom faktiske og mulige vekslinger. Etter 2 måneders antistoffbehandling ble musene testet i Y-labyrinten. Forskerne holdes alltid blinde for begge behandlingene og genotypene under hele forsøket.

15

Blod-hjernebarrierepenetrering og binding til unormale strukturer i hjernen

[00212] For å vurdere om de valgte antistoffene eller fragmentene av disse kan trenge gjennom blod-hjernebarrieren og binde til sine unormalt aggregerte eller konformasjonelt endrede proteinmål i hjernen, administreres en effektiv dose av antistoffet systemisk, intraperitonealt, intravenøst, intramuskulært, subkutant eller intranasalt til et transgent dyr som er karakterisert ved ufysiologisk akkumulering av det aggregerte eller konformasjonelt endrede proteinmålet i hjernen. Binding av antistoffet til de patologisk spesifikke strukturene i hjernen evalueres deretter ved immunfarging med et merket anti-humant Ig-sekundært antistoff etterfulgt av standard immunhistokjemisk detektering.

25

Ekspérimentell protokoll:

[00213] Den PS-1/APPswe-transgene musemodellen for Alzheimers sykdom fikk to perifere injeksjoner av 150 µg NI-101.11 på dag 1 og dag 3. Musene ble avlivet 24 timer etter den andre injeksjonen og perfusert med PBS. Hjernene ble frosset og vevsbiter ble fremstilt av frosset vev ved hjelp av et kryotom. Tilstedeværelse av humant antistoff på kryostatseksjonene ble analysert ved farging med Cy3-merket anti-humant IgG-antistoff (Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, UK). Lokalisering av amyloid plakk ble utført ved å co-farge kryostatseksjonene med det murine Ap-spesifikke kontrollantistoffet 6E10 (tilgjengelig fra Covance, katalognummer SIG-39320) etterfulgt av FITC-merket antimus IgG-antistoff. Alternativt ble farging med

35

Cy3-merket anti-humant IgG-antistoff anvendt alene. Fluorescensanalysen ble utført på et omvendt fluorescensmikroskop (Leica).

Reduksjon av hjernepatologien

[00214] Effektene av antistoffbehandling på nivåene av aggregerte eller konformasjonelt endrede proteinmål i hjernen vurderes ved systemisk behandling eller målrettet hjernelevering av antistoffet (intrakranial, intratekal eller intraventrikulær) og en urelatert antistoffkontroll til transgene dyr med karakteristisk ikke-fysiologisk akkumulering av det aggregerte eller konformasjonelt endrede proteinmålet i hjernen. Behandlingseffektene evalueres ved immunfarging eller histokjemisk farging av de endrede eller aggregerte proteinmålene og å måle arealet som dekkes av slike aggregater, aggregatstørrelse og aggregatantall og biokjemisk kvantifisering av konsentrasjonene av proteinmålene i forskjellige hjerneområder.

Fravær av antistoff-behandlingsrelaterte bivirkninger

[00215] Potensielle målrelaterte negative effekter av antistoffbehandling vil bli vurdert av systemisk administrering eller målrettet hjernelevering av antistoffet (intrakranial, intratekal eller intraventrikulær) og en urelatert antistoffkontroll mot transgene dyr med karakteristisk ufysiologisk akkumulering av det aggregerte eller konformasjonelt endrede proteinmålet i hjernen. Potensielle bivirkninger vil bli vurdert av immunfarging eller histokjemisk farging (*f.eks.* prøyssisk blå for mikrobldninger, hematoksilin-eosin, aktiverte hvite blodlegemer) og biokjemisk kvantifisering (*f.eks.* cytokinnivåer ved ELISA).

Immunfluorescensfarging av levende celler

[00216] HEK 293-celler ble forbigående transfektert med en vektor som uttrykker naturlig humant APP fusert på den intracellulære C-terminalen til den gule fluorescerende proteinvarianten citrin. 24 timer etter transfeksjon ble cellene inkubert med humane rekombinante antistoffer eller kontrollantistoffer ved 4 °C i 30 minutter. Etter vasketrinnet ble cellen fiksert og overflatebundet antistoff ble detektert ved hjelp av Cy-3-merket sekundære antistoffer mot human eller muse IgG (Jackson ImmunoResearch). Fluorescensanalyse ble utført på et konfokalmikroskop (Leica).

Fremstilling av Abeta-fibriller

[00217] Abetapeptid ble kjøpt fra Bachem (Bubendorf, Sveits). Lyofilisert peptid ble rekonstituert i TFA og resuspendert i PBS umiddelbart før dens anvendelse som monomerisk Abeta i analysene. Abeta-fibrillene ble fremstilt ved inkubering av monomerisk Abeta1-42-peptid ved en konsentrasjon på 100 µg/ml i PBS ved 37 °C i 24 t. De monomeriske Abeta-peptid- og fibrilsammensetningene ble også anvendt som substrat for å belegge ELISA-platene.

Western blotting

[00218] Monomerisk Abeta-peptid ble blandet med lastfargestoff, varmedenaturert og 0,2 µg ble lastet per felt og separert på en SDS-gradient-PAGE. Blott ble inkubert med primærantistoff i 2 t. Binding av primært humant monoklonalt antistoff eller musekontrollantistoff 6E10 ble avdekket ved hjelp av sekundære anti-humane- eller anti-museantistoffer konjugert med pepperrotperoksidase (HRP). Blott ble utviklet ved hjelp av SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce, Fisher Scientific, Wohlen, Sveits).

Konkurranse av vevamyloidplakkbinding

[00219] Det rekombinante humane NI-101.11-antistoffet ble inkubert i 2 timer med Abeta-peptidsammensetningene. Antistoffet/Abeta-sammensetningene ble deretter anvendt for immunhistokjemisk farging av hjerneseksjon oppnådd fra en pasient med nevropatologisk bekreftet Alzheimers sykdom. 5 µm kryo-seksjoner ble fremstilt, blokkert med 4 % BSA, 5 % geiteserum og 5 % hesteserum i PBS i 1 t ved RT og farget med NI-101.11/Abeta-sammensetninger i 1 t ved romtemperatur. Etter vasketrinnet ble bindingen av humane antistoffer til vevseksjonene analysert ved hjelp av Cy3-konjugerte sekundære antistoffer mot humant IgG (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd). Fluorescensanalyse ble utført på et invertert fluorescensmikroskop (Leica, Heerbrugg, Sveits).

Eksempel 1

Detektering av humane antistoffer mot unormale strukturer som er utbredt i hjernesykdommer hos mennesker

[00220] Antistoffer fra fenotypisk friske individer, eller klinisk uvanlig stabile pasienter med Alzheimers sykdom ble testet ved immunhistokjemi på hjerneseksjoner oppnådd fra pasienter med patologisk bekreftet Alzheimers sykdom. Fig. 1A viser tilstedeværelsen av antistoffer hos en klinisk uvanlig stabil pasient som binder til beta-amyloidplakk som ble bekreftet ved co-farging med et kjent antistoff mot humant β-

amyloid (antistoff 4G8; fig 1B). Tilstedeværelsen i et friskt menneske av antistoffer mot nevrofibrillære floker i en vevsseksjon oppnådd fra en pasient med Alzheimers sykdom er vist i figur 2A. Dette resultatet ble bekreftet ved co-farging med et kjent antistoff mot humant tau (HT7). Figur 3A viser tilstedeværelsen i et sunt menneske av antistoffer mot dystrofiske neuritter i en vevsseksjon oppnådd fra en pasient med Alzheimers sykdom. Kontrollfarging med kjent antistoff mot humant tau (HT7) er avbildet i figur 3B. Disse resultatene viser tilstedeværelsen i fenotypisk friske, eller klinisk uvanlig stabile pasienter med antistoffer mot identifiserbare patologiske strukturer i humane vevsprøver med histopatologisk bekreftede diagnoser.

Eksempel 2

Rekombinante humane antistoffer opprettholder spesifisiteten mot unormal struktur *in vivo* og gjenkjenner konformasjonsepitopen av sykdomsforbundet beta-amyloidprotein i hjerneamyloidplakk, men ikke den fysiologiske forløperen eller den ikke-patogene avsetningen av dette

[00221] Antistoff NI-101.11 ble oppnådd fra pasienter med klinisk uvanlig stabil Alzheimers sykdom med en vesentlig redusert grad av kognitiv svikt.

Antistoffisolering og rekombinant fremstilling ble utført som spesifisert i supplerende metoder.

NI-101.11

[00222] Rekombinant NI-101.11 ble testet for binding til beta-amyloid hjerneplakk (fig. 4). Hjerneseksjoner oppnådd fra en pasient med nevropatologisk bekreftet Alzheimers sykdom ble farget på de angitte konsentrasjonene. Antistoffbinding til beta-amyloidplakk med konsentrasjoner på 50 pM antyder høy affinitetsbinding. Bindingen av antistoff NI-101.11 til beta-amyloidplakk i en konsentrasjon på 0,5 nM kan ikke utkonkurreres ved tilsetning av overskytende mengder lineært syntetisk N-terminalt Abeta-avledet polypeptid som representerer posisjonene 1 til 16 i konsentrasjoner på opptil 1 µM (fig. 5). Videre konkurrerer overskudd av Abeta1-42-fibriller (4 µM) med bindingen av NI-101.11 til beta-amyloidplakk på hjerneseksjoner ved 8 nM konsentrasjon, men ikke lineære syntetiske Abeta1-42-monomerer ved 4 µM konsentrasjon, noe som tyder på at NI-101.11 gjenkjenner en konformasjonsepitop som ikke er til stede i monomerisk Abeta (fig. 6).

[00223] For ytterligere å vurdere binding av humant rekombinant NI-101.11-antistoff mot lineær, monomerisk syntetisk Abeta ble sammensetningene av

monomerisk Abeta separert av ikke-denaturerende PAGE. Blottet protein ble analysert med humant rekombinant NI-101.11-antistoff og et kontrollantistoff mot N-terminale lineære Abeta-sekvenser (6E10). Mens 6E10 ga fremtredende farging av monomerisk Abeta-peptid, ble ingen binding detektert for humant NI-101.11 som tyder på at NI-101.11 ikke binder til det lineære monomeriske Abeta-peptidet, men gjenkjenner en konformasjonell Abeta-epitop. (fig. 7)

[00224] Bindingen av rekombinant NI-101.11 til kunstige amyloide fibriller fremstilt av syntetiske Abeta1-42-peptider og monomerisk Abeta ble bestemt ved ELISA (fig. 8). Syntetiske Abeta-fibriller eller monomerisk syntetisk Abeta belagt på ELISA-plater ved like beleggstettheter ble inkubert med NI-101.11 i de angitte konsentrasjonene. Binding til kunstige amyloide fibriller (åpne kvadrater) er mer enn 100 ganger høyere i forhold til monomerisk Abeta (fylte kvadrater). Kontrollantistoff 22C4 mot C-enden av Abeta bindes fortrinnsvis til monomerisk Abeta (fylte sirkler), og mindre bra til fibriller (åpne sirkler). Dette tyder på at NI-101-10 gjenkjenner en konformasjonell epitop som også er til stede på kunstige amyloide fibriller fremstilt av syntetiske Abeta-peptider.

[00225] Kryssreaktivitet av rekombinant humant NI-101.11-antistoff mot cellulær full-lengde APP eller med enhver av dens fysiologiske derivater ble bestemt ved cellebindingsanalyser (fig. 9).

[00226] Levende HEK 293-celler som stabilt uttrykker humant APP fusjonert til citrin som en markør ble inkubert i 30 min ved 4 °C for å hindre internalisering med det rekombinante humane antistoffet NI-101.11 eller kontrollantistoffet 6E10 mot N-terminal lineær Abeta-sekvens. Citrin-positive signaler tyder på APP-uttrykkende celler. I motsetning til kontrollantistoffet (6E10) som binder til APP på celleoverflaten i alle celler som uttrykker fusjonskonstruktet detekteres ingen binding av det rekombinante humane NI-101.11-antistoffet til APP av full lengde. Disse dataene viser fraværende kryssreaktivitet av NI-101.11 til fysiologisk, cellulær APP.

[00227] Mangelen på binding av NI-101.11 til monomerisk Abeta ble ytterligere vist av størrelsesutelukkende kromatografi: Ingen binding av NI-101.11 eller et urelatert kontrollantistoff ble observert for monomerisk FITC-merket Abeta1-42 (fig. 10A, 10B). Derimot ble antistoffet 22C4 mot en lineær epitop i C-enden av Abeta eluert sammen med FITC-Abeta1-42-monomerene (fig. 10 C).

[00228] I en konkurranse-ELISA kunne binding av 6E10, et antistoff rettet mot en lineær epitop ved N-terminus av Abeta fullstendig blokkeres ved pre-inkubering med overskytende konsentrasjoner av monomeriske Abeta1-16-, Abeta1-28- og Abeta1-40-peptider. Derimot avskaffet ikke pre-inkubasjon med overflødige konsentrasjoner av lineære Abeta-peptider NI-101.11-binding, noe som tyder på at NI-101.11 krever en konformasjonell epitop (fig. 11).

Eksempel 3

Rekombinant humant antistoff mot beta-amyloid i hjernen krysser blodhjernebarrieren i en transgen musemodell med Alzheimers sykdom og binder beta-amyloidplakk i hjernen *in vivo*

[00229] For å avgjøre om rekombinant humant NI-101.11-antistoff krysser blodhjernebarrieren og binder beta-amyloidplakk i hjernen *in vivo*, mottok transgene PS-1/APPswe modellmus for Alzheimers sykdom to perifere injeksjoner av 150 µg NI-101.11 på dag 1 og dag 3. Musene ble avlivet 24 timer etter den andre injeksjonen og perfusert med PBS. Hjernene ble høstet og hjerneseksjoner ble farget med FITC-merkede antistoffer mot humant IgG eller med musemonoklonalt Abeta-antistoff 6E10 etterfulgt av et FITC-merket antistoff mot muse IgG for å bekrefte tilstedeværelsen av beta-amyloidplakk i hjernen. Intens farging av amyloid plakk med anti-humant IgG indikerte at det rekombinante humane NI-101.11-antistoffet kan krysse blodhjernebarrieren av transgene mus og binde til beta-amyloidplakk i hjernen i levende dyr (fig. 15).

Eksempel 4

Rekombinant humant antistoff mot beta-amyloid forbedrer unormal kognitiv atferd og gir reduksjon av beta-amyloidplakkbelastning, astrogliose og mikrogliose i en transgen musemodell av Alzheimers sykdom uten å øke frekvensen av mikroblødninger.

[00230] 24 måneder gamle arcAbeta-mus og kullsøsken av naturlige mus med tilsvarende alder ble behandlet ukentlig i.p. med 3 mg/kg rekombinant humant NI-101.11-antistoff eller et humant kontrollantistoff med tilsvarende isotype i 2 måneder. For å vurdere behandlingseffekten på unormal atferd i de transgene musene ble Y-labyrintatferdsmessig testing utført før og etter behandlingen. Hyppigheten av alterneringen ble vurdert ved hjelp av en Y-formet plastlabyrint med 40 cm x 20 cm x 10 cm armstørrelser. I løpet av 5 minutters øktene ble sekvensene av armoppføringer registrert; veksling ble definert som etterfølgende oppføringer i de tre gangene i labyrinten, i overlappende trippelsett. Den prosentvise endringen ble beregnet som forholdet mellom faktiske til mulige vekslinger (definert som det totale antallet armoppføringer - 2) multiplisert med 100 %. Y-labyrintutførelsen av ubehandlede arcAbeta-mus og kullsøsken av naturlige musekontroller ble sammenlignet ved hjelp av en uparet t-test. Den ikke-parametriske Kruskal-Wallis-testen ble anvendt til å sammenligne forbedringen etter behandling i alle 4 gruppene. Den ikke-parametriske Mann-Whitney U-testen ble valgt for parvis sammenligning av de ulike gruppene.

Null-utøvere (*dvs.* mus som ikke forlot gangen i labyrinten de ble plassert i) ble utelukket fra analysen.

[00231] Som det ble observert i tidligere studier, ble ubehandlede 24-måneder gamle arcAbeta-mus betydelig svekket i forhold til sine kullsøsken av naturlige mus (fig. 16A, før behandling, uparet t-test, $p = 0,0007$).

[00232] NI-101.11-behandlede arcAbeta-mus viste tydelig forbedrede endringsnivåer sammenlignbare med NI-101.11-behandlede naturlige kontrollmus etter 2 måneders behandling. Analyse av forbedringen (*dvs.* ytelse etter behandling minus ytelse før behandling) viste en signifikant forskjell mellom de fire gruppene (fig. 16 B, Kruskal-Wallis-test; $p = 0,03$). En par-messig post-hoc-analyse mellom alle gruppene viste at NI-101.11-behandlede arcAbeta-mus forbedret sin kognitive ytelse betraktelig mer enn naturlige mus (Mann-Whitney U; $p = 0,05$ NI-101.11 tg vs. NI-101.11 wt; $p = 0,008$ NI-101.11 tg vs. kontroll wt). Denne musegruppen viste også en sterk tendens til bedre prestasjoner enn de kontrollantistoffbehandlede transgene kullsøsknene (Mann-Whitney-U; $p = 0,08$ NI-101.11 tg vs. kontroll tg). Alle musene viste en $\sim 10\%$ forbedring i ytelse i re-testingen, som var sannsynlig på grunn av det kjente miljøet i oppgaven.

[00233] Effektene av kronisk, 2 måneders NI-101.11-behandling på amyloid byrde, astrogliose og mikrogliose ble analysert ved kvantitativ histokjemisk og immunhistokjemisk analyse. For dette formålet ble mus avlivet etter at de hadde gjennomført atferdtesting og perfundert transkardialt med PBS. Den ene hjernehalvdelen ble fiksert i 4 % paraformaldehyd og innstøpt i parafin. 5 μm sagittale seksjoner ble kuttet med en Leica RM 2135 mikrotom (Bannockburn, Illinois). Beta-amyloidplakkbelastning i korteks og hippocampus ble kvantifisert på hjerneseksjoner farget med Thioflavin S og Congo Red i henhold til standard protokoll. For immunhistokjemi ble skivene avvokset, blokkert med 4 % BSA, 5 % geiteserum og 5 % hesteserum i PBS i 1 t ved RT. Antistoffene ble inkubert over natten ved 4 °C ved hjelp av følgende fortynninger: anti GFAP (Advanced Immunochemicals) 1:500, anti IBA1 (WAKO) 1:500. Antistoffer bundet til 2. fluorofores ble inkubert ved RT i 2 timer. Det ble anvendt 2–3 seksjoner per musehjerne med 75 μm avstand fra hverandre for hver farging. Det ble tatt 2 bilder per seksjon ved 10 x forstørrelse for korteksanalyse (parietal og frontal region). Hele hippocampusområdet (5 x forstørrelse beskåret til det interessante området) ble tatt for hippocampusanalyse. Automatisert bildeanalyse ble gjort med programvaren ImageJ.

[00234] Dobbelfarging av hjerneseksjoner fra immuniserte arcAbeta-mus med 6E10 og anti-human IgG avdekket binding av NI-101.11 til Abeta-avsetninger (fig. 17, venstre panel), noe som indikerer at NI-101.11 kan krysse blodhjernebarrieren og binde til beta-amyloidplakk i hjernen. Ingen slik binding av humant antistoff mot Abeta-avsetninger ble sett i antistoffkontrollbehandlede arcAbeta-mus (fig. 17 høyre panel).

[00235] [0317] Kronisk behandling med 3 mg/kg NI-101.11 resulterte i en betydelig reduksjon av amyloidplakkbelastning som ble avdekket av Thioflavin S og Congo Red-farging. Reduksjonen nådde nivåer større enn 50 % i korteks og hippocampus sammenlignet med kontroll-antistoff-behandlede arcAbeta mus (fig. 18 A, B). I tillegg
 5 til plakkområdet (fig. 18 C), ble det også observert signifikante reduksjoner for plakkantallet (fig. 18 D), og den gjennomsnittlige plakkstørrelsen (fig. 18 E).

[00236] For å teste om kronisk behandling med NI-101.11 påvirker den nevroinflammatoriske responsen i arcAbeta-mus ble reaktive astrocytter og mikroglia kvantifisert etter immunhistologisk farging. En reduksjon i antallet reaktive astrocytter
 10 (anti GFAP-farging) ble observert i korteks av NI-101.11-behandlede arcAbeta-mus sammenlignet med kontrollantistoffbehandlede dyr (fig. 19A; Mann-Whitney-U; $p = 0,047$). Ingen endring ble detektert i hippocampus. Farging med et antistoff mot en markør for mikroglia og makrofager (anti-Iba1) avdekket også en statistisk tendens til redusert betennelse (fig. 19 B; Mann-Whitney-U; $p = 0,075$ for både korteks og
 15 hippocampus). Nedgangen i astrocytose og mikrogliose stemmer overens med den reduserte beta-amyloidbelastningen observert etter NI-101.11-behandling.

[00237] Passiv immunterapi med visse monoklonale antistoffer rettet mot Abeta kan være forbundet med økt hyppighet av mikrobldninger i hjernen (Pfeifer *et al.*, Science 298 (2002), 1379; Wilcock *et al.*, J Neuroinflammation 1 (2004), 24). For å
 20 vurdere effektene av kronisk behandling med NI-101.11 ble Perls prøyssiske blå farging utført på hjerneseksjoner fra arcAbeta og naturlige mus etter kronisk NI-101.11-behandling. Denne fargingen avdekker tilstedeværelsen av hemosiderin, et nedbrytningsprodukt av hemoglobin og markør for tidligere mikrobldninger (fig. 20). I aldrende arcAbeta-mus behandlet med et kontrollantistoff ble frekvensen av
 25 prøyssiske blå positive profiler betydelig forhøyet i forhold til kullsøsken av naturlige mus (Mann-Whitney-U; $p = 0,001$). Behandling med NI-101.11 førte ikke til en økning av antallet mikrobldninger sammenlignet med kontroll-antistoffbehandlede arcAbeta-mus (Mann-Whitney-U; $p = 0,347$) som indikerer at de fordelaktige terapeutiske effektene av NI-101.11-behandling skjedde i fraværet av denne hyppig observerte
 30 bivirkningen av passiv Abeta-immunterapi.

Eksempel 5

Rekombinant humant antistoff mot beta-amyloid i hjernen hemmer dannelsen av
 35 syntetiske Abeta-fibriller *in vitro*

[00238] Effekten av det rekombinante humane NI-101.11-antistoffet på dannelsen av Abeta-fibriller ble analysert ved å måle Thioflavin S bundet til aggregert Abeta ved fluorescensanalyse. Monomeriske Abeta-løsninger ble inkubert ved 37 °C i

24 t i tilstedeværelsen av fravær av økende konsentrasjon av NI-101.11. Dannelsen av syntetiske Abeta-fibriller *in vitro* ble inhibert av rekombinant humant NI-101.11 på en konsentrasjonsavhengig måte (fig. 21).

5

Eksempel 6

NI-101.11-effekter på Ex-vivo-fagocytose av Abeta-fibriller av BV-2-mikroglial-avledede celler

- 10 **[00239]** Effekten av NI-101.11 på Fcgamma-reseptormediert fagocytose av Abeta-fibriller ble studert i den BV-2-mikroglial-avstemmende cellelinjen. BV-2-cellene ble opprettholdt i DMEM supplert med 5 % FBS, Pen/Step og glutamin. Cellene ble trypsinisert og 120'000 BV-2-celler/brønn ble sådd i flatbunnede 24-brønners plater. Etter 12 timer ble mediet erstattet med 400 ul DMEM/F12/brønn
- 15 supplementert med 20 mM HEPES (pH 7,3), 1 % BSA, 10 µg/ml Pen/Step. 100 µg/ml Fucoïdan, en hemmer av den passiverende reseptoren ble tilsatt 30 min før forsøket. 50 µM FITC-merkede Abeta-fibriller ble pre-inkubert med de indikerte konsentrasjonene av antistoffer i 30 min ved 37 °C, vasket to ganger etterfulgt av sentrifugering i 5 min ved 14'000 x g. Denne suspensjonen ble tilsatt
- 20 vevsdyrkingsplatene. Etter 30 min ble BV-2-cellene vasket to ganger med HBSS for å fjerne ikke-forbundet fibrillær Abeta.
- [00240]** Cellene ble behandlet med 250 µg/ml trypsin/EDTA i 20 min ved 4 °C og vasket to ganger ved sentrifugering ved 500 x g i 5 min ved 4 °C. Cellene ble fiksert i 20 min i FACS-Fix (PBS, 2 % FA, 2 % glukose, 5 mM NaN) og vasket to ganger med
- 25 FACS-vask (PBS, 5 µM EDTA, 0,2 % BSA). Fluorescens (FL-1) av 10'000-celler ble bestemt ved FACS-analyse (basert på Webster SD *et al*, JI 2001).
- [00241]** Fcgamma-reseptor-avhengig fagocytose av FITC-merkede Abeta1-42-fibriller ble målt ved hemming av det passiverende reseptorsystemet. Sammenlignende analyse av human NI-101.11 og et kommersielt tilgjengelig antistoff rettet mot en
- 30 lineær epitop ved N-terminus av Abeta-peptidet (6E10) viste doseavhengig induksjon av fagocytose av Abeta-fibriller. Opptaket av fibriller mediert av NI-101.11 er opptil 3 ganger høyere enn det som ble observert for 6E10-antistoffet (fig. 22). Disse dataene indikerer at NI-101.11 utløser potent doseavhengig Fcgamma-reseptor-mediert fagocytose av Abeta-fibriller med mikroglia-celler.

35

Konklusjon

[0323] Som vist i de ovenfor angitte forsøkene utført i henhold til den foreliggende oppfinnelsen var det overraskende mulig å detektere beskyttende og

terapeutisk aktive antistoffer og antistoffproduserende B-celler både hos fenotypisk friske asymptotiske mennesker og hos pasienter med uvanlig stabile kliniske sykdomsforløp til tross for en diagnose på kognitiv svikt eller Alzheimers sykdom. Nærmere bestemt kunne det detekteres og isoleres en ny klasse humane antistoffer som

5 skjelner den fysiologisk funksjonelle formen til et antigen og dermed minimerer risikoen for autoimmunogene bivirkninger som hittil har vært et problem i immunterapien. Således tilveiebringes antistoffer og tilsvarende bindingsmolekyler som spesifikt gjenkjenner en variant av antigenet i en patofysiologisk relevant struktur som antistoffet er ment å binde seg til for å minske toksisiteten av det eller for å

10 redusere konsentrasjonen av det eller for å fremme nedbrytningen av det for eksempel ved å gjøre patogenet for FcR-uttrykkende makrofager eller mikroglia-celler synlige og dermed ufarlige. Som videre vist i eksemplene er slike antistoffer terapeutisk effektive og i stand til både å suspendere så vel som å forebygge skadelige effekter av patologisk unormale proteiner og aggregater av disse uten å øke frekvensen av

15 mikrohjerneblødningene.

1

SEKVENSLISTE

```

<110>  Universitetet i Zurich
<120>  Metoder for å tilveiebringe sykdoms-spesifikke bindingsmolekyler og mål

<130>  NE30A06/P-WO
<160>  56
<170>  PatentIn versjon 3.4

<210>  1
<211>  66
<212>  DNA
<213>  Mennesker

<220>
<221>  misc_feature
<222>  (1) .. (66)
<223>  Lederpeptid avledet fra human Vkappa I L5, restriksjonssete XbaI innført 3' i sekvensen

<220>
<221>  CDS
<222>  (1) .. (66)

<400>  1
atg gac atg cgg gtg ccc gcc cag ctg ctg ggc ctg ctg ctg ctg tgg      48
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1          5          10          15

ttc ccc ggc tct aga tgc      66
Phe Pro Gly Ser Arg Cys
          20

<210>  2
<211>  22
<212>  PRT
<213>  Mennesker

<400>  2
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1          5          10          15

Phe Pro Gly Ser Arg Cys
          20

<210>  3
<211>  372
<212>  DNA
<213>

<220>
<221>  V_område
<222>  (1) .. (372)
<223>  NI-101.10-variabel tung (Vh) kjedesevens

<220>
<221>  CDS
<222>  (1) .. (372)

```

<400> 3

gag gtg cag cta gtg cag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc gcc ttc agt agc tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

ggc ata cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144
 Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

gca gtt ata tgg ttt gat gga act aaa aaa tac tat aca gac tcc gtg 192
 Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60

aag ggc aga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac aca ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg caa atg aac acc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg aga gat agg ggt ata gga gct cgg cgg ggg ccg tac tac atg gac 336
 Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
 100 105 110

gtc tgg ggc aaa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 372
 Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 4
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Mennesker

<400> 4

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

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

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

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
 100 105 110

Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5
<211> 372
<212> DNA
<213> Kunstig

<220>
<223> Kodonoptimalisert

<220>
<221> V_område
<222> (1)..(372)
<223> NI-101.11-variabel tung (Vh) kjedesevens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(372)

<400> 5
gag gtg cag ctg gtg cag agc ggc ggc ggc gtg gtg cag ccc ggc cgg 48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
agc ctg cgg ctg agc tgc gcc gcc agc ggc ttc gcc ttc agc agc tac 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
ggc atg cac tgg gtg cgg cag gcc ccc ggc aag ggc ctg gag tgg gtg 144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
gcc gtg atc tgg ttc gac ggc acc aag aag tac tac acc gac agc gtg 192
Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60
aag ggc cgg ttc acc atc agc cgg gac aac agc aag aac acc ctg tac 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
ctg cag atg aac acc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc 288
Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
gcc cgg gac cgg ggc atc ggc gcc cgg cgg ggc ccc tac tac atg gac 336
Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
100 105 110
gtg tgg ggc aag ggc acc acc gtg acc gtg agc agc 372
Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6
<211> 124
<212> PRT
<213> Mennesker

<400> 6

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

79

4

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

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
 100 105 110

Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 7
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> Mennesker

<220>
 <221> V_område
 <222> (1)..(327)
 <223> NI-101.10 og NI-101-11-variabel kappa (Vkappa) lettkjedesequens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(327)

<400> 7
 gaa att gtg ctg act cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agc tat 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 tta aat tgg tat caa cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc 192
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 gaa gat ttt gca act tat tac tgt cag cag agt tac agt acc cct ctc 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
 85 90 95
 act ttc ggc gga ggg acc aag ctc gag atc aaa cgt acg 327
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105

80

5

<210> 8
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Mennesker

<400> 8

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser 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 Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 9
 <211> 381
 <212> DNA
 <213> Mennesker

<220>

<221> V område

<222> (1) .. (381)

<223> NI-101.12-variabel tung (Vh) kjedesevens

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (381)

<400> 9

gag gtg cag ctg gtg gag agc ggc ccc ggc ctg gtg aag ccc gcc gag 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ala Glu
 1 5 10 15

acc ctg agc ctg acc tgc acc gtg agc ggc ggc agc atc cgg agc ggc 96
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Ser Gly
 20 25 30

agc atc tgc tgg tac tgg atc cgg cag ccc ccc ggc aag ggc ctg gag 144
 Ser Ile Cys Trp Tyr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

tgg atc ggc tac ttc tgc tac agc ggc gcc acc ttc tac acc ccc agc 192
 Trp Ile Gly Tyr Phe Cys Tyr Ser Gly Ala Thr Phe Tyr Thr Pro Ser
 50 55 60

81

6

ctg cgg ggc cgg ctg acc atc agc gtg gac gcc agc aag aac cag ctg 240
 Leu Arg Gly Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Ala Ser Lys Asn Gln Leu
 65 70 75 80

agc ctg agc ctg agc agc gtg acc gcc gcc gac acc gcc gtg tac tac 288
 Ser Leu Ser Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

tgc gcc cgg cgg gcc ggc gag aac agc ggc ggc atc gag ccc tac tac 336
 Cys Ala Arg Arg Ala Gly Glu Asn Ser Gly Gly Ile Glu Pro Tyr Tyr
 100 105 110

ggc atg gac gtg tgg ggc cag ggc acc acc gtg acc gtg agc agc 381
 Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 10
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Mennesker

<400> 10

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

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

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

Trp Ile Gly Tyr Phe Cys Tyr Ser Gly Ala Thr Phe Tyr Thr Pro Ser
 50 55 60

Leu Arg Gly Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Ala Ser Lys Asn Gln Leu
 65 70 75 80

Ser Leu Ser Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Arg Ala Gly Glu Asn Ser Gly Gly Ile Glu Pro Tyr Tyr
 100 105 110

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 11
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> Mennesker

<220>
 <221> V område
 <222> (1) .. (330)
 <223> NI-101.12-variabel kappa (Vkappa) lettkjedesevens

<220>
 <221> CDS

<222> (1)..(330)

<400> 11

gac gag atc gtg ctg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc atc	48
Asp Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile	
1 5 10 15	
ggc gac cgg gtg acc atc acc tgc cgg gcc agc gag agc atc aac aag	96
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Asn Lys	
20 25 30	
tac gtg aac tgg tac cag cag aag ccc gcc aag gcc ccc aag ctg ctg	144
Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu	
35 40 45	
atc tac gcc gcc agc agc ctg cag agc gcc gcc ccc agc cgg gtg agc	192
Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Ala Pro Ser Arg Val Ser	
50 55 60	
ggc agc gcc ttc gcc cgg gac ttc agc ctg acc atc agc gcc ctg cag	240
Gly Ser Gly Phe Gly Arg Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln	
65 70 75 80	
gcc gag gac ttc gcc gcc tac ttc tgc cag cag agc tac agc gcc ccc	288
Ala Glu Asp Phe Gly Ala Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro	
85 90 95	
tac acc ttc gcc cag gcc acc aag gtg gag atc aag cgg acc	330
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr	
100 105 110	

<210> 12

<211> 110

<212> PRT

<213> Mennesker

<400> 12

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

<210> 13

<211> 363

<212> DNA
<213> Mennesker

<220>
<221> V_område
<222> (1) .. (363)
<223> NI-101.13-variabel tung (Vh) kjedeseqvns

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (363)

<400> 13
cag gta cag ctg cag gag tca ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gag 48
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc atc agc aga aga 96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Arg Arg
20 25 30
agt tac tac tgg ggc tgg atc cgc cag tcc cca ggg aag ggg ctg gag 144
Ser Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
tgg agt gga agt atc cat tat agc ggg agc acc tac tac aac ccg tcc 192
Trp Ser Gly Ser Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
ctc aag agt cga gtc acc ata tct gta gac acg tcc aag aac cag ttc 240
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80
tcc ctg aaa ctg agc tct gtt acc gcc gca gac acg gct gtc tat tac 288
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
tgt gcg aga tca cgt tgg ggc agc agc tgg gta ttt gac tac tgg ggc 336
Cys Ala Arg Ser Arg Trp Gly Ser Ser Trp Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
cag ggc aca ctg gtc acc gtc tct tcg 363
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14
<211> 121
<212> PRT
<213> Mennesker

<400> 14

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Arg Arg
20 25 30
Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ser Gly Ser Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

84

9

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Arg Trp Gly Ser Ser Trp Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 15
<211> 330
<212> DNA
<213> Mennesker

<220>
<221> V_område
<222> (1)..(330)
<223> NI-101.13-variabel lambda (Vlambda) lettkjedesevens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(330)

<400> 15
cag agc gtg ctg acc cag ccg ccg agc gcg agc ggc acc ccg ggc cag 48
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15
cgc gtg acc att agc tgc agc ggc agc agc agc aac att ggc agc aac 96
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30
tat gtg tat tgg tat cag cag ccg ccg ggc acc gcg ccg aaa ctg ctg 144
Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Pro Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45
att tat cgc aac aac cag cgc ccg agc ggc gtg ccg gat cgc ttt agc 192
Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
ggc agc aaa agc ggc acc agc gcg agc ctg gcg att agc ggc ctg cgc 240
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80
agc gaa gat gaa gcg gat tat tat tgc gcg gcg tgg gat gat agc ctg 288
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95
agc ggc tat gtg ttt ggc acc ggc acc aaa gtg acc gtg ctg 330
Ser Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 16
<211> 110
<212> PRT
<213> Mennesker

<400> 16

85

10

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Ser Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Kunstig

<220>

<223> komplementaritetsbestemmende område (CDR)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> Denominering av CDR-proteinsekvenser i Kabat-nomenklaturen av NI-101.10 Vh, CDR1

<400> 17

Ser Tyr Gly Ile His
 1 5

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Kunstig

<220>

<223> komplementaritetsbestemmende område (CDR)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(17)

<223> Denominering av CDR-proteinsekvenser i Kabat-nomenklaturen av NI-101.10 Vh, CDR2

<400> 18

Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Kunstig

<220>
 <223> komplementaritetsbestemmende område (CDR)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (15)
 <223> Denominering av CDR-proteinsekvenser i Kabat-nomenklaturen av NI-101.10 Vh, CDR3

<400> 19

Asp	Arg	Gly	Ile	Gly	Ala	Arg	Arg	Gly	Pro	Tyr	Tyr	Met	Asp	Val
1				5					10					15

<210> 20
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Kunstig

<220>
 <223> komplementaritetsbestemmende område (CDR)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (5)
 <223> Denominering av CDR-proteinsekvenser i Kabat-nomenklaturen av NI-101.11 og NI-101.12F6A Vh, CDR1

<400> 20

Ser	Tyr	Gly	Met	His
1				5

<210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Kunstig

<220>
 <223> komplementaritetsbestemmende område (CDR)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (17)
 <223> Denominering av CDR-proteinsekvenser i Kabat-nomenklaturen av NI-101.11 og NI-101.12F6A Vh, CDR2

<400> 21

Val	Ile	Trp	Phe	Asp	Gly	Thr	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Thr	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Kunstig

<220>
 <223> komplementaritetsbestemmende område (CDR)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (15)
 <223> Denominering av CDR-proteinsekvenser i Kabat-nomenklaturen av NI-101.11 og NI-101.12F6A Vh, CDR3

<400> 22

Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp Val
 1 5 10 15

<210> 23
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Kunstig

<220>
 <223> komplementaritetsbestemmende område (CDR)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (11)
 <223> Denominering av CDR-proteinsekvenser i Kabat-nomenklaturen av NI-101.10, NI-101.11 og NI-101.12F6A Vkappa, CDR1

<400> 23

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

<210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Kunstig

<220>
 <223> komplementaritetsbestemmde område (CDR)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (7)
 <223> Denominering av CDR-proteinsekvenser i Kabat-nomenklaturen av NI-101.10, NI-101.11 og NI-101.12F6A Vkappa, CDR2

<400> 24

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Kunstig

<220>

<223> komplementaritetsbestemmende område (CDR)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (9)

<223> Denominering av CDR-proteinsekvenser i Kabatnomenklaturen av NI-101.10, NI-101.11 og NI-101.12F6A Vkappa, CDR3

<400> 25

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> Kunstig

<220>

<223> komplementaritetsbestemmende område (CDR)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (5)

<223> Denominering av CDR-proteinsekvenser i Kabatnomenklaturen av NI-101.12 Vh, CDR1

<400> 26

Ser Gly Ser Ile Cys
1 5

<210> 27

<211> 19

<212> PRT

<213> Kunstig

<220>

<223> komplementaritetsbestemmende område (CDR)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (19)

<223> Denominering av CDR-proteinsekvenser i Kabatnomenklaturen av NI-101.12 Vh, CDR2

<400> 27

Trp Ile Gly Tyr Phe Cys Tyr Ser Gly Ala Thr Phe Tyr Thr Pro Ser
1 5 10 15

Leu Arg Gly

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Kunstig

<220>

<223> komplementaritetsbestemmede område (CDR)

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> Denominering av CDR-proteinsekvenser i Kabatnomenklaturen av NI-101.12 Vh,
      CDR3

<400> 28

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

```

Val

```

<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Kunstig

```

```

<220>
<223> komplementaritetsbestemmende område (CDR)

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(11)
<223> Denominering av CDR-proteinsekvenser i Kabatnomenklaturen av NI-101.12 Vkappa, CDR1

```

```

<400> 29

```

```

Arg Ala Ser Glu Ser Ile Asn Lys Tyr Val Asn
1          5          10

```

```

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Kunstig

```

```

<220>
<223> komplementaritetsbestemmende område (CDR)

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> Denominering av CDR-proteinsekvenser i Kabatnomenklaturen av NI-101.12 Vkappa,
      CDR2

```

```

<400> 30

```

```

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1          5

```

```

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Kunstig

```

```

<220>
<223> komplementaritetsbestemmende område (CDR)

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE

```

90

15

<222> (1) .. (9)

<223> Denominering av CDR-proteinsekvenser i Kabatnomenklaturen
av NI-101.12 Vkappa, CDR3

<400> 31

Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Kunstig

<220>

<223> komplementaritetsbestemmende område (CDR)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (7)

<223> Denominering av CDR-proteinsekvenser i Kabatnomenklaturen av NI-101.13 Vh, CDR1

<400> 32

Arg Arg Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 33

<211> 16

<212> PRT

<213> Kunstig

<220>

<223> komplementaritetsbestemmende område (CDR)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (16)

<223> Denominering av CDR-proteinsekvenser i Kabatnomenklaturen av NI-101.13 Vh, CDR2

<400> 33

Ser Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> Kunstig

<220>

<223> komplementaritetsbestemmende område (CDR)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (11)

<223> Denominering av CDR-proteinsekvenser i Kabatnomenklaturen av NI-101.13 Vh, CDR3

<400> 34

91

16

Ser Arg Trp Gly Ser Ser Trp Val Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 35
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Kunstig

<220>
 <223> komplementaritetsbestemmende område (CDR)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (13)
 <223> Denominering av CDR-proteinsekvenser i Kabatnomenklaturen av NI-101.13
 Vlambda, CDR1

<400> 35

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Tyr
 1 5 10

<210> 36
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Kunstig

<220>
 <223> komplementaritetsbestemmede område (CDR)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (7)
 <223> Denominering av CDR-proteinsekvenser i Kabatnomenklaturen av NI-101.13
 Vlambda, CDR2

<400> 36

Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
 1 5

<210> 37
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Kunstig

<220>
 <223> komplementaritetsbestemmende område (CDR)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (11)
 <223> Denominering av CDR-proteinsekvenser i Kabatnomenklaturen av NI-101.13
 Vlambda, CDR3

<400> 37

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Tyr Val
 1 5 10

<210> 38
 <211> 372

<212> DNA
<213> Mennesker

<220>
<221> V_område
<222> (1) .. (372)
<223> NI-101.12F6A-variabel tung (Vh) kjedesekevens

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (372)

<400> 38
cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc gcc ttc agt agc tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
gca gtt ata tgg ttt gat gga act aaa aaa tac tat aca gac tcc gtg 192
Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60
aag ggc aga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac aca ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
ctg caa atg aac acc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
gcg aga gat agg ggt ata gga gct cgg cgg ggg ccg tac tac atg gac 336
Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
100 105 110
gtc tgg ggc aaa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 372
Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 39
<211> 124
<212> PRT
<213> Mennesker

<400> 39
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

18

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

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

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 40
<211> 324
<212> DNA
<213> Mennesker

<220>
<221> V_område
<222> (1)..(324)
<223> NI-101.12F6A-variabel kappa (Vkappa) lettkjedesevens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 40
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agc tat 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
tta aat tgg tat caa cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc 192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
gaa gat ttt gca act tat tac tgt cag cag agt tac agt acc cct ctc 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
85 90 95
act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa cgt 324
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 41
<211> 108
<212> PRT
<213> Mennesker

<400> 41

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser 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 Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 42

<211> 121

<212> PRT

<213> Mennesker

<220>

<221> V_område

<222> (1) .. (121)

<223> NI-101.13A-variabel tung (Vh) kjedesequens

<400> 42

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

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

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

Trp Ser Gly Ser Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Arg Trp Gly Ser Ser Trp Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

95

20

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 43
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Mennesker

<220>
 <221> V_område
 <222> (1) .. (121)
 <223> NI-101.13B-variabel tung (Vh) kjedesekevens
 <400> 43

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

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

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

Trp Ser Gly Ser Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Ser Arg Trp Gly Ser Ser Trp Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 44
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mennesker

<220>
 <221> V_område
 <222> (1) .. (107)
 <223> NI-101.13A-variabel lett (V1) kjedesekevens
 <400> 44

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

96

21

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser 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 Gln Ser Tyr Ser Thr Arg Thr
 85 90 95

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

<210> 45
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Mennesker

<220>
 <221> V_område
 <222> (1) .. (108)
 <223> NI-101.13B-variabel lett (V1) kjedesequens

<400> 45

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Arg
 85 90 95

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

<210> 46
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mennesker

<220>
 <223> komplementaritetsbestemmende område (CDR)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(11)
 <223> Denominering av CDR-proteinsekvenser i Kabatnomenklaturen av NI-101.13A-variabel lett (V1) kjedeseqvens, CDR1

<400> 46

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

<210> 47
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mennesker

<220>
 <223> komplementaritetsbestemmende område (CDR)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(7)
 <223> Denominering av CDR-proteinsekvenser i Kabatnomenklaturen av NI-101.13A-variabel lett (V1) kjedeseqvens, CDR2

<400> 47

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 48
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mennesker

<220>
 <223> komplementaritetsbestemmende område (CDR)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(8)
 <223> Denominering av CDR-proteinsekvenser i Kabatnomenklaturen av NI-101.13A-variabel lett (V1) kjedeseqvens, CDR3

<400> 48

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Arg Thr
 1 5

<210> 49
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mennesker

<220>
 <223> komplementaritetsbestemmende område (CDR)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(11)
 <223> Denominering av CDR-proteinsekvenser i Kabatnomenklaturen av NI-101.13B-variabel lett (V1) kjedeseqvens, CDR1

<400> 49

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

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Mennesker

<220>

<223> komplementaritetsbestemmende område (CDR)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (7)

<223> Denominering av CDR-proteinsekvenser i Kabatnomenklaturen av NI-101.13B-variabel lett (V1) kjedesevens, CDR2

<400> 50

Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Mennesker

<220>

<223> komplementaritetsbestemmende område (CDR)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (9)

<223> Denominering av CDR-proteinsekvenser i Kabatnomenklaturen av NI-101.13B-variabel lett (V1) kjedesevens, CDR3

<400> 51

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Arg Thr
1 5

<210> 52

<211> 363

<212> DNA

<213> Mennesker

<220>

<221> V_område

<222> (1) .. (363)

<223> NI-101.13A-variabel tung (Vh) kjedesevens

<400> 52

```
cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc      60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agaagaagtt actactgggg ctggatccgc      120
cagtccccag ggaaggggct ggagtggagt ggaagtatcc attatagcgg gagcacctac      180
tacaaccctg cctcaagag tcgagtcacc atatctgtag acacgtccaa gaaccagttc      240
tccttgaaac tgagctctgt taccgccgca gacacggctg tctattactg tgcgagatca      300
```

cgttggggca gcagctgggt atttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
tcg 363

<210> 53
<211> 363
<212> DNA
<213> Mennesker

<220>
<221> V_område
<222> (1) .. (363)
<223> NI-101.13B-variabel tung (Vh) kjedeseekvens

<400> 53
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgggtg ctccatcagc agaagaagtt actactgggg ctggatccgc 120
cagtccccag ggaaggggct ggagtggagt ggaagtatcc attatagcgg gagcacctac 180
tacaaccctg cctcaagag tcgagtcacc atatctgtag acacgtccaa gaaccagtcc 240
tccttgaaac tgagctctgt taccgccgca gacacggctg tctattactg tgcgagatca 300
cgttggggca gcagctgggt atttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
tcg 363

<210> 54
<211> 324
<212> DNA
<213> Mennesker

<220>
<221> V_område
<222> (1) .. (324)
<223> NI-101.13A-variabel lett (VI) kjedeseekvens

<400> 54
gacatccagt tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccagaacggt cggccaaggg 300
accaagggtg agatcaaacg tacg 324

<210> 55
<211> 327
<212> DNA
<213> Mennesker

<220>
<221> V_område
<222> (1) .. (327)
<223> NI-101.13B-variabel lett (VI) kjedeseekvens

```
<400> 55
gacatccagt tgaccacgtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtca gagtattagt agctggttgg cctgggtatca gcagattcca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatacagcag cctgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt attctcgaac gttcggccaa 300
gggaccaagc tggagatcaa acgtacg 327
```

<210>	56
<211>	372
<212>	DNA
<213>	Mennesker

```
<220>
<221> V_område
<222> (1) .. (372)
<223> NI-101.11-variabel tung (Vh) kjedeseqvns
```

[illegible]

Krav

1. Isolert, humant antistoff mot beta-amyloid eller antigen-bindende fragment av dette, som omfatter en tung variabel region (VH) og en lett variabel region (VL), idet VH omfatter et første komplementaritetsbestemmende område (VHCDR1) med aminosyresekvensen SEQ ID NR: 20, en VHCDR2 med aminosyresekvensen SEQ ID NR:21, og et VHCDR3 med aminosyresekvensen SEQ ID NR:22, og hvori VL omfatter et VLCDR1 med aminosyresekvensen SEQ ID NR:23, et VLCDR2 med aminosyresekvensen SEQ ID NR:24, og et VLCDR3 med aminosyresekvensen SEQ ID NR:25.
2. Antistoffet eller fragmentet av dette ifølge krav 1, som omfatter VH- og VL-aminosyresekvenser som avbildet i SEQ ID NR: 6 og SEQ ID NR: 8.
3. Antistoffet eller fragmentet av dette ifølge krav 1 eller 2, som er valgt fra gruppen bestående av et enkeltkjede Fv-fragment (scFv), et F(ab')-fragment, et F(ab)-fragment og et F(ab')₂- fragment.
4. Polynukleotid som koder for antistoffet eller et fragment av dette ifølge et hvilket som helst av kravene 1-3.
5. Vektor omfattende polynukleotidet ifølge krav 4.
6. Vertscelle omfattende polynukleotidet ifølge krav 4 eller vektoren ifølge krav 5.
7. Metode for fremstilling av et beta-amyloidspesifikt antistoff eller fragment av dette, idet metoden omfatter
 - (a) dyrking av cellen ifølge krav 6; og
 - (b) isolering av antistoffet eller fragmentet av dette fra kulturen.
8. Antistoff eller fragment derav kodet for av polynukleotidet ifølge krav 4, eller oppnåelig av metoden ifølge krav 7.

9. Antistoffet eller fragmentet derav ifølge ethvert av kravene 1 til 3 eller 8, som er

(a) merket detekterbart, fortrinnsvis hvori den detekterbare merkingen velges fra gruppen bestående av et enzym, en radioisotop, en fluorofores og et tungmetall; eller

(b) som er festet til et medikament.

10. Sammensetning omfattende antistoffet eller fragmentet av dette ifølge ethvert av kravene 1 til 3, 8 eller 9, polynukleotidet ifølge krav 4, vektoren ifølge krav 5 eller vertscellen ifølge krav 6, fortrinnsvis hvori

(a) sammensetningen er en farmasøytisk sammensetning, og videre omfatter en farmasøytisk akseptabel bærer, eventuelt ytterligere omfattende et ytterligere middel nyttig for behandling av Alzheimers sykdom, valgt fra gruppen som består av små organiske molekyler, anti-Abeta-antistoffer, og kombinasjoner derav; eller

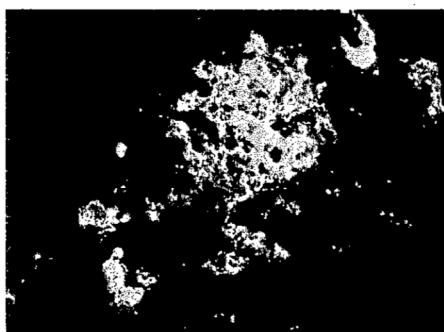
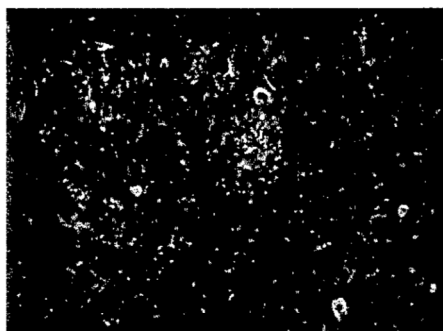
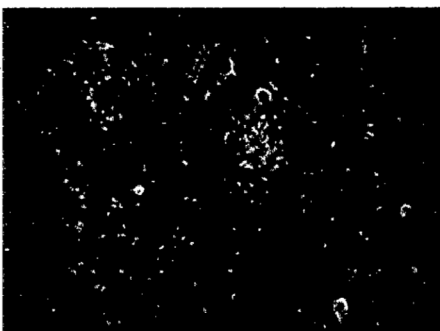
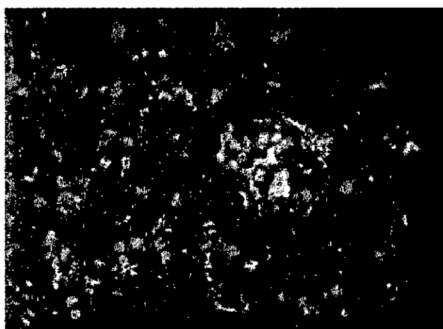
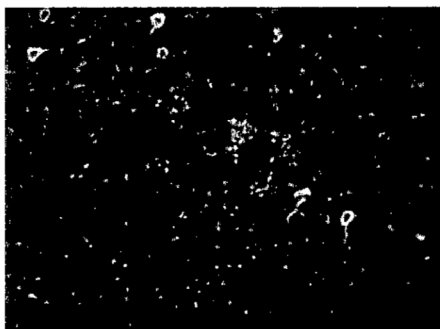
(b) sammensetningen er en diagnostisk sammensetning eller et sett og videre omfatter reagenser som vanligvis anvendes i immun- eller nukleinsyrebaserte diagnostiske metoder.

11. Sammensetningen ifølge krav 10, som er en farmasøytisk sammensetning for anvendelse ved behandling av Alzheimers sykdom.

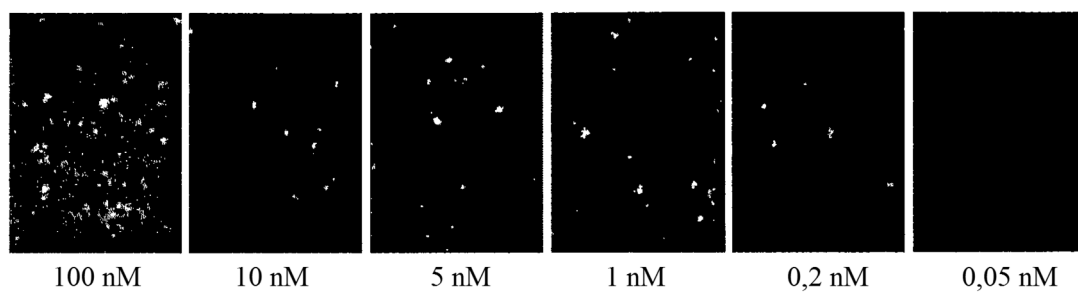
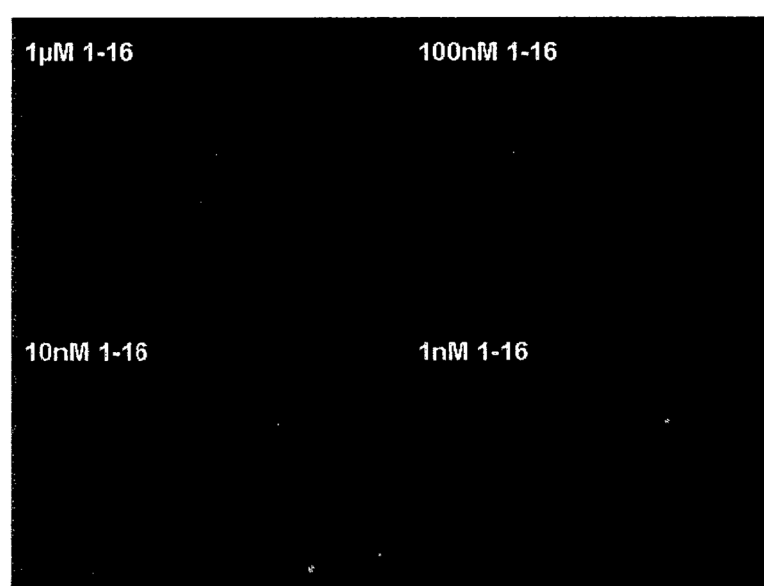
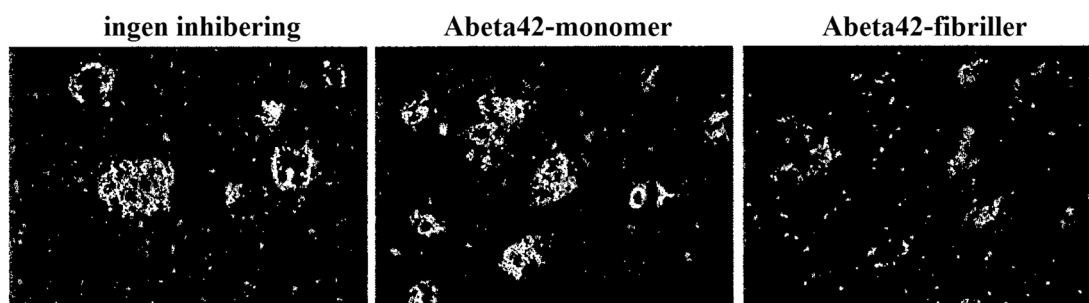
12. Sammensetningen ifølge krav 10 eller sammensetningen ifølge krav 11 for anvendelse i henhold til krav 11, som er utformet for å administreres intravenøst, intramuskulært, subkutant, intraperitonealt, intranasalt, parenteralt eller som en aerosol.

13. Sammensetning ifølge krav 10 for diagnostisering eller screening av et individ for tilstedeværelsen av Alzheimers sykdom eller for å bestemme et individs risiko for å utvikle Alzheimers sykdom.

1/10

A**B****FIG. 1****A****B****FIG. 2****A****B****FIG. 3**

2/10

**FIG. 4****FIG. 5****FIG. 6**

3/10

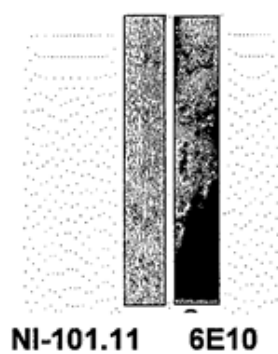


FIG. 7

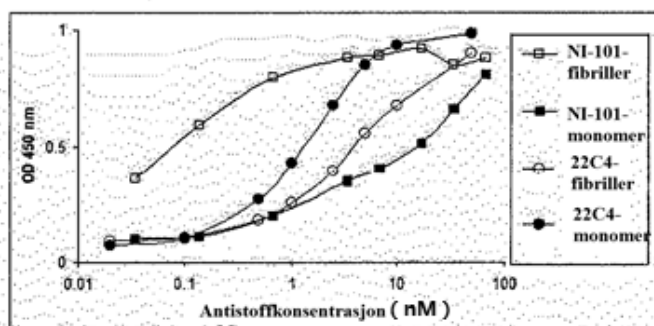


FIG. 8

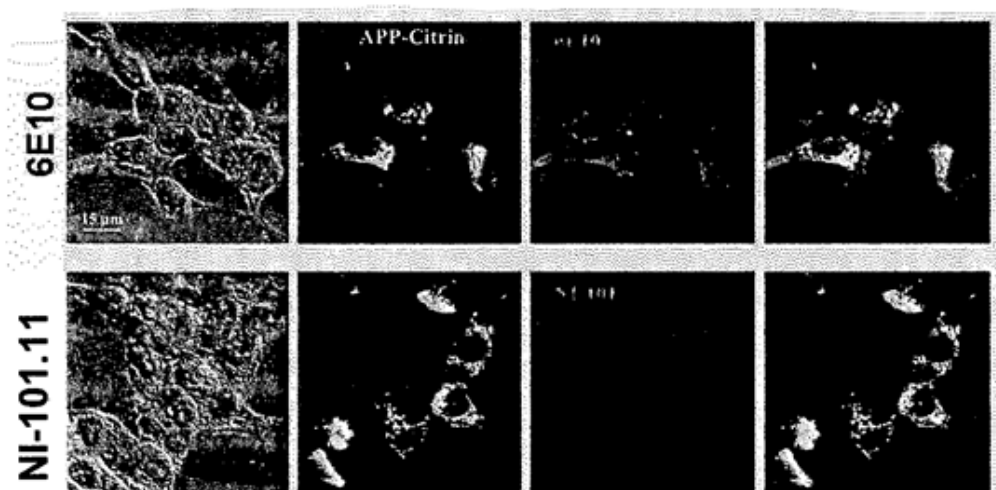
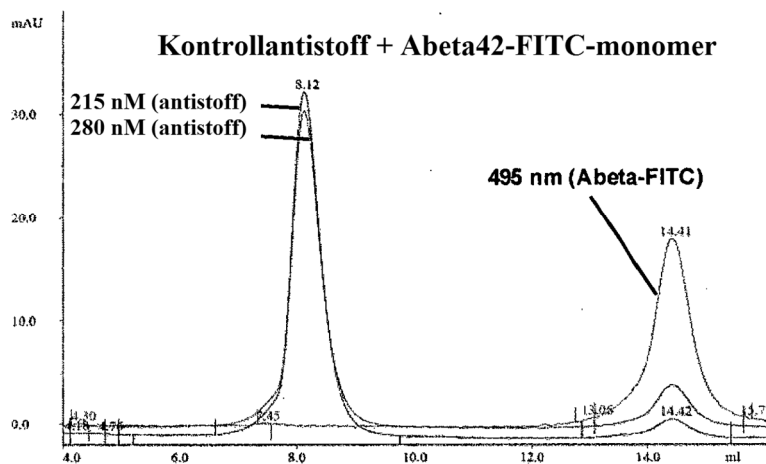
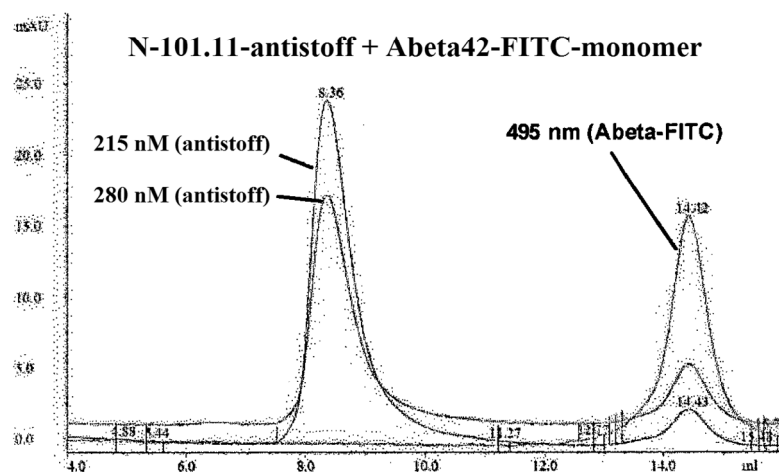
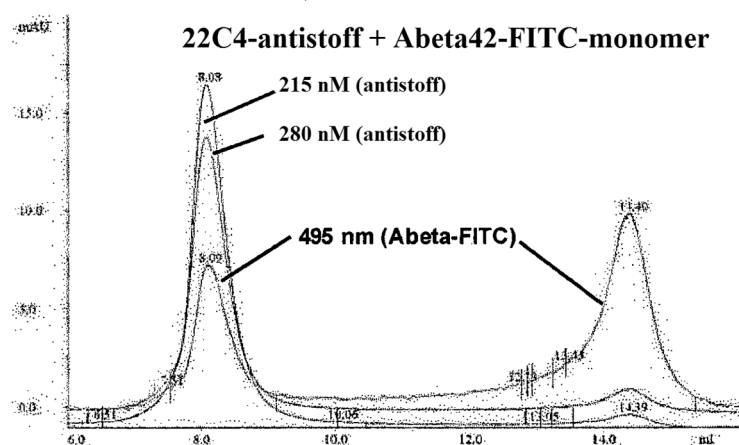


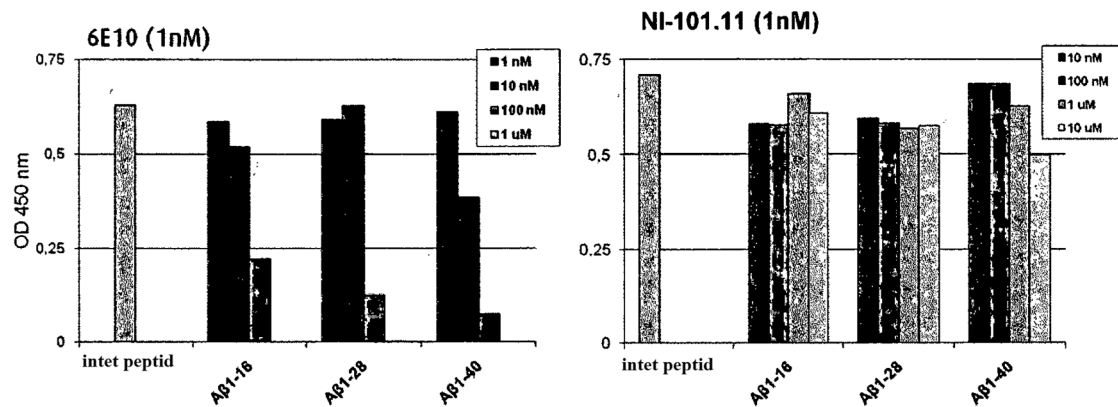
FIG. 9

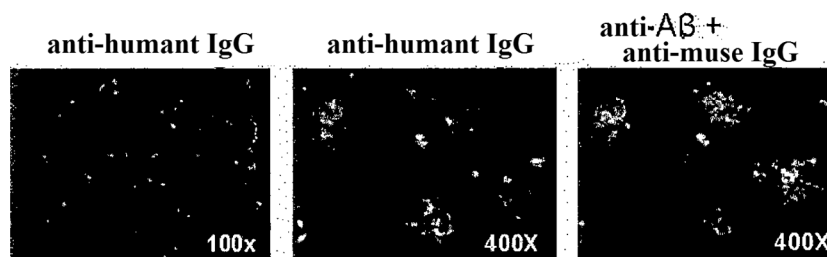
4/10

A**B****C****FIG. 10A-C**

107

5/10



**FIG. 15**

7/10

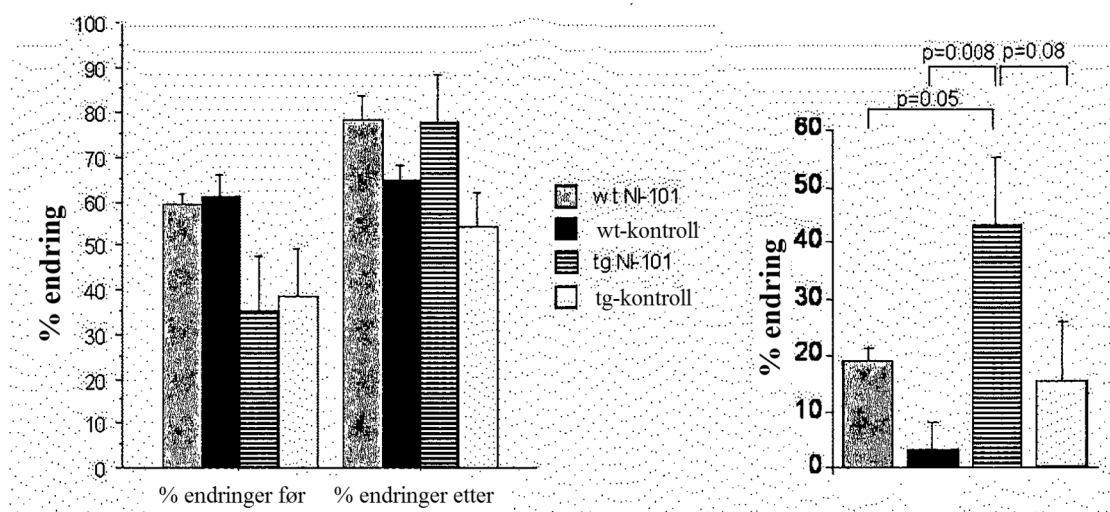


FIG. 16A-B

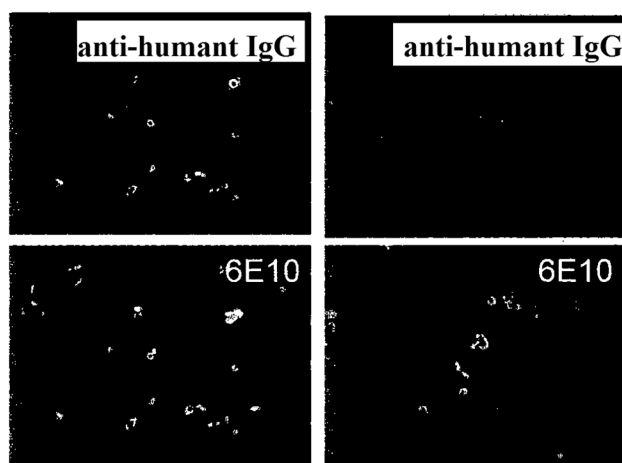


FIG. 17

8/10

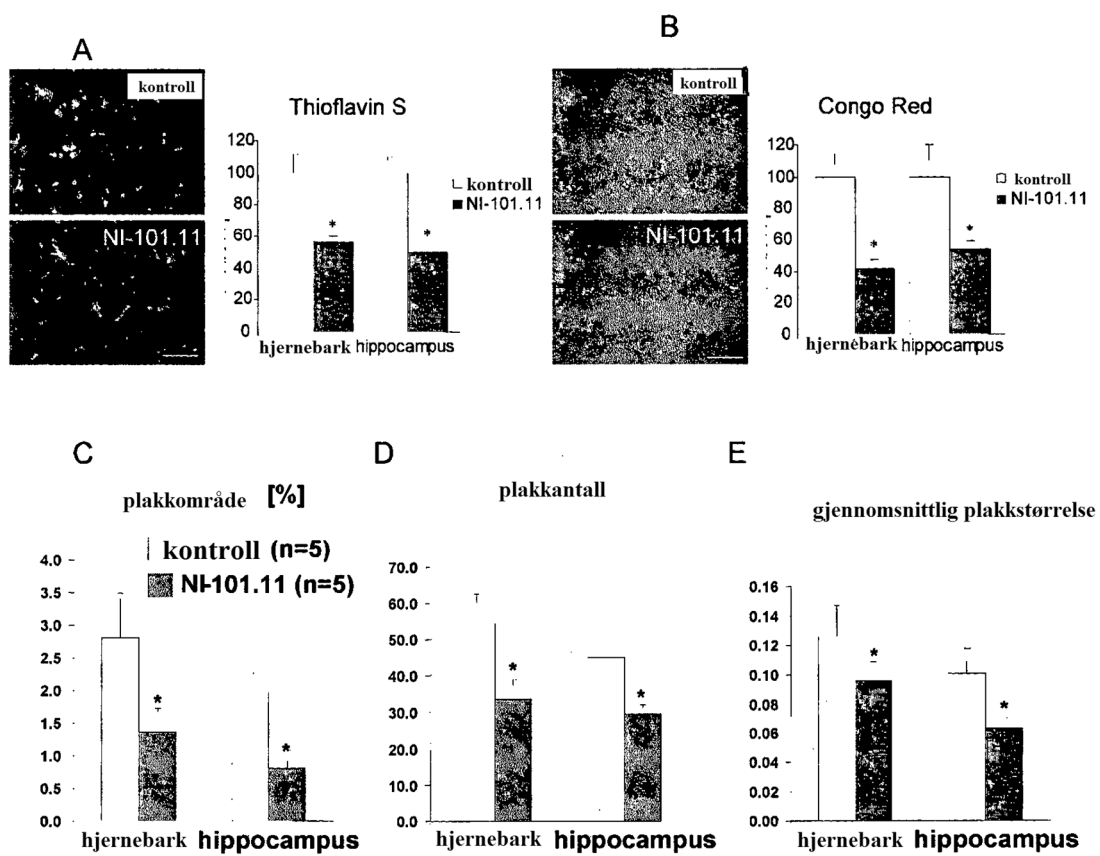


FIG. 18A-E

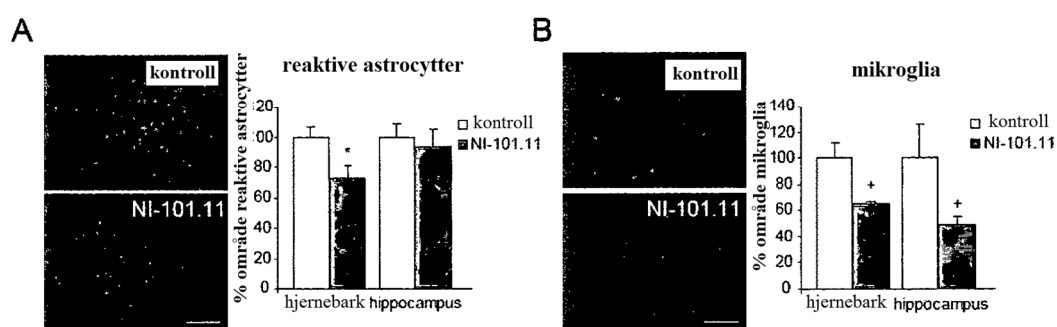


FIG. 19A-B

9/10

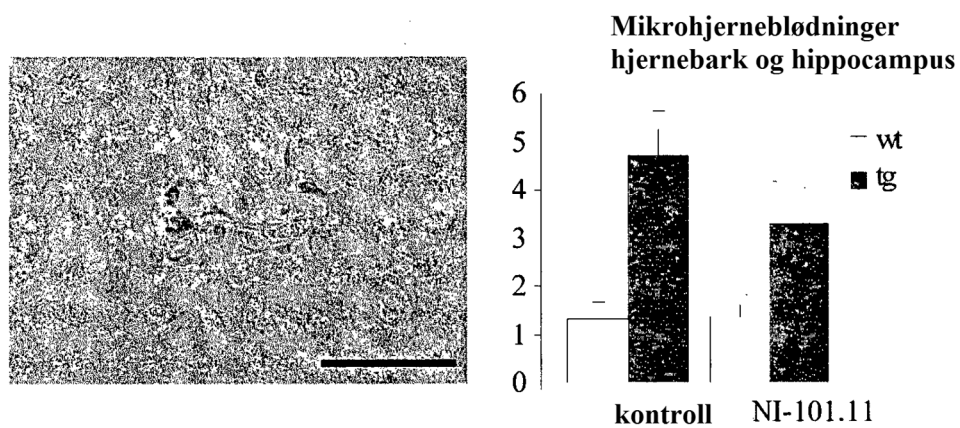


FIG. 20

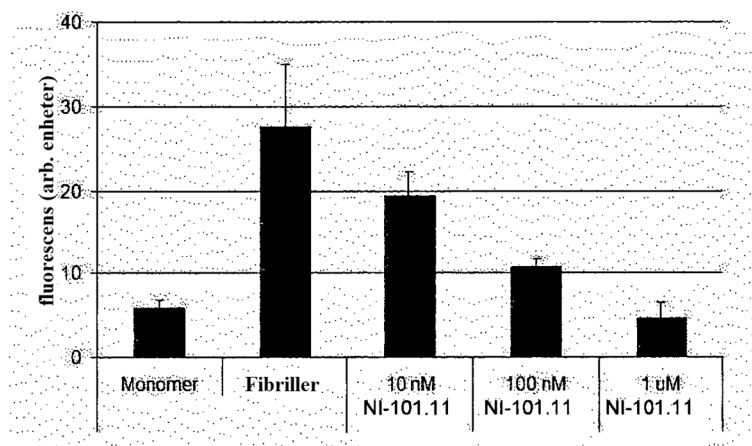


FIG. 21

10/10

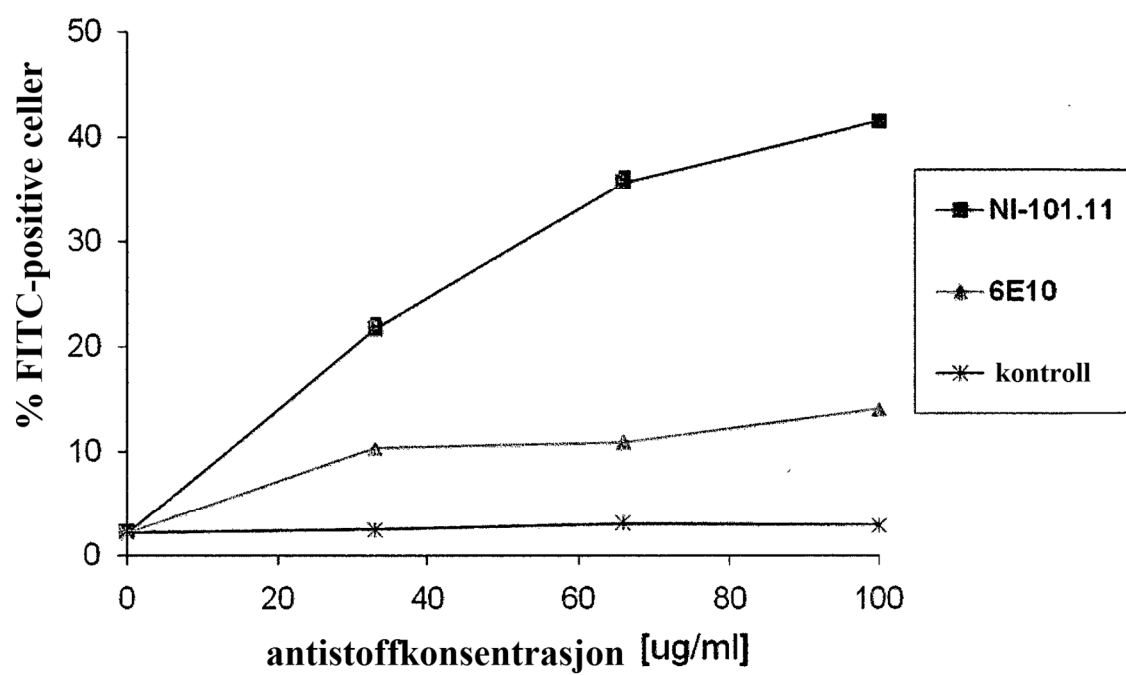


FIG. 22