



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2139517 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/365 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2013.09.23
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2013.05.29
(86)	Europeisk søknadsnr	08744487.3
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.03.27
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.01.06
(30)	Prioritet	2007.03.27, US, 908365 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
	Utpekte samarbeidende stater	AL BA MK RS
(73)	Innehaver	Zymogenetics, Inc., 1201 Eastlake Avenue East, Seattle, WA 98102, USA ARES TRADING S.A., Zone Industrielle de l'Ourietaaz, 1170 Aubonne, Sveits
(72)	Oppfinner	PONCE, JR., Rafael, A., 3818 Corliss Avenue N., Seattle, Washington 98103, USA WALLIS, Wayne, J., 2339 Federal Avenue E., Seattle, Washington 98102, USA HOLDREN, Matthew, S., 4456 46th Avenue SW, Seattle, Washington 98116, USA ZUCKERMAN, Linda, 8816 8th Ave. NE, Seattle, Washington 98115, USA LITTAU, Alisa, M., 23002 NE 152nd Place, Woodinville, Washington 98077, USA VAN NESS, Kirk, P., 9140 NE Day Road, Bainbridge Island, Washington 98110, USA PENA ROSSI, Claudia, 8, rue Emile Yung, CH-1205 Geneva, Sveits GRAFFNER, Hans, Otto, Lennart, Slottsv 31, S-252 84 Helsingborg, Sverige
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Kombinasjon av blys-inhibering og mykofenolatmofetil for behandling av autoimmun sykdom
(56)	Anførte publikasjoner	AU-A1- 2006 201 471 WO-A-01/60397 WO-A-03/001877 WO-A-03/014294 WO-A-03/055979 WO-A-2006/052493 WO-A-2006/068867 WO-A-2007/019618 WO-A-2007/134326

KOMBINASJON AV BLYS-INHIBERING OG MYKOFENOLATMOFETIL FOR BEHANDLING AV AUTOIMMUN SYKDOM

OPPFINNELSENS OMRÅDE

5

Oppfinnelsen vedrører hittil ukjente kombinasjonsbehandlinger som involverer BLYS- eller BLYS/APRIL-inhibering og immunsuppressiva for behandlingen av autoimmune sykdommer, som definert i kravene.

10

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

15

Lymfocytter er én av flere populasjoner av hvite blodceller. De gjenkjenner og responderer spesifikt på fremmede antigener. De tre store klassene av lymfocytter er B-lymfocytter (B-celler), T-lymfocytter (T-celler) og naturlige drapsceller (NK-celler). B-lymfocytter er cellene som er ansvarlige for antistoffproduksjon og tilveiebringer humoral immunitet. B-celler modnes i benmargen og forlater marginen med et antigenbindende antistoff uttrykt på sin celleoverflate. Når en naiv B-celle først møter antigenet for hvilket dens membranbundne antistoff er spesifikt, begynner cellen å dele seg raskt, og dens avkom differensierer seg i hukommelses-B-celler og effektorceller kalt "plasmaceller". Hukommelses-B-celler har lengre levetid og fortsetter å uttrykke membranbundet antistoff med samme spesifisitet som den opprinnelige morcellen. Plasmaceller produserer ikke membranbundet antistoff, men produserer i stedet en utskilt form av antistoffet. Utskilte antistoffer er de viktigste effektormolekylene for humoral immunitet.

20

25

30

35

En gruppe av tumornekrosefaktorreseptorer (TNF) vist på overflaten av B-celler under forskjellige betingelser er blant de cellulære regulatorene av B-cellefunksjon i immunsystemet. Særlig tre TNF-reseptorer: transmembranaktivator og CAML-interaktor (TACI), B-celleaktivator som tilhører TNF-familiereseptoren (BAFF-R), og B-cellemodningsprotein (BCMA) er kjent for å binde den ene eller begge TNF-ligander – B-lymfocytstimulator (BLYS også kjent som BAFF, TALL-1, ztnf4 og THANK) og en proliferasjonsinduserende ligand (APRIL). TACI og BCMA er spesifikt kjent for å binde både BLYS og APRIL, og BAFF-R binder bare BLYS.

Atskillige BLyS- og/eller APRIL-antagonister er utviklet for å blokkere de forskjellige funksjonene til BLyS, hvilke inkluderer, men ikke bør være begrenset til, samtidig B-cellestimulering, plasmablast- og plasmacelleoverlevelse, Ig-
 5 klasseskifte, forbedret B-celleantigen som presenterer celfunksjon, overlevelse for ondartede B-celler, utvikling av B-1-cellefunksjon, B-celleutvikling forbi T-1-stadium og komplett terminal senterdannelse. Noen av disse molekylerne kan også binde til og blokkere effekten av APRIL på B-celler og andre komponenter i immunsystemet (Dillon et al. (2006) Nat. Rev. Drug Dis. 5, 235-246). Molekyler
 10 som er utviklet til å påvirke B-cellefunksjon ved å forstyrre BLyS- og/eller APRIL-binding, inkluderer BLyS-antistoffer, slik som lymfostat-B (Belimumab) (Baker et al, (2003) Arthritis Rheum, 48, 3253-3265 og WO 02/02641), ekstracellulært domene i reseptorer / Fc-domenebaserte fusjonsproteiner, slik som TACI-Ig, inkludert en særlig utførelsesform, atacicept (US-patentsøknad nr.
 15 20060034852), BAFF-R-Fc (WO 05/0000351) og BCMA-Ig eller andre fusjonsproteiner som anvender ekstracellulære domener i reseptorer. En ytterligere klasse av BLyS- og/eller APRIL-antagonister inkluderer andre molekyler som avhenger av BLyS-bindingsevne for å blokkere binding til sine reseptorer, slik som AMG 623, reseptorantistoffer og andre molekyler beskrevet i
 20 WO 03/035846 og WO 02/16312

Den nåværende metoden for behandling av autoimmune sykdommer er suppresjon av den uønskede immunreaksjonen. Ved behandling av lupusnefritt (LN), en alvorlig komplikasjon som involverer nyren til pasienter som lider av
 25 systemisk lupusnefritt (SLE), har flere immunsuppressive legemidler vist seg å være gunstige. Disse legemidlene inkluderer syklofosfamid (CYC), azatioprin (aza), syklosporin A (CSA) og mykofenolatmofetil (MMF) (generelle gjennomgåelser finnes i Mok et al. (2003) Ann Rheum Dis 62, 799-804 og Iaccarino et al. (2007) Autoimmunity Reviews 6, 190-195). Selv om disse
 30 legemidlene er gunstige, er det fremdeles et behov i teknikken for å forbedre responsen på immunsuppressive legemidler for effektivt å behandle autoimmun sykdom.

WO 01/60397 beskriver anti-APRIL-antistoffer og hybridomceller.

WO 2007/019618 beskriver en forebyggende og/eller terapeutisk fremgangsmåte for behandling av autoimmun sykdom.

WO 2006/068867 beskriver en kombinasjonsbehandling for B-cellelidelser.

WO 03/014294 beskriver TACI-er og BR3-polypeptider og anvendelser derav.

5

WO 03/055979 beskriver antistoffer som immunspesifikt binder til BLYS.

AU 2006/210471 beskriver anvendelser av agonister og antagonister for å modulere aktiviteten til TNF-relaterte molekyler.

10

WO 2006/052493 beskriver polypeptider som binder BAFF og/eller APRIL.

WO 03/001877 beskriver fremgangsmåter for diagnose og behandling av hjertevevsavstøtning.

15

Ett aspekt ved den foreliggende oppfinnelsen vedrører behandling av et pattedyrs B-celleregulerte autoimmune lidelse ved å redusere immunglobulinnivåer ved hjelp av en BLYS-antagonist og et immunsuppressivt legemiddel, som definert i kravene. BLYS-antagonisten er et TACI-Fc-fusjonsprotein omfattende det ekstracellulære domenet på TACI eller et funksjonelt fragment derav. I en særlig utførelsesform omfatter TACI-Fc-fusjonsproteinet en polypeptidsekvens valgt fra SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 eller SEQ ID NO: 26.

20

BLYS-antagonistene inkluderer også et BLYS-antistoff, foretrukket et som binder BLYS innenfor en region omfattende aminosyrene 162–275 i SEQ ID NO: 8, eller BLYS-antistoffet kjent som LymphoStat-B. BLYS-antagonister inkluderer også et TACI-antistoff, foretrukket et som binder TACI innenfor en region omfattende 72–109 i SEQ ID NO:2 eller 82–222 i SEQ ID NO:2.

25

30

Immunsuppressive legemidler inkluderer syklofosfamid (CYC), azatioprin (aza), syklosporin A (CSA) eller mykofenolatmofetil (MMF), selv om et hvilket som helst legemiddel som undertrykker immunsystemet, kan være egnet. Immunglobulinnivået som reduseres ifølge den foreliggende fremgangsmåten, kan være IgM, IgG, IgA, IgD eller IgE eller kombinasjoner derav.

35

Den foreliggende oppfinnelsen vedrører lindring av en B-celleregulert autoimmun lidelse hos en pasient som har lidelsen, ved hjelp av en terapeutisk virkningsfull mengde av det immunsuppressive legemiddelet MMF og av en BLYS-antagonist ifølge kravene. I en utførelsesform er den autoimmune lidelsen valgt fra gruppen

5 bestående av revmatoid artritt, juvenil revmatoid artritt, systemisk lupus erythematosus (SLE), lupusnefritt (LN), Wegeners sykdom, inflammatorisk tarmsykdom, idiopatisk trombocytopenisk purpura (ITP), trombotisk trombocytopenisk purpura (TTP), autoimmun trombocytopeni, multippel sklerose, psoriasis, IgA-nefropati, IgM-polyneuropatier, myasthenia gravis,

10 vaskulitt, diabetes mellitus, Reynauds syndrom, Sjögrens syndrom og glomerulonefritt. Én sykdom spesifikt behandlet på denne måten er lupusnefritt.

Særlig når den autoimmune lidelsen er revmatoid artritt, systemisk lupus erythematosus eller lupusnefritt, kan BLYS-antagonisten og det

15 immunsuppressive legemiddelet i en utførelsesform administreres i ytterligere kombinasjon med behandling ved hjelp av et andre immunsuppressivt legemiddel, slik som ikke-steroide antiinflammatoriske midler (NSAID-er), glukokortikoid, prednison og sykdomsmodifiserende antirevmatisk legemiddel (DMARD).

Den foreliggende oppfinnelsen benytter et immunsuppressivt legemiddel som er påvist å være virkningsfullt for behandling av autoimmun sykdom i kombinasjon med BLYS-antagonisten. Det immunsuppressive legemiddelet som tenkes

20 anvendt i den foreliggende oppfinnelsen, er mykofenolatmofetil (MMF).

I en hvilken som helst av anvendelsene til behandling eller lindring av en lidelse hvor MMF-et og BLYS-antagonisten administreres til en pasient, kan MMF-et og BLYS-antagonisten administreres samtidig eller sekvensielt. I en spesifikk

25 utførelsesform administreres det immunsuppressive middelet før BLYS-antagonisten

30

Det er også tilveiebrakt en sammensetning omfattende MMF og en BLYS-antagonist.

Ytterligere beskrevet heri er en anordning omfattende et immunsuppressivt middel, en BLYS-antagonist og en etikett hvori etiketten angir at

35 sammensetningen er for behandling av en B-celleregulert autoimmun lidelse.

I en hvilken som helst av utførelsesformene av anvendelsene og sammensetningene ifølge oppfinnelsen er BLYS-antagonisten et fusjonsprotein mellom det ekstracellulære domenet i en reseptor som binder BLYS og Fc-domenet i et immunglobulin, eller et Fc-fusjonsprotein. Fc-fusjonsproteinet er et TACI Fc-fusjonsprotein omfattende det ekstracellulære domenet i TACI, særlig atacicept.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

Figur 1 fremstiller grafisk gjennomsnittsverdien ($\pm$ standardavvik) av IgG for de fire behandlingsgruppene – vehikkel, bare MMF, bare atacicept og atacicept og MMF. Alle parvise sammenligninger av disse verdiene ble statistisk signifikante ($p < 0,05$) ved hjelp av andre logg-transformerte data enn bare vehikkel vs. MMF.

Figur 2 viser grafisk gjennomsnittsverdien ($\pm$ standardavvik) av IgM for de fire behandlingsgruppene – vehikkel, bare MMF, bare atacicept og atacicept og MMF. Alle parvise sammenligninger av disse verdiene ble statistisk signifikante ($p < 0,05$) ved hjelp av andre logg-transformerte data enn bare vehikkel vs. MMF.

Figur 3 viser grafisk gjennomsnittsverdien ($\pm$ standardavvik) av IgA for de fire behandlingsgruppene – vehikkel, bare MMF, bare atacicept og atacicept og MMF. Alle parvise sammenligninger av disse verdiene ble statistisk signifikante ($p < 0,05$) ved hjelp av andre logg-transformerte data enn bare vehikkel vs. MMF.

DETALJERT BESKRIVELSE AV DE FORETRUKNE UTFØRELSESFORMENE

Mens immunsuppressiv behandling later til å være nyttig for behandlingen av autoimmun sykdom, ble det oppdaget fra forsøkene beskrevet heri at administrering av en kombinasjon av immunsuppressiva med en BLYS-antagonist er en fremgangsmåte for behandling som vil blokkere multiple signalveier i B-celler som antas å være ansvarlige for produksjonen av antistoffer rettet mot selvantigener, hvilket utløser og/eller forlenger den autoimmune tilstanden. Dette resulterer i en reduksjon i sirkulerende immunglobulin hos et pattedyr som gjennomgår slik behandling. Sirkulerende

immunglobulin antas således å være minst delvis ansvarlig for utløsning av de negative symptomene på autoimmun sykdom, idet kombinasjonen av immunsuppressive legemidler og behandlinger rettet mot BLYS-signalveien derfor tilveiebringer en hittil ukjent fremgangsmåte for behandling av B-cellemedierte sykdommer, slik som B-cellebaserte autoimmune sykdommer. Kombinasjonsbehandlingen av immunsuppressive legemidler med en BLYS-antagonist kan tilby mer virkningsfulle alternativer til eksisterende behandlinger for visse sykdommer, f.eks. lupusnefritt.

En "autoimmun sykdom" heri er en hvilken som helst ikke-ondartet sykdom eller lidelse som oppstår fra antistoffer som er produsert, rettet mot et individs egne (selv)antigener og/eller vev.

Som anvendt heri betyr "B-celledbryting" en reduksjon i B-cellenivåer i et dyr eller menneske etter legemiddel- eller antistoffbehandling, sammenlignet med nivået før behandling. B-cellenivåer er målbare ved hjelp av velkjente assayer slik som ved tilveiebringelse av en komplett blodtelling, ved FACS-analysefarging for kjente B-cellemarkører og ved fremgangsmåter slik som beskrevet i forsøkseksempelene. B-celledbryting kan være partiell eller komplett. Hos en pasient som mottar et B-celledbrytende legemiddel, brytes B-celler generelt ned i løpet av den tiden legemiddelet sirkulerer i pasientens kropp, og gjenvinningstiden for B-celler.

"Immunsuppressive legemidler" er hvilke som helst molekyler som forstyrrer immunsystemet og reduserer dets respons på fremmede antigener eller selvantigener. Syklofosamid (CYC) og mykofenolatmofetil (MMF) er to slike molekyltyper. Denne betegnelsen er ment å innbefatte et hvilket som helst legemiddel eller molekyl som er nyttig som et terapeutisk middel i nedregulering av immunsystemet. Denne fremgangsmåten vedrører særlig legemidler som er anvendt til å behandle autoimmune sykdommer slik som revmatoid artritt, juvenil revmatoid artritt, systemisk lupus erythematosus (SLE), lupusnefritt (LN), Wegeners sykdom, inflammatorisk tarmsykdom, idiopatisk trombocytopenisk purpura (ITP), trombotisk trombocytopenisk purpura (TTP), autoimmun trombocytopeni, multippel sklerose, psoriasis, IgA-nefropati, IgM-polynevropatier, myasthenia gravis, vaskulitt, diabetes mellitus, Reynauds syndrom, Sjögrens syndrom og glomerulonefritt.

Betegnelsene "BLyS" eller "BLyS-polypeptid," "TALL-1" eller "TALL-1-polypeptid", eller "BAFF" eller "BAFF-polypeptid" innbefatter, når de anvendes heri, "BLyS-polypeptider i native sekvenser" og "BLyS-varianter." "BLyS" er en betegnelse for de polypeptidene som kodes av den humane BLyS-sekvensen (SEQ ID NO: 7) eller den murine BLyS-sekvensen (SEQ ID NO: 9). Polypeptider som viser biologisk aktivitet for BLyS, omfattes også av denne betegnelsen. For eksempel fremmer en biologisk aktiv BLyS en hvilken som helst eller en kombinasjon av følgende hendelser in vitro eller in vivo: en økt overlevelse av B-celler, et økt nivå av IgG and/eller IgM, et økt antall av plasmaceller og prosessering av NF-Kb2/100 til p52NF-Kb i B-celler i milt (f.eks. Batten, M et al., (2000) J. Exp. Med. 192: 1453-1465, Moore, et al., (1999) Science 285: 260-263, Kayagaki, et al., (2002) 10: 515-524 Flere assayer som er nyttige for testing av BLyS- og/eller APRIL-antagonister slik som B-cellespredningsassayet blant annet beskrevet i WO 00/40716, er velkjent for en fagmann.

Kort fortalt isoleres humane B-celler fra mononukleære celler i perifert blod ved hjelp av magnetiske CD19-kuler og VarioMacs magnetisk separeringssystem (Miltenyi Biotec Auburn, CA) ifølge produsentens bruksanvisning. Rensede B-celler blandes med løselig BLyS (25 ng/ml) og rekombinant humant IL-4 (10 ng/ml Pharmingen), og cellene plasseres på rundbunnede 96 brønners plater ved 1×10^5 celler per brønn. BLyS- og/eller APRIL-antagonisten som skal testes, kan fortynnes fra ca. 5 µg/ml til ca. 6 ng/ml og inkuberes med B-cellene i fem dager, med pulsering over natten på dag fire med 1 µCi ^3H -tymidin per brønn. Som en kontroll kan også BLyS- og/eller APRIL-antagonisten inkuberes med B-celler og IL-4 uten BLyS. Plater høstes ved hjelp av Packard-platehøsteren og telles ved hjelp av Packard-leseren.

Et polypeptid med "nativ sekvens" omfatter et polypeptid med samme aminosyresekvens som det tilsvarende polypeptidet avledet fra naturen. Slike polypeptider med nativ sekvens kan isoleres fra naturen eller fremstilles ved hjelp av rekombinante og/eller syntetiske midler. Betegnelsen "nativ sekvens" innbefatter spesifikt naturlig forekommende trunkerte, løselige eller utskilte former (f.eks. en ekstracellulær domenesekvens), naturlig forekommende variantformer (f.eks. alternativt spleisede former) og naturlig forekommende allelvarianter av polypeptidet.

"Variantpolypeptider" for hvilke som helst av polypeptidene beskrevet i den foreliggende beskrivelsen inkluderer generelt polypeptider hvori én eller flere aminosyrerester er tilsatt eller slettet ved N- og/eller C-terminalen, samt innenfor ett eller flere interne domener, i aminosyresekvensen av full lengde eller den "native sekvensen". Når ekstracellulære domener i reseptorer drøftes, er det også tiltenkt fragmenter som binder et BlyS- polypeptid med nativ sekvens. Når BlyS fragmenter drøftes, er fragmenter som binder et hvilket som helst eller flere av de tre BlyS-reseptorene derimot tiltenkt. Et variantpolypeptid vil vanligvis ha minst ca. 80 % aminosyresekvensidentitet, mer foretrukket minst ca. 81 % aminosyresekvensidentitet, mer foretrukket minst ca. 82 % aminosyresekvensidentitet, mer foretrukket minst ca. 83 % aminosyresekvensidentitet, mer foretrukket minst ca. 84 % aminosyresekvensidentitet, mer foretrukket minst ca. 85 % aminosyresekvensidentitet, mer foretrukket minst ca. 86 % aminosyresekvensidentitet, mer foretrukket minst ca. 87 % aminosyresekvensidentitet, mer foretrukket minst ca. 88 % aminosyresekvensidentitet, mer foretrukket minst ca. 89 % aminosyresekvensidentitet, mer foretrukket minst ca. 90 % aminosyresekvensidentitet, mer foretrukket minst ca. 91 % aminosyresekvensidentitet, mer foretrukket minst ca. 92 % aminosyresekvensidentitet, mer foretrukket minst ca. 93 % aminosyresekvensidentitet, mer foretrukket minst ca. 94 % aminosyresekvensidentitet, mer foretrukket minst ca. 95 % aminosyresekvensidentitet, mer foretrukket minst ca. 96 % aminosyresekvensidentitet, mer foretrukket minst ca. 97 % aminosyresekvensidentitet, mer foretrukket minst ca. 98 % aminosyresekvensidentitet og enda mer foretrukket minst ca. 99 % aminosyresekvensidentitet med polypeptidet eller et spesifisert fragment derav. Variantpolypeptider innbefatter generelt ikke den native polypeptidsekvensen. Variantpolypeptider er vanligvis minst ca. 10 aminosyrer i lengde, ofte minst ca. 20 aminosyrer i lengde, oftere minst ca. 30 aminosyrer i lengde, oftere minst ca. 40 aminosyrer i lengde, oftere minst ca. 50 aminosyrer i lengde, oftere minst ca. 60 aminosyrer i lengde, oftere minst ca. 70 aminosyrer i lengde, oftere minst ca. 80 aminosyrer i lengde, oftere minst ca. 90 aminosyrer i lengde, oftere minst ca. 100 aminosyrer i lengde, oftere minst ca. 150 aminosyrer i lengde, oftere minst ca. 200 aminosyrer i lengde, oftere minst ca. 250 aminosyrer i lengde, oftere minst ca. 300 aminosyrer i lengde eller mer.

Som nevnt ovenfor kan en BlyS- og/eller APRIL-antagonist fungere på en direkte eller indirekte måte for helt eller delvis å blokkere, inhibere eller nøytralisere BlyS-signalering, in vitro eller in vivo. BlyS- og/eller APRIL-antagonisten kan for eksempel binde BlyS direkte. Et direkte bindemiddel er for eksempel et polypeptid omfattende det ekstracellulære domenet (ECD) i en BlyS-reseptor, slik som TACI, BAFF-R og BCMA.

BlyS-reseptoreren involvert i den foreliggende oppfinnelsen kan beskrives på følgende måte. TACI-polypeptidene ifølge oppfinnelsen inkluderer TACI-polypeptider omfattende eller bestående av aminosyrer 1-246 i SEQ ID NO: 2. Den generelle betegnelsen "TACI" inkluderer TACI-polypeptidene beskrevet i WO 98/39361, WO 00/40716, WO 01/85782, WO 01/87979, WO 01/81417 og WO 02/094852. TACI-polypeptidene ifølge oppfinnelsen kan isoleres fra en rekke kilder, slik som fra humane vevstyper eller fra en annen kilde, eller fremstilles ved hjelp av rekombinante og/eller syntetiske fremgangsmåter. BAFF-R-polypeptidene ifølge oppfinnelsen inkluderer BAFF-R-polypeptidet omfattende eller bestående av den tilgrensende sekvensen av aminosyrerestene 1 til 184 i SEQ ID NO:4. Den generelle betegnelsen "BAFF-R" inkluderer BAFF-R-polypeptidene beskrevet i WO 02/24909 og WO 03/14294. BAFF-R-polypeptidene ifølge oppfinnelsen kan isoleres fra en rekke kilder, slik som fra humane vevstyper eller fra en annen kilde, eller fremstilles ved hjelp av rekombinante og/eller syntetiske fremgangsmåter. BCMA-polypeptidet ifølge oppfinnelsen inkluderer BCMA-polypeptider omfattende eller bestående av aminosyrerester 1-184 i SEQ ID NO:6. Den generelle betegnelsen "BCMA" inkluderer BCMA-polypeptidene beskrevet i Laabi et al., EMBO J., 11: 3897, - 3904, 31, 1992), Laabi et al., Nucleic Acids Res., 22: 1147-1154 (1994), Gras et al., Int. Immunology, 7: 1093-1106 (1995) og Madry et al., Int. Immunology, 10: 1693-1702 (1998). BCMA-polypeptidene ifølge oppfinnelsen kan isoleres fra en rekke kilder, slik som fra humane vevstyper eller fra en annen kilde, eller fremstilles ved hjelp av rekombinante og/eller syntetiske fremgangsmåter.

For formålet å fungere som BlyS- og/eller APRIL-antagonist er ECD-et i disse reseptorene et polypeptid i det vesentlige fritt for de transmembrane eller cytoplasmiske domenene som generelt bevarer evnen til å binde BlyS. Det ekstracellulære domene i TACI kan spesifikt omfatte aminosyrene 1 til 154 i TACI-polypeptidsekvensen (SEQ ID NO: 2). ECD-et kan dessuten være

fragmenter eller varianter av denne sekvensen, slik som ECD-former av TACI som beskrevet i von Bulow et al., ovenfor, WO 98/39361, WO 00/40716, WO 01/85782, WO 01/87979 og WO 01/81417. Disse ECD-formene kan særlig omfatte aminosyre 1-106 i SEQ ID NO:2, aminosyre 1-142 i SEQ ID NO:2, aminosyre 30-154 i SEQ ID NO:2, aminosyre 30-106 i SEQ ID NO:2, aminosyre 30-110 i SEQ ID NO:2, aminosyre 30-119 i SEQ ID NO:2, aminosyre 1-166 i SEQ ID NO:2, aminosyre 1-165 i SEQ ID NO:2, aminosyre 1-114 i SEQ ID NO:2, aminosyrene 1-119 i SEQ ID NO:2, aminosyrene 1-120 i SEQ ID NO:2 og aminosyrene 1-126 i SEQ ID NO:2. TACI-ECD-en kan i tillegg omfatte molekyler med bare ett cysteinrikt domene

ECD-former av BAFF-R inkluderer dem omfattende aminosyrene 1-71 i BAFF-R-polypeptidsekvensen (SEQ ID NO: 4). ECD-et kan dessuten være fragmenter eller varianter av denne sekvensen, slik som ECD-former av BAFF-R som beskrevet i WO 02/24909, WO 03/14294 og WO 02/38766. Disse ECD-formene kan særlig omfatte aminosyrene 1-77 i SEQ ID NO: 4, aminosyre 7-77 av SEQ ID NO:4, aminosyre 1-69 av SEQ ID NO:4, aminosyre 7-69 av SEQ ID NO:4, aminosyre 2-62 av SEQ ID NO:4, aminosyre 2-71 av SEQ ID NO:4, aminosyre 1-61 av SEQ ID NO:4 og aminosyre 2-63 av SEQ ID NO:4, aminosyre 1-45 av SEQ ID NO:4, aminosyre 1-39 av SEQ ID NO:4, aminosyre 7-39 av SEQ ID NO:4, aminosyre 1-17 av SEQ ID NO:4, aminosyre 39-64 av SEQ ID NO:4, aminosyre 19-35 av SEQ ID NO:4 og aminosyre 17-42 av SEQ ID NO:4. BAFF-R-ECD-en kan i tillegg omfatte de molekylerne som har et cysteinrikt domene.

ECD-former av BCMA inkluderer dem omfattende aminosyrene 1-48 i BCMA-polypeptidsekvensen (SEQ ID NO: 6). ECD-en kan dessuten være fragmenter eller varianter av denne sekvensen, slik som ECD-former av BCMA som beskrevet i WO 00/40716 og WO 05/075511. Disse ECD-formene kan særlig omfatte aminosyre 1-150 i SEQ ID NO:6, aminosyre 1-48 i SEQ ID NO:6, aminosyre 1-41 i SEQ ID NO:6, aminosyre 8-41 i SEQ ID NO:6, aminosyre 8-37 i SEQ ID NO:6, aminosyre 8-88 i SEQ ID NO:6, aminosyre 41-88 i SEQ ID NO:6, aminosyre 1-54 i SEQ ID NO:6, aminosyre 4-55 i SEQ ID NO:6, aminosyre 4-51 i SEQ ID NO:6 og aminosyre 21-53 i SEQ ID NO:6. BCMA-ECD-en kan i tillegg omfatte de molekylerne som har bare et partielt cysteinrikt domene.

I en ytterligere utførelsesform kan BLYS-bindingsregionen i en BLYS-reseptor (f.eks. et ekstracellulært domene eller fragment derav av BAFF-R, BCMA eller TACI) fusjoneres til en Fc-del av et immunglobulinmolekyl for å lette dets løselighet in vivo. Ifølge en utførelsesform binder BLYS-antagonisten til et BLYS-polypeptid med en bindingsaffinitet på 100 nM eller mindre. Ifølge en annen utførelsesform binder BLYS-antagonisten til et BLYS-polypeptid med en bindingsaffinitet på 10 nM eller mindre. Ifølge enda en annen utførelsesform binder BLYS-antagonisten til et BLYS-polypeptid med en bindingsaffinitet på 1 nM eller mindre.

I et annet eksempel inkluderer BLYS-antagonister BLYS-bindingspolypeptider som ikke er native sekvenser eller varianter derav. Noen eksempler på slike polypeptider er dem med sekvensen med formel I, formel II, formel III som beskrevet i WO 05/000351. Noen bindingspolypeptider inkluderer særlig ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEQ ID NO:13), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEQ ID NO:14), ECFDLLVRRWVPCMLG (SEQ ID NO:15), ECFDLLVRSWVPCHMLR (SEQ ID NO:16), ECFDLLVRHWVACGLLR (SEQ ID NO:17) eller sekvenser angitt på FIG. 32 i WO 05/000351.

BLYS-antagonisten kan alternativt binde et ekstracellulært domene i TACI, BAFF-R eller BCMA i native sekvenser ved dens BLYS-bindingsregion for helt eller delvis å blokkere, inhibere eller nøytralisere BLYS-binding in vitro, in situ eller in vivo. En slik indirekte antagonist er for eksempel et TACI-antistoff som binder i en region av TACI, slik at bindingen av BLYS er sterisk hindret. Binding ved for eksempel aminosyrene 72–109 eller en omkringliggende region antas å blokkere BLYS-binding. Det kan også være fordelaktig å blokkere APRIL-binding til dette molekylet, som antas å forekomme i regionen for aminosyrene 82–222. En annen BLYS- og/eller APRIL-antagonist er et BAFF-R-antistoff som binder i en region av BAFF-R, slik at binding av humant BAFF-R til BLYS er sterisk hindret. Binding ved for eksempel aminosyrene 23–38 eller aminosyrene 17–42 eller en omkringliggende region antas å blokkere BLYS-binding. Til slutt vil en ytterligere indirekte antagonist være et BCMA-antistoff som binder i en region av BCMA, slik at bindingen av BLYS er sterisk hindret. Binding ved for eksempel aminosyrene 5–43 eller en omkringliggende region antas å blokkere BLYS-binding (eller APRIL-binding).

Betegnelsen "antistoff" anvendes i denne forbindelse i videste forstand og dekker spesifikt for eksempel monoklonale antistoffer, polyklonale antistoffer, antistoffer med polyepitopisk spesifisitet, enkeltkjedede antistoffer og fragmenter av antistoffer. Et polypeptid ifølge denne oppfinnelsen kan fusjoneres til en antistoffstruktur, f.eks. i den variable regionen eller i et CDR, slik at antistoffet kan binde til og inhibere BLYS-binding til TACI, BAFF-R eller BCMA, eller inhiberer BLYS-signalering. Antistoffene omfattende et polypeptid kan være kimære, humaniserte eller humane. Antistoffene omfattende et polypeptid kan være et antistofffragment. Et antistoff kan alternativt produseres ved å immunisere et dyr med et polypeptid ifølge denne oppfinnelsen. Et antistoff rettet mot et polypeptid ifølge denne oppfinnelsen er således beskrevet heri.

Spesielt er antistoffer som er spesifikke for BLYS som binder innenfor en region av humant BLYS (SEQ ID NO: 8) omfattende restene 162–275 og/eller en omkringliggende aminosyre av aminosyrer valgt fra gruppen bestående av 162, 163, 206, 211, 231, 233, 264 og 265 av humant BLYS, beskrevet. Bindingen av antistoffene er slik at antistoffet sterisk hindrer BLYS-binding til én eller flere av dets reseptorer. Slike antistoffer er beskrevet i WO 02/02641 og WO 03/055979. Et særlig foretrukket antistoff er det beskrevet som lyfostat-B (Baker et al. (2003) Arthritis Rheum, 48, 3253–3265).

Betegnelsen "monoklonalt antistoff" betyr som anvendt heri et antistoff oppnådd fra en populasjon av i det vesentlige homogene antistoffer, dvs. at de enkelte antistoffer omfattende populasjonen er identiske med unntak av mulige naturlig forekommende mutasjoner som kan være til stede i mindre mengder.

Monoklonale antistoffer er svært spesifikke, idet de rettes mot et enkelt antigensted. I motsetning til konvensjonelle (polyklonale) antistoffremstillinger som typisk omfatter forskjellige antistoffer rettet mot forskjellige determinanter (epitoper), er hvert monoklonalt antistoff videre rettet mot en enkelt determinant på antigenet. I tillegg til sin spesifisitet er de monoklonale antistoffene fordelaktige fordi de syntetiseres av hybridomkulturen, ukontaminert av andre immunglobuliner. Adjektivet "monoklonal" angir antistoffets karakter som å være oppnådd fra en i det vesentlige homogen populasjon av antistoffer, og skal ikke tolkes som om det krever produksjon av antistoffet ved noen særlig fremgangsmåte. Monoklonale antistoffer kan for eksempel dannes ved hybridomfremgangsmåten først beskrevet av Kohler et al.,

Nature, 256: 1975 (495)) eller dannes ved rekombinante DNA-fremgangsmåter (se for eksempel US-patent nr. 4 816, 567). De "monoklonale antistoffene" kan også isoleres fra fagantistoffbiblioteker ved hjelp av for eksempel teknikkene beskrevet i Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991) og Marks et al., J. Mol.Biol., 222: 581-597 (1991).

De monoklonale antistoffene heri inkluderer spesifikt "kimære" antistoffer (immunglobuliner) hvori en del av den tunge og/eller lette kjeden er identisk med eller homolog med tilsvarende sekvenser i antistoffer avledet fra en særlig art eller tilhørende en særlig antistoffklasse eller -underklasse, mens resten av kjedene er identisk eller homolog med tilsvarende sekvenser i antistoffer avledet fra en annen art eller tilhørende en annen antistoffklasse eller -underklasse, samt fragmenter av slike antistoffer, så lenge de viser ønsket biologisk aktivitet (US-patent nr. 4 816, 567, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). Fremgangsmåter for fremstilling av kimære antistoffer er kjent i teknikken.

"Humaniserte" former av ikke-humane (f.eks. murine) antistoffer er kimære immunglobuliner, immunglobulinkjeder eller fragmenter derav (slik som Fv, Fab, Fab', F (ab')₂ eller andre antigenbindende undersekvenser av antistoffer) som inneholder minimal sekvens avledet fra ikke-humant immunglobulin.

For det meste er humaniserte antistoffer humane immunglobuliner (mottagerantistoff) hvori enheter fra en komplementær bestemmelsesregion (CDR) hos mottageren utbyttes med enheter fra en CDR hos en ikke-human art (donorantistoff), slik som mus, rotte eller kanin med ønsket spesifisitet, affinitet og kapasitet. I noen tilfeller er Fv-strukturregionrester (FR) av det humane immunglobulinet utbyttet med tilsvarende ikke-humane rester. Humaniserte antistoffer kan videre omfatte enheter som finnes verken i mottagerantistoffet eller i den importerte CDR-en eller strukturen. Disse modifikasjonene foretas for ytterligere å raffinere og maksimalisere antistoffytelsen. Det humaniserte antistoffet vil generelt i det vesentlige omfatte alle av minst ett, og typisk to, variable domener, hvori alle eller i det vesentlige alle de hypervariable sløyfene tilsvarer dem for et ikke-humant immunglobulin og alle eller i det vesentlige alle FR-regionene er dem fra en human immunglobulinsekvens, selv om FR-regionene kan inkludere én eller flere aminosyresubstitusjoner som forbedrer bindingsaffinitet. Antallet av disse aminosyresubstitusjonene i FR er typisk ikke

mer enn 6 i H-kjeden, og ikke mer enn 3 i L-kjeden. Det humaniserte antistoffet vil optimalt også omfatte minst en del av et immunglobulins konstante region (Fc), som typisk er den for et humant immunglobulin. Mer informasjon finnes i Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986), Reichmann et al., Nature, 332: 323-329 (1988) og Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992). Det humaniserte antistoffet inkluderer et PRIMATISERT antistoff hvori den antigenbindende regionen av antistoffet er avledet fra et antistoff produsert ved for eksempel å immunisere makakiaper med antigenet av interesse. Fremgangsmåter for fremstilling av humaniserte antistoffer er kjent i teknikken.

Humane antistoffer kan også fremstilles ved forskjellige teknikker som er kjent i teknikken, herunder fagvisningsbiblioteker. Hoogenboom and Winter, J. Mol.Biol., 227: 381 (1991), Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991). Teknikkene i Cole et al. og Boemer et al. er også tilgjengelige for fremstillingen av humane monoklonale antistoffer. Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, s. 77 (1985), Boemer et al., J. Immunol., 147(1) : 86-95 (1991).

"Funksjonelle fragmenter" av bindingsantistoffer er de fragmentene som bevarer binding til BlyS, TACI, BAFF-R eller BCMA med i det vesentlige samme affinitet som det intakte fullkjedede molekylet hvorfra de er avledet, og kan være i stand til å bryte ned B-celler som målt ved in vitro- eller in vivo-assayer, slik som dem beskrevet heri.

Betegnelsen "effektorfunksjoner" i forbindelse med antistoffer betyr deres biologiske aktiviteter som kan tilskrives Fc-regionen (en Fc-region med nativ sekvens eller en Fc-region med aminosyresekvensvariant) i et antistoff, og disse varierer med antistoffets isotype. Eksempler på antistoffeffektorfunksjoner omfatter: CIq-binding og komplementavhengig cytotoksitet, Fc-reseptorbinding, antistoffavhengig celledmediert cytotoksitet (ADCC), fagocytose, nedregulering av celleoverflatereseptorer (f.eks. B-cellereseptor) og B-celleaktivering.

"Antistoffavhengig celledmediert cytotoksitet" eller "ADCC" betyr en form for cytotoksitet hvori utskilt Ig bundet til Fc-reseptorer (FcR-er) er til stede på visse cytotoksiske celler (f.eks. naturlige drapsceller (NK-celler), neutrofiler og makrofager) gjør disse cytotoksiske effektorcellene i stand til å binde spesifikt til en antigenbærende målcelle og deretter drepe målcellen med cytotoksiner.

Antistoffene "bevæpner" de cytotoksiske cellene og er absolutt nødvendige for slik dreping. Primærcellene for mediering av ADCC, NK-celler, uttrykker bare FcγRIII, mens monocytter uttrykker FcγRI, FcγRII og FcγRIII. FcR-ekspressjon på hematopoietiske celler er sammenfattet i tabell 3 på side 464 i Ravetch and Kinet, Ann. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991). For å vurdere ADCC-aktivitet i et molekyl av interesse kan det utføres et ADCC-assay in vitro, slik som beskrevet i US-patent nr. 5 500 362 eller 5 821 337. Nyttige effektorceller for slike assayer omfatter mononukleære celler i perifert blod (PBMC) og naturlige drapsceller (NK). Alternativt eller dessuten kan det aktuelle molekylets ADCC-aktivitet vurderes in vivo, f.eks. i en dyremodell, slik som den som er beskrevet i Clynes et al. PNAS (USA) 95: 652-656 (1998).

"Komplementavhengig cytotoksitet" eller "CDC" betyr lysen av en målcelle i nærvær av komplement. Aktivisering av den klassiske komplementledningsveien initieres av den første komponentens binding i komplementsystemet (C1q) til antistoffer (av den relevante underklassen) som er bundet til deres beslektede antigen. For å vurdere komplementaktivisering kan det utføres et CDC-assay, f.eks. som beskrevet i Gazzano- Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996).

Et "isolert antistoff" er et som er identifisert og separert og/eller utvunnet fra en komponent i sitt naturlige miljø. Kontaminantkomponenter i sitt naturlige miljø er materialer som ville forstyrre diagnostiske eller terapeutiske anvendelser for antistoffet, og kan omfatte enzymer, hormoner og andre proteinholdige eller ikke-proteinholdige soluter. I foretrukne utførelsesformer vil antistoffet renses 1) til mer enn 95 vekt-% antistoff etter bestemmelse ved Lowry-metoden, og mest foretrukket mer enn 99 vekt-%, 2) til en tilstrekkelig grad til å oppnå minst 15 enheter av N-terminal eller intern aminosyresekvens ved anvendelse av en sekvenator med roterende kopp eller 3) til homogenitet ved SDS-side under reduserende eller ikke-reduserende forhold ved hjelp av coomassieblå eller foretrukket sølvfarge.

Isolert antistoff omfatter antistoffet in situ i rekombinante celler siden minst én komponent i antistoffets naturlige miljø ikke vil være til stede. Isolert antistoff vil imidlertid vanligvis bli fremstilt ved hjelp av minst ett rensetrinn.

Aminosyrer kan være gruppert etter likheter i egenskapene ved deres sidekjeder (in A. L. Lehninger, i Biochemistry, 2. utg., s. 73–75, Worth Publishers, New York (1975)) : (1) ikke-polar: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M) (2) uladet polar: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q) (3) sur: Asp (D), Glu (E) (4) basisk: Lys(K), Arg (R), His(H-). Alternativt kan naturlig forekommende rester være delt i grupper basert på felles sidekjedeegenskaper: 1) hydrofob: Norleucin, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) nøytral hydrofil: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) sur: Asp, Glu, (4) basisk: His, Lys, Arg, (5) rester som påvirker kjedeorientering: Gly, Pro, (6) aromatisk: Trp, Tyr, Phe.

Betegnelsen "konservativ" aminosyresubstitusjon betyr som anvendt innenfor denne oppfinnelsen aminosyresubstitusjoner som substituerer funksjonelt tilsvarende aminosyrer. Konservative aminosyreendringer resulterer i stille endringer i aminosyresekvensen for det resulterende peptidet. Én eller flere aminosyrer av en lignende polaritet fungerer for eksempel som funksjonelle ekvivalenter og resulterer i en stille endring innenfor peptidets aminosyresekvens. Substitusjoner innenfor en gruppe kan generelt anses som konservative med hensyn til struktur og funksjon. En fagmann vil imidlertid forstå at rollen for en særlig rest bestemmes av dens sammenheng innenfor den tredimensjonale strukturen til det molekylet hvori den forekommer. Cys-rester kan for eksempel forekomme i oksidert (disulfid) form, som er mindre polar enn den reduserte (tiol)formen. Den lange alifatiske delen av Arg-sidekjeden kan utgjøre et kritisk trekk ved dens strukturelle eller funksjonelle rolle, og denne kan best bevares ved substitusjon av en ikke-polar i stedet for en annen basisk rest. Det vil også forstås at sidekjeder inneholdende aromatiske grupper (Trp, Tyr og Phe) kan delta i ionisk-aromatiske eller "kation-pi"-interaksjoner. I disse tilfellene kan substitusjon av én av disse sidekjedene med et element fra den sure eller uladete polare gruppen være konservativ med hensyn til struktur og funksjon. Rester slik som Pro, Gly og Cys (disulfid form) kan ha direkte effekter på hovedkjedekonformasjonen og kan ofte ikke substitueres uten strukturelle forvrengninger.

"Prosentvis (%) aminosyresekvensidentitet" med hensyn til ligand- eller reseptorpolypeptidsekvensene identifisert heri er definert som prosentandelen av aminosyrerester i en kandidatsekvens som er identisk med aminosyrerestene i en slik ligand- eller reseptorsekvens identifisert heri, etter sammenstilling av sekvensene og eventuelt tilføyning av mellomrom for å oppnå den maksimale

prosentsekvensidentiteten, og uten å ta hensyn til eventuelle konservative substitusjoner som del av sekvensidentiteten. Sammenstilling for bestemmelse av prosentvis aminosyresekvensidentitet kan oppnås på forskjellige måter som er innenfor teknikken, f.eks. ved hjelp av offentlig tilgjengelig datamaskinprogramvare, slik som programvarene BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 eller Megalign (DNASTAR). En fagmann kan bestemme egnede parametere for måling av sammenstilling, herunder eventuelle algoritmer som er nødvendige for å oppnå maksimal sammenstilling over den fulle lengden av sekvensene som sammenlignes. Prosentvise verdier for aminosyresekvensidentitet oppnås imidlertid i denne sammenhengen som beskrevet nedenfor ved hjelp av dataprogrammet for sekvenssammenligning ALIGN-2, hvori den fullstendige kildekoden for ALIGN-2-programmet er tilveiebrakt i tabellen nedenfor. Dataprogrammet for sekvenssammenligning ALIGN-2 ble utviklet av Genentech, Inc., og kildekoden angitt i tabellen nedenfor er inngitt med brukerdokumentasjon ved det amerikanske kontoret for opphavsrett, Washington D.C., 20559, hvor det er registrert under US-registreringsnummer for opphavsrett TXU510087. ALIGN-2-programmet er offentlig tilgjengelig gjennom Genentech, Inc., South San Francisco, California eller kan kompiles fra kildekoden tilveiebrakt i tabellen nedenfor. ALIGN-2-programmet bør kompiles for anvendelse på et UNIX-operativsystem, foretrukket digitalt UNIX V4.0D. Alle sekvenssammenligningsparameterne er angitt av ALIGN-2-programmet og kan ikke endres.

En nyttig fremgangsmåte for identifikasjon av visse rester eller regioner i et protein som er foretrukne steder for mutagenese, kalles "alaninskanningsmutagenese", som beskrevet av Cunningham and Wells Science, 244: 1081-1085 (1989). En rest eller gruppe av målrester identifiseres (f.eks. ladde rester slik som arg, asp, his, lys og glu) og utbyttes med en nøytral eller negativt ladet aminosyre (mest foretrukket alanin eller polyalanin) for å påvirke interaksjonen av aminosyrene med et bindingsmål. De aminosyreplasseringene som viser funksjonell sensitivitet overfor substitusjonene, raffineres deretter ved introduksjon av ytterligere eller andre varianter ved, eller for, substitusjonsstedene. Selv om stedet for introduksjon av en aminosyresekvensvariasjon forhåndsbestemmes, behøver således ikke mutasjonens teknikk i seg selv å forhåndsbestemmes. For å analysere mutasjonens ytelse ved et bestemt sted utføres for eksempel ala-skanning eller

tilfeldig mutagenese ved målkodonet eller -regionen, og de uttrykte variantene screenes for ønsket aktivitet.

Betegnelsen "toplansvinkel" betyr en rotasjon rundt en binding. Se for eksempel
 5 Creighton, T. E., (1993) Protein: Structures and Molecular Properties, 2. utg., W. H. Freeman and Company, New York, NY. Betegnelsen "phi" er en toplansvinkel som betegner en rotasjon rundt en aminosyres N-C-binding. Se for eksempel
 Creighton, T. E., (1993) Protein: Structures and Molecular Properties, 2. utg., W. H. Freeman and Company, New York, NY. Type I-beta-svinger er beskrevet i
 10 Hutchinson, E. G. & Thornton, J. M. (1994) A revised set of potentials for beta turn formation in proteins. Protein Science 3, 2207–2216.

Et "fusjonsprotein" og et "fusjonspolypeptid" betyr et polypeptid hvor to
 porsjoner er kovalent bundet sammen, hvor hver av delene er et polypeptid med
 15 en forskjellig egenskap. Egenskapen kan være en biologisk egenskap, slik som aktivitet in vitro eller in vivo. Egenskapen kan også være en enkel kjemisk eller fysisk egenskap, slik som binding til et mål molekyl, katalyse av en reaksjon osv. De to delene kan være bundet direkte ved en enkelt peptidbinding eller gjennom en peptidlinker inneholdende én eller flere aminosyrerester. De to delene og
 20 linkeren vil generelt være samme avlesningsramme.

Et "konjugat" betyr et hvilket som helst hybridmolekyl, inkludert
 fusjonsproteiner og molekyler som inneholder både aminosyre- eller
 proteinporsjoner og ikke-proteinporsjoner. Konjugater kan syntetiseres ved
 25 forskjellige teknikker som er kjent i teknikken, inkludert for eksempel rekombinante DNA-teknikker, fastfasesyntese, løsningsfasesyntese, teknikker for organisk kjemi/syntese eller en kombinasjon av disse teknikkene. Valget av syntese vil avhenge av det særlige molekylet som skal genereres. Et hybridmolekyl som ikke er helt "protein" av natur, kan for eksempel syntetiseres
 30 ved en kombinasjon av rekombinante teknikker og løsningsfaseteknikker.

Som anvendt heri betyr betegnelsen "Fc-fusjonsprotein" antistofflignende
 molekyler som kombinerer et heterologt proteins bindingsspesifisitet med
 effektorfunksjonene til immunglobulinets konstante domener. Fc-
 35 fusjonsproteinene omfatter strukturelt en fusjon av en aminosyresekvens med ønsket bindingsspesifisitet som er en annen enn antigengjenkjenningen og bindingsstedet for et antistoff (dvs. er "heterolog"), og en sekvens i et

immunglobulins konstante domene. Fc-fusjonsproteinmolekylet inkluderer typisk en kontinuerlig aminosyresekvens omfattende minst bindingsstedet for en reseptor eller en ligand. Sekvensen i immunglobulinets konstante domene i Fc-fusjonsproteinet kan oppnås fra ethvert immunglobulin, slik som undertypene IgG-1, IgG-2, IgG-3 eller IgG-4, IgA (omfattende IgA-1 og IgA-2), IgE, IgD eller IgM. Nyttige Fc-fusjonsproteiner ifølge denne oppfinnelsen er for eksempel polypeptider som omfatter BLyS-bindingsdelene av en BLyS-reseptor uten de transmembrane eller cytoplasmiske sekvensene av BLyS-reseptoren. I en utførelsesform er det ekstracellulære domenet i BAFF-R, TACI eller BCMA fusjonert til et konstant domene i en immunglobulinsekvens.

Betegnelsen "pattedyr" betyr et hvilket som helst dyr klassifisert som et pattedyr, inkludert mennesker, husdyr, gårdsdyr, dyrehagedyr, dyr som brukes til idrett, eller kjæledyr, slik som hunder, hester, katter, kyr osv. Pattedyrene heri er foretrukket et menneske.

Betegnelsen "terapeutisk virkningsfull mengde" betyr en mengde av et antistoff- eller et antagonistmiddel som er virkningsfull for å "lindre" eller "behandle" en sykdom eller lidelse hos en pasient eller et pattedyr. Ved kreft kan den terapeutisk virkningsfulle mengden av legemiddelet redusere antallet kreftceller, redusere tumorstørrelsen, inhibere (dvs. til en viss grad bremse og foretrukket stoppe) kreftcelleinfiltrasjon i perifere organer, infiltrere (dvs. til en viss grad bremse og fortrinnsvis stoppe) tumormetastase, til en viss grad hemme tumorvekst og/eller til en viss grad lindre én eller flere av symptomene assosiert med kreft. Se definisjonen av "behandlet" nedenfor. I den grad legemiddelet kan forhindre vekst og/eller drepe eksisterende kreftceller, kan det være cytostatisk og/eller cytotoxisk.

BLyS eller BLyS-reseptorantistoffer kan produseres ved kortvarige eller stabile transfeksjonseukaryotiske vertsceller slik som CHO-celler.

"Bærere" som anvendt heri inkluderer farmasøytisk akseptable bærere, eksipienter eller stabiliseringsmidler som er ikke-toksiske for cellen eller pattedyret som eksponeres derfor ved de anvendte dosene og konsentrasjonene. Den fysiologisk akseptable bæreren er ofte en vandig pH-bufret løsning. Eksempler på fysiologisk akseptable bærere omfatter buffere slik som fosfat, citrat og andre organiske syrer, antioksidanter omfattende askorbinsyre, polypeptid med lav molekylvekt (mindre enn ca. 10 rester), proteiner slik som

serumalbumin, gelatin eller immunglobuliner, hydrofile polymerer slik som polyvinylpyrrolidon, aminosyrer slik som glycin, glutamin, asparagin, arginin eller lysin, monosakkarider, disakkarider og andre karbohydrater omfattende glukose, mannose eller dekstriner, kelaterende stoffer slik som EDTA, sukkeralkoholer slik som mannitol eller sorbitol, saltdannende motioner slik som natrium og/eller ikke-ioniske surfaktanter slik som TWEEN™, polyetylglykol (PEG) og PLURONICS™.

Polynukleotider, vektorer, vertsceller

Ifølge atskillige utførelsesformer beskrevet heri kan BLyS-antagonisten definert i kravene omfatte spesifikke polypeptider som er produsert ved hjelp av spesifikke polynukleotider i spesifikke vektorer og ved hjelp av spesifikke vertsceller. De forskjellige polypeptidtypene ifølge den foreliggende oppfinnelsen er reseptorbaserte sekvenser som binder BLyS og ble isolert eller avledet fra domener av reseptor-TACI, som binder BLyS in vivo. Antistoffbaserte sekvenser er dem som er produsert ved hjelp av antistoffutviklingsteknologi og opprettholder de generelle strukturene til et antistoffmolekyl. Eksempler på antistoffbaserte sekvenser er lymfostat-B eller antistoffer mot reseptorer av BLyS. Eksempler på de kunstige bindingssekvensene inkluderer de 17-mere peptidene beskrevet heri, polypeptider som inkorporerer ett eller flere 17-mere peptider som kjerneregioner, og kovalent modifiserte former av 17-mere peptidene og polypeptidene (f.eks. Fc-fusjonsproteiner, merkede polypeptider, beskyttede polypeptider, konjugerte polypeptider, fusjonsproteiner osv.). Forskjellige teknikker som er benyttet for fremstilling av disse formene for polypeptider, er beskrevet heri. Fremgangsmåter for merking av polypeptider og konjugasjon av molekyler til polypeptider er kjent i teknikken.

Sammensetninger ifølge oppfinnelsen kan fremstilles ved hjelp av rekombinante teknikker som er kjent i teknikken.

Beskrivelsen nedenfor vedrører fremgangsmåter for produksjon av slike spesifikke polypeptider ved dyrking av vertsceller transformert eller transfektert med en vektor inneholdende den kodende nukleinsyren og gjenvinning av polypeptidet fra cellekulturen. (Se for eksempel Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,

1989), Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)).

5 Nukleinsyren (f.eks. cDNA-orgenomisk DNA) som koder for det ønskede polypeptidet, kan være satt inn i en replikerbar vektor for ytterligere kloning (amplifikasjon av DNA-et) eller for ekspresjon. Forskjellige vektorer er offentlig tilgjengelige. Vektorkomponentene omfatter vanligvis blant annet én eller flere av følgende: en signalsekvens, et replikasjonsorigin, én eller flere markørgener, et enhancerelement, en promotor og en transkripsjonstermineringssekvens, hvor
10 hver er beskrevet nedenfor. Eventuelle signalsekvenser, replikasjonsoriginer, markørgener, enhancerelementer og transkripsjonsterminatorsekvenser som kan benyttes, er kjent i teknikken og beskrevet nærmere i WO 97/25428.

15 Ekspresjons- og kloningsvektorer inneholder vanligvis en promoter som gjenkjennes av vertsorganismen, og er operativt bundet til den kodende nukleinsyresekvensen. Promotere er utranslaterte sekvenser plassert oppstrøms (5') for startkodonet i et strukturelt gen (generelt innenfor ca. 100 til 1000 bp) som kontrollerer transkripsjonen og translasjonen av en særlig nukleinsyresekvens, hvortil de er operativt bundet. Slike promotorer deles typisk
20 inn i to klasser, inducible og konstitutive. Inducible promotere er promotere som initierer økte nivåer av transkripsjon fra DNA under deres kontroll som svar på en viss endring i kulturbetingelser, f.eks. nærværet eller fraværet av et næringsmiddel eller en endring i temperatur. På dette tidspunktet er et stort antall av promotere gjenkjent av forskjellige potensiale vertsceller velkjent.
25 Disse promoterne er operativt bundet til det kodende DNA-et ved å fjerne promoteren fra kilde-DNA-et ved restriksjonsenzymnedbryting og innsetting av den isolerte promotersekvensen i vektoren.

30 Konstruksjon av egnede vektorer inneholdende én eller flere av de ovenfor angitte komponentene benytter standard ligeringsteknikker. Isolerte plasmider eller DNA-fragmenter spaltes, skreddersys, andre-ligeres i den ønskede formen for å generere de nødvendige plasmidene. For analyse for å bekrefte riktige sekvenser i konstruerte plasmider kan ligeringsblandingen anvendes til å transformere E. coli K12-stamme 294 (ATCC 31,446) og vellykkede transformanter valgt ved ampicillin- eller tetrasyklinresistens der det er relevant.
35 Plasmider fra transformantene fremstilles, analyseres ved restriksjonsendonukleasenedbryting og/eller sekvenseres ved hjelp av

standardteknikker som er kjent i teknikken. [Se for eksempel Messing et al., *Nucleic Acids Res.*, 9: 309 (1981), Maxam et al., *Methods in Enzymology*, 65: 499 (1980)].

5 Det kan benyttes ekspresjonsvektorer som tilrettelegger for den kortvarige ekspresjonen i pattedyrceller av det kodende DNA-et. Kortvarig ekspresjon involverer generelt anvendelse av en ekspresjonsvektor som er i stand til å replikere effektivt i en vertscelle, slik at vertscellen akkumulerer mange kopier av ekspresjonsvektoren, og i neste omgang syntetiserer høye nivåer av et
10 ønsket polypeptid kodet av ekspresjonsvektoren [Sambrook et al., ovenfor]. Kortvarige ekspresjonssystemer, omfattende en egnet ekspresjonsvektor og en vertscelle, gir mulighet for den praktiske positive identifikasjonen av polypeptider kodet av klonede DNA-er, samt for den hurtige screeningen av slike polypeptider for ønskede biologiske eller fysiologiske egenskaper.

15 Andre fremgangsmåter, vektorer og vertsceller som er egnet for tilpasning til syntesen av det ønskede polypeptidet i rekombinant virveldyrcekkultur, er beskrevet i Gething et al., *Nature*, 293: 620-625 (1981), Mantei et al., *Nature*, 281: 40-46 (1979), EP 117 060 og EP 117 058.

20 Egnede vertsceller for kloning eller ekspresjon av DNA-et i vektorene heri inkluderer prokaryot-, gjær- eller høyere eukaryotceller. Egnede prokaryoter for dette formålet inkluderer, men er ikke begrenset til, eubakterier, slik som gramnegative eller grampositive organismer, f.eks. *Enterobacteriaceae* slik som
25 *Escherichia*, f.eks. *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, f.eks. *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, f.eks. *Serratia marcescans* og *Shigella*, samt *Bacilli* slik som *B. subtilis* og *B. licheniformis* (f.eks. *B. licheniformis* 41P beskrevet i DD 266 710 publisert 12. april 1989), *Pseudomonas* slik som *P. aeruginosa* og *Streptomyces*. Vertscellen bør foretrukket utskille minimale
30 mengder av proteolytiske enzymer.

I tillegg til prokaryoter er eukaryotiske mikrober slik som filamentøs sopp eller gjær egnede klonings- eller ekspresjonsverter for vektorer. Egnede vertsceller for ekspresjon av glykosylert polypeptid er avledet fra flercellulære organismer.
35 Eksempler på alle slike vertsceller er beskrevet nærmere i W0 97/25428.

Vertsceller transfekteres og transformeres foretrukket med de ovennevnte ekspresjons- eller kloningsvektorene og dyrkes i næringsmedium modifisert som relevant for induksjon av promotorer, seleksjon av transformanter eller amplifikasjon av genene som koder for ønskede sekvenser.

5

Transfeksjon betyr en vertscelles opptak av en ekspresjonsvektor, uansett om noen kodingssekvenser faktisk er uttrykt eller ikke. Atskillige fremgangsmåter for transfeksjon er kjent for fagmannen, f.eks. CaP04 og elektroporering. Vellykket transfeksjon gjenkjennes generelt når en eventuell indikasjon på

10

Transformasjonsmiddel som introduserer DNA til en organisme slik at DNA-et er replikerbart, enten som et ekstrakromosomalt element eller ved kromosomintegrering. Avhengig av den anvendte vertscellen utføres transformasjon ved hjelp av standardteknikker som er egnet for slike celler. Kalsiumbehandlingen som anvender kalsiumklorid, som beskrevet i Sambrook et al., ovenfor, eller elektroporering anvendes generelt for prokaryoter eller andre celler som inneholder betydelige celleveggbarrierer. Infeksjon med *Agrobacterium tumefaciens* anvendes til transformasjon av visse planteceller, som beskrevet i Shaw et al., *Gene*, 23: 315 (1983) og WO 89/05859 publisert 29. juni 1989. I tillegg kan planter transfekteres ved hjelp av ultralydbehandling som beskrevet i WO 91/00358 publisert 10. januar 1991.

15

20

25

30

35

For pattedyrceller uten slike cellevegger kan fremgangsmåten for kalsiumfosfatutfelling i Graham and van der Eb, *Virology*, 52: 456-457 (1978) benyttes. Generelle aspekter ved vertssystemtransformasjoner av pattedyrceller er beskrevet i US-pat. nr. 4 399 216. Transformasjoner til gjær utføres typisk ifølge fremgangsmåten i Van Solingen et al., *J. Bact.*, 130: 946 (1977) og Hsiao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 3829 (1979). Andre fremgangsmåter for introduksjon av DNA til celler, slik som ved nukleær mikroinjeksjon, elektroporering, bakteriell protoplastfusjon med intakte celler eller polykationer, f.eks. polybren, polyomitin, kan imidlertid også anvendes. Forskjellige teknikker for omdannelse av pattedyrceller er beskrevet i Keown et al., *Methods in Enzymology*, 185: 527-537 (1990) og Mansour et al., *Nature*, 336: 348-352 (1988).

- Prokaryotiske celler kan dyrkes i egnede kulturmedier som beskrevet generelt i Sambrook et al., ovenfor. Eksempler på kommersielt tilgjengelige kulturmedier inkluderer Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ("MEM", Sigma), RPMI-1640 (Sigma) og Dulbeccos Modified Eagle's Medium ("DMEM", Sigma). Alle slike medier kan etter behov suppleres med hormoner og/eller andre vekstfaktorer (slik som insulin, transferrin eller epidermalvekstfaktor), salter (slik som natriumklorid, kalsium, magnesium og fosfat), buffere (slik som HEPES), nukleosider (slik som adenosinandhymidin), antibiotika (slik som gentamycin), sporlementer (definert som uorganiske forbindelser vanligvis til stede ved sluttkonsentrasjoner i temikromolart område) og glukose eller en tilsvarende energikilde. Alle andre nødvendige supplementer kan også være inkludert ved egnede konsentrasjoner som vil være kjent for fagmannen. Dyrkingsforholdene, slik som temperatur, pH og lignende, er dem som er tidligere anvendt med vertscellen valgt for ekspresjon og vil være åpenbare for fagmannen.
- Prinsipper, protokoller og praktiske teknikker for maksimering av produktiviteten for pattedyrcellekulturer kan finnes i Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991).
- De uttrykte polypeptidene kan gjenvinnes fra kulturmediet som et utskilt polypeptid, selv om det også kan gjenvinnes fra vertscellelysater når det produseres direkte uten utskillingssignal. Hvis polypeptidet er membranbundet, kan det frisettes fra membranen ved hjelp av en egnet detergentløsning (f.eks. Triton-X 100) eller dens ekstracellulære region kan frisettes ved enzymatisk spalting.
- Når polypeptidet produseres i en annen rekombinant celle enn en av human opprinnelse, er den uten proteiner eller polypeptider av human opprinnelse. Det er imidlertid vanligvis nødvendig å gjenvinne eller rense polypeptidet fra rekombinante celleproteiner eller polypeptider for å oppnå fremstillinger som er i det vesentlige homogene. Som et første trinn kan kulturmediet eller lysatet sentrifugeres for å fjerne partikkelcellerester. Følgende prosedyrer er eksempler på egnede renseprosedyrer: ved fraksjonering på en ionebyttekolonne, etanolutfelling, HPLC med omvendt fase, kromatografi på silika eller på en kationbytteharpiks slik som DEAE, kromatofokusering, SDS-PAGE, ammoniumsulfatutfelling, gelfiltrering ved hjelp av for eksempel Sephadex G-75 og protein A-sefaroskolonner for å fjerne kontaminenter, slik som IgG.

Fagvisning

Ifølge noen utførelsesformer er polypeptidene ifølge denne oppfinnelsen valgt fra gruppen bestående av: Formel I, formel II, formel III, ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEQ ID NO :13), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEQ ID NO:14), ECFDLLVRRWVPCMLG (SEQ ID NO:15), ECFDLLVRSWVPCHMLR (SEQ ID NO:16), ECFDLLVRHWVACGLLR (SEQ ID NO:17) og sekvenser angitt på FIG. 32 i WO 05/000351 kan benyttes i fagvisning.

Anvendelse av teknikkene for fagvisning gir mulighet for dannelselse av store biblioteker av proteinvarianter som kan sorteres raskt for de sekvensene som binder til et målmolekyl med høy affinitet. Nukleinsyrer som koder for polypeptidvarianter, fusjoneres til en nukleinsyresekvens som koder for et viralt kappeprotein, slik som gen-III-proteinet eller gen-VIII-proteinet. Monovalente fagsystemer hvor nukleinsyresekvensen som koder for proteinet eller polypeptidet, fusjoneres til en nukleinsyresekvens som koder for en del av det gen-III-proteinet som er utviklet. (Bass, S., Proteins, 8: 309 (1990), Lowman and Wells, Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 3: 205 (1991)). I et monovalent fagvisningssystem uttrykkes genfusjonen ved lave nivåer, og villtype-gen-III-proteiner uttrykkes også slik at partiklenes infektivitet beholdes. Fremgangsmåter for dannelselse av peptidbiblioteker og screening av bibliotekene er beskrevet i mange patenter (f.eks. U. S. patent nr. 5 723 286, US-patent nr. 5 432 018, US-patent nr. 5 580 717, US-patent nr. 5 427 908 og US-patent nr. 5 498 530).

I noen utførelsesformer er formel I, formel II eller formel III uttrykt som peptidbiblioteker på fag. Faget som uttrykker polypeptidbiblioteket med formel I, formel II eller formel III, utsettes deretter for seleksjon basert på BLYS-binding. I noen utførelsesformer involverer seleksjonsprosessen å la noen fag binde til biotinyllert BLYS som senere bindes til en neutravidinplate. Fag bundet til platen gjennom BLYS-biotin-neutravidinbindingen gjenvinnes og propageres. I noen utførelsesformer utsettes faget for flere seleksjonsrunder. I noen utførelsesformer inkuberes faget med BLYS-biotin, etterfulgt av tilsetningen av ikke-biotinyllert BLYS som et kompetitivt bindemiddel.

Ytterligere veiledning i anvendelse av fagvisning i sammenheng med den foreliggende oppfinnelsen er tilveiebrakt i eksemplene.

Polypeptider fusjonert eller konjugert til heterologe polypeptider

5

Fc-fusjonsproteinmolekyler omfattende polypeptidene ifølge denne oppfinnelsen er ytterligere tenkt for anvendelse i fremgangsmåtene heri. I noen utførelsesformer omfatter molekylet en fusjon av et polypeptid ifølge denne oppfinnelsen med et immunglobulin eller en særlig region av et immunglobulin. For en bivalent form av Fc-fusjonsproteinet omfatter vanligvis en slik fusjon Fc-regionen av et IgG-molekyl. I en ytterligere utførelsesform er Fc-regionen fra et humant IgG1-molekyl. I noen utførelsesformer inkluderer immunglobulinfusjonen hengselen, CH2 og CH3, eller hengselen, CH1-, CH2- og CH3-regioner i et IgG1-molekyl.

10

15

Produksjonen av immunglobulinfusjoner er også angitt i US-patent nr. 5 428 130, US-patent nr. 5 843 725, US-patent nr. 6 018 026 og Chamow et al., TIBTECH, 14: 52-60 (1996).

20

Den enkleste og mest ukompliserte Fc-fusjonsproteinmetoden kombinerer ofte bindingsdomenet i et antagonistpolypeptid ifølge denne oppfinnelsen, foretrukket en nativ sekvens, med Fc-regionen i et immunglobulins tungkjede. I en annen utførelsesform kan polypeptidet være kunstig, slik som et polypeptid omfattende en sekvens med formel I, formel II, formel III, ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEQ ID NO: 13), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEQ ID NO: 14), ECFDLLVRRWVPCEMLG (SEQ ID NO: 15), ECFDLLVRSWVPCHMLR (SEQ ID NO: 16), ECFDLLVRHWVACGLLR (SEQ ID NO: 17) eller sekvenser angitt på FIG. 32 kan være kovalent bundet til en Fc-del av et immunglobulin. Ett eller flere av disse polypeptidene kan i tillegg være bundet til hverandre og bundet til en Fc-del av et immunglobulin.

25

30

Når Fc-fusjonsproteinene fremstilles ifølge den foreliggende oppfinnelsen, vil vanligvis nukleinsyren som koder for bindingsdomenet være fusjonert C-terminalt til nukleinsyren som koder for N-terminalen av et immunglobulins konstante domenesekvens. N-terminalfusjoner er imidlertid også mulig.

35

I slike fusjoner vil typisk det kodede kimære polypeptidet bevare minst funksjonelt aktive hengsel-, CH2- og CH3-domener av den konstante regionen i et immunglobulins tungkjede. Fusjoner foretas også til C-terminalen av Fc-delen av et konstant domene, eller umiddelbart N-terminalt for CH1 i tungkjeden eller den tilsvarende regionen i lett kjeden. Det nøyaktige stedet hvor fusjonen foretas, er ikke kritisk. Bestemte steder er velkjente og kan velges for å optimalisere Fc-fusjonsproteinets biologiske aktivitet, utskillelse eller bindingsegenskaper.

I en foretrukket utførelsesform er bindingsdomenesekvensen fusjonert til N-terminalen av Fc-regionen i immunglobulin G1 (IgG1). Det er mulig å fusjonere hele den tunge kjedens konstante region til bindingsdomenesekvensen. Mer foretrukket anvendes det imidlertid i fusjonen en sekvens som starter i hengselsregionen like oppstrøms for papain-spaltingsstedet som definerer IgG Fc kjemisk (dvs. rest 216, forutsatt at den første resten av den tunge kjedens konstante region er 114), eller analoge steder i andre immunglobuliner. I en særlig foretrukket utførelsesform er bindingsdomeneamminosyresekvensen fusjonert til (a) hengselsregionen og CH2- og CH3- eller (b) CH1-, hengsel-, CH2- og CH3-domene i en IgG-tungkjede.

For bispesifikke Fc-fusjonsproteiner er Fc-fusjonsproteinene sammenstilt som multimerer, og særlig som heterodimerer eller heterotetramerer. Disse sammenstilte immunglobulinene vil generelt ha kjente enhetsstrukturer. En grunnleggende firekjedet strukturell enhet er formen hvori IgG, IgD og IgE finnes. En firekjedet enhet gjentas i immunglobulinene med høyere molekylvekt. IgM finnes generelt som en pentamer av fire grunnleggende enheter holdt sammen av disulfidbindinger. IgA-globulin, og av og til IgG-globulin, kan også finnes i multimer form i serum. Når det gjelder multimer, kan hver av de fire enhetene være like eller forskjellige.

Forskjellige eksempler på sammenstilte Fc-fusjonsproteiner innenfor omfanget heri er skjematisk vist i diagrammet nedenfor: (a) ACL-ACL, (b) ACH- (ACH, ACL-ACH, ACL-VHCH eller VLCL-ACH), (c) ACL-ACH- (ACL-ACH, ACL-VHCH, VLCL-ACH eller VLCL-VHCH) (d) ACL-VHCH- (ACH eller ACL-VHCH eller VLCL-ACH), (e) VLCL-ACH- (ACL-VHCH eller VLCL-ACH) og (f) (A-Y) n- (VLCL-VHCH) 2, hvori hver A representerer identiske eller forskjellige polypeptider omfattende en aminosyresekvens med sekvenser avledet fra BLyS-reseptordomener, sekvenser

avledet fra antistoffer mot BLYS eller mot reseptorer til BLYS, eller kunstige sekvenser slik som formel I, formel II, formel III, ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEQ ID NO 5), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEQ ID NO 6), ECFDLLVRRWVPCEMLG (SEQ ID NO 7), ECFDLLVRSWVPCHMLR (SEQ ID NO 8), ECFDLLVRHWVACGLLR (SEQ ID NO 9), eller sekvenser angitt på fig. 32 eller kombinasjoner derav,

VL er et immunglobulins lette kjedes variable domene, VH er et immunglobulins tunge kjedes variable domene, CL er et immunglobulins lette kjedes konstante domene, CH er et immunglobulins tunge kjedes konstante domene, n er et heltall større enn 1, Y betegner resten av et kovalent kryssbindingsmiddel.

For korthetens skyld viser de foregående strukturene bare hovedtrekkene. De angir ikke binding (J) eller andre domener av immunglobulinene, og heller ikke disulfidbindinger er vist. Hvor slike domener er påkrevd for bindingsaktivitet, skal de imidlertid konstrueres for å være til stede på de vanlige stedene som de opptar i immunglobulinmolekylene.

Fc-sekvensene kan imidlertid settes inn mellom immunglobulinets tungkjede- og lettkjedesekvenser, slik at et immunglobulin omfattende en kimær tungkjede oppnås. I denne utførelsesformen er Fc-sekvensene fusjonert til 3'-enden av et immunglobulins tungkjede i hver arm av et immunglobulin, enten mellom hengsel- og CH2-domenet, eller mellom CH2- og CH3-domenene. Lignende konstruksjoner er rapportert i Hoogenboom et al., Mol. Immunol., 28: 1027-1037 (1991).

Selv om nærværet av et immunglobulins lettkjede ikke er påkrevd i Fc-fusjonsproteinene ifølge den foreliggende oppfinnelsen, kan et immunglobulins lettkjede være til stede enten kovalent assosiert til et bindingsdomene-immunglobulins tungkjede-fusjonspolypeptid, eller direkte fusjonert til bindingsdomenet. I førstnevnte tilfellet uttrykkes DNA som koder for et immunglobulins lettkjede, typisk samtidig med DNA-et som koder for bindingsdomene-immunglobulinets tungkjede-fusjonsprotein. Ved utskillelse vil den hybride tungkjeden og lettkjeden være kovalent assosiert for å tilveiebringe en immunglobulinlignende struktur omfattende to disulfidbundne immunglobuliners tungkjede-lettkjede-par. Fremgangsmåter som er egnet til fremstilling av slike strukturer, er for eksempel beskrevet i US-patent nr. 4 816 567, utgitt 28. mars 1989.

Fc-fusjonsproteiner konstrueres mest praktisk ved å fusjonere cDNA-sekvensen som koder for bindingsdomeneporsjonen, i strukturen til et immunglobulins cDNA-sekvens. Det kan imidlertid også anvendes fusjon til genomiske immunglobulinfragmenter (se for eksempel Aruffo et al., Cell, 61: 1303-1313 (1990) og Stamenkovic et al., Cell, 66: 1133-1144 (1991)). Sistnevnte fusjonstype krever nærvær av Ig-regulerende sekvenser for ekspresjon. cDNAs som koder for IgGs tunge kjedes konstante regioner, kan isoleres basert på publiserte sekvenser fra cDNA-biblioteker avledet fra milt eller perifere blodlymfocytter, ved hybridisering eller ved PCR-teknikker (PCR, polymerasekjedereaksjon). cDNAs som koder for bindingsdomenet og immunglobulindelene av Fc-fusjonsproteinet, settes inn sammen i en plasmidvektor som retter effektiv ekspresjon i de valgte vertscellene.

Det er foretatt særlige modifikasjoner for å produsere Fc-sekvenser som er nyttige for å opprette fusjonsmolekyler slik som BLYS-antagonist-Fc-fusjonsmolekylene til anvendelse ifølge den foreliggende oppfinnelsen. Seks versjoner av et modifisert humant IgG1 Fc ble spesifikt generert for å opprette Fc-fusjonsproteiner, og kalles Fc-488 samt Fc4, Fc5, Fc6, Fc7 og Fc8. Fc-488 (SEQ ID NO: 39) ble opprettet for praktisk kloning av et fusjonsprotein inneholdende den humane $\gamma 1$ Fc-regionen, og det ble konstruert ved hjelp av humant villtype-immunglobulin $\gamma 1$ s konstante region som templat. Bekymringer om mulige skadelige effekter på grunn av en uparet cysteinrest førte til avgjørelsen om å erstatte cysteinet som normalt disulfidbinder med immunglobulinets lette kjedes konstante region med en serinrest. En ytterligere endring ble introdusert ved kodonet som koder for EU-indeksposisjon 218 for å introdusere et BglII-restriksjonsenzymgjenkjenningssted for å lette fremtidige DNA-manipuleringer. Disse endringene ble introdusert i PCR-produktet kodet på PCR-primerne. På grunn av BglII-stedets plassering og for å komplettere Fc-hengselsregionen ble kodoner for EU-indeksposisjonene 216 og 217 inkorporert i fusjonsproteinets partnersekvenser.

Fc4, Fc5 og Fc6 inneholder mutasjoner for å redusere effektorfunksjoner medierte av Fc ved å redusere Fc γ RI-binding og komplementær C1q-binding. Fc4 inneholder de samme aminosyresubstitusjonene som ble introdusert i Fc-488. Ytterligere aminosyresubstitusjoner ble introdusert for å redusere mulige Fc-medierte effektorfunksjoner. Tre aminosyresubstitusjoner ble spesifikt

introdusert for å redusere FcγRI-binding. Disse er substitusjonene ved EU-indeksposisjonene 234, 235 og 237. Substitusjoner ved disse posisjonene er påvist å redusere binding til FcγRI (Duncan et al., Nature 332:563 (1988)). Disse aminosyresubstitusjonene kan også redusere FcγRIIa-binding samt FcγRIII-binding (Sondermann et al., Nature 406:267 (2000), Wines et al., J. Immunol. 164:5313 (2000)).

Flere grupper har beskrevet relevansen ved EU-indeksposisjonene 330 og 331 (aminosyrerester 134 og 135 i SEQ ID NO:6) for komplementær C1q-binding og etterfølgende komplementfiksering (Canfield and Morrison, J. Exp. Med. 173:1483 (1991), Tao et al., J. Exp. Med. 178:661 (1993)). Aminosyresubstitusjoner ved disse posisjonene ble introdusert i Fc4 for å redusere komplementfiksering. C_{H3}-domenet i Fc4 er identisk med det i tilsvarende villtype-polypeptid, med unntak av stoppkodonet, hvilket ble endret fra TGA til TAA for å eliminere mulige dammetyleringssteder når klonede DNA-et dyrkes i dam pluss E. coli-stammer.

I Fc5 ble argininresten ved EU-indeksposisjon 218 mutert tilbake til et lysin, siden BgIII-kloningsskjemaet ikke ble anvendt i fusjonsproteinene inneholdende denne særlige Fc. Resten av Fc5-sekvensen matcher beskrivelsen ovenfor for Fc4.

Fc6 er identisk med Fc5, bortsett fra at det karboksylterminale lysinkodonet er eliminert. Det C-terminale lysinet i modne immunglobuliner fjernes ofte fra modne immunglobuliner posttranslasjonalt før utskillelse fra B-celler, eller fjernes under serumsirkulasjon. Den C-terminale lysinresten finnes derfor typisk ikke på sirkulerende antistoffer. Som i Fc4 og Fc5 ovenfor ble stoppkodonet i Fc6-sekvensen endret til TAA.

Fc7 er identisk med villtype-γ1 Fc unntatt for en aminosyresubstitusjon ved EU-indeksposisjon 297 plassert i C_{H2}-domenet. EU-indeksposisjon Asn-297 er et sted for N-bundet karbohydratbinding. N-bundet karbohydrat introduserer en mulig kilde til variabilitet i et rekombinant uttrykt protein på grunn av mulige variasjoner fra batch til batch i karbohydratstrukturen. I et forsøk på å eliminere denne mulige variabiliteten ble Asn-297 mutert til en glutaminrest for å forebygge bindingen av N-bundet karbohydrat ved denne restposisjonen. Karbohydratet ved rest 297 er også involvert i Fc-binding til FcRIII (Sondermann

et al., Nature 406:267 (2000)). Fjerning av karbohydrat bør derfor redusere binding av rekombinant Fc7 inneholdende fusjonsproteiner til FcγRs generelt. Som nevnt ovenfor ble stoppkodonet i Fc7-sekvensen mutert til TAA.

5 Fc8 er identisk med villtype-immunglobulinets γ1-region vist i SEQ ID NO:6, bortsett fra at cysteinresten ved EU-indeksposisjon 220 ble utbyttet med en serinrest. Denne mutasjonen eliminerte cysteinresten som normalt disulfidbinder med immunglobulin-lettkjedens konstante region. Anvendelsen av et hvilket som helst av disse spesifikke Fc-domenene til dannelsen av BLyS- og/eller APRIL-
10 antagonistene omfattes av den foreliggende oppfinnelsen.

Leucinglidelåsformer av disse molekylene er også tiltenkt ifølge oppfinnelsen. "Leucinglidelås" er en betegnelse i teknikken anvendt til å bety en leucinrik sekvens som forbedrer, promoterer eller driver dimeriseringsortrimerisering av
15 sin fusjonspartner (f.eks. sekvensen eller molekylet hvortil leucinglidelåsen er fusjonert eller bundet). Forskjellige leucinglidelåspolypeptider er beskrevet i teknikken. Se for eksempel Landschulz et al., Science, 240: 1759 (1988), US-patent 5 716 805, WO 94/10308, Hoppe et al., FEBS Letters, 344: 1991 (1994), Maniatis et al., Nature, 341: 24 (1989). En fagmann vil forstå at en
20 leucinglidelåssekvens kan fusjoneres ved enten 5'- eller 3'-enden av polypeptidet ifølge denne oppfinnelsen.

Polypeptidene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan også modifiseres på en måte for å danne kimære molekyler ved å fusjonere polypeptidet til et annet,
25 heterologt polypeptid eller aminosyresekvens.

Ifølge noen utførelsesformer er et slikt heterologt polypeptid eller en slik heterolog aminosyresekvens av en slik type som virker for å oligimerisere det kimære molekylet. I noen utførelsesformer omfatter et slikt kimært molekyl en
30 fusjon av polypeptidet med et markørpolypeptid som tilveiebringer en epitop hvortil et markørantistoff kan binde selektivt. Epitopmarkøren plasseres generelt ved amino- eller karboksylterminalen av polypeptidet.

Forekomsten av slike epitopmerkede former av polypeptidet kan påvises ved
35 hjelp av et antistoff mot markørpolypeptidet. Tilveiebringelse av epitopmarkøren setter også polypeptidet i stand til enkelt å renses ved affinitetsrensing ved hjelp

av et markørantistoff eller en annen type av affinitetsmatrise som binder til epitopmarkøren.

Forskjellige markørpolypeptider og deres respektive antistoffer er velkjent i teknikken. Eksempler inkluderer markørene poly-histidin (poly-his) eller poly-histidin-glycin (poly-his-gly), flu-HA-markørpolypeptidet og dets antistoff 12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)], tc-myc-markøren og antistoffene 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 og 9E10 dertil [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985)] og herpes simplex-virusglykoprotein D-markøren (gD) og dens antistoff [Paborsky et al., Protein Engineering, 3 (6): 547-553 (1990)]. Andre markørpolypeptider inkluderer Flag-peptidet [Hopp et al., BioTechnology, 6: 1204-1210 (1988)], KT3-epitoppeptidet [Martin et al., Science, 255: 192-194 (1992)], et "-tubulinepitoppeptid [Skinner et al., J. Biol. Chem., 266: 15163-15166 (1991)] og T7-gen 10-proteinpeptidmarkøren [Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad.Sci: USA, 87: 6393-6397 (1990)].

Konstruksjon av peptidpolymerkonjugater

I noen utførelsesformer består strategien for konjugasjonen av en polymer (f.eks. pegylering) av syntetiske peptider av kombinasjon, gjennom forming av en konjugatbinding i løsning, av et peptid og en PEG-enhet, idet hver bærer en spesiell funksjon som er gjensidig reaktiv overfor den andre. Peptidene kan uten videre fremstilles med konvensjonell fastfasesyntese. Peptidene "forhåndsaktiveres" med en egnet funksjonell gruppe på et spesifikt sted. Forløperne renses og karakteriseres fullt ut før de omsettes med PEG-enheten. Ligering av peptidet med PEG finner vanligvis sted i vandig fase og kan uten videre overvåkes ved analytisk HPLC med omvendt fase. De pegylerte peptidene kan uten videre renses ved preparativ HPLC og karakteriseres ved analytisk HPLC, aminosyreanalyse og laserdesorpsjonsmassespektrometri.

I noen utførelsesformer er et peptid kovalent bundet via én eller flere av peptidets aminosyrerester til en terminal reaktiv gruppe på polymeren, hovedsakelig avhengig av reaksjonsbetingelsene, polymerens molekylvekt osv. Polymeren med de reaktive gruppene er betegnet heri som aktivert polymer. Den reaktive gruppen reagerer selektivt med frie aminogrupper eller andre reaktive grupper på peptidet. Potensielt reaktive steder inkluderer: N-terminal

aminogruppe, epsilonaminogruupper på lysinrester samt andre amino-, imino-, karboksyl-, sulfhydryl- og hydroksylgrupper samt andre hydrofile grupper. Det vil imidlertid forstås at typen og mengden av den valgte reaktive gruppen, samt polymertypen benyttet for å oppnå optimale resultater, vil avhenge av det særlige peptidet benyttet for å unngå at den reaktive gruppen omsettes med for mange særlig aktive grupper på peptidet. I noen utførelsesformer kan en reaktiv rest (f.eks. lysin (K), en modifisert, ikke-naturlig aminosyre eller andre små molekyler) substitueres ved en posisjon som er egnet for konjugasjon.

I noen utførelsesformer omfatter peptidet sekvensen med formel I, formel II, formel III, ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEQ ID NO 5), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEQ ID NO 6), ECFDLLVRRWVPCMLG (SEQ ID NO 7), ECFDLLVRSWVPCHMLR (SEQ ID NO 8), ECFDLLVRHWVACGLLR (SEQ ID NO 9) eller sekvenser angitt på FIG. 32 i WO 05/000351 har en terminal reaktiv gruppe.

I noen utførelsesformer omfatter peptidet minst ett og mer foretrukket mer enn ett av et polypeptid omfattende en sekvens med formel I, formel II, formel III, ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEQ ID NO 5), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEQ ID NO 6), ECFDLLVRRWVPCMLG (SEQ ID NO 7), ECFDLLVRSWVPCHMLR (SEQ ID NO 8), ECFDLLVRHWVACGLLR (SEQ ID NO 9) eller sekvenser angitt på FIG. 32 i WO 05/000351. Polypeptidene som er bundet sammen, kan ha samme sekvens eller forskjellige sekvenser og en terminal reaktiv gruppe. I noen utførelsesformer kan disse polypeptidene være bundet til hverandre, eventuelt gjennom anvendelsen av en linker.

Mens konjugasjon kan forekomme ved en hvilken som helst reaktiv aminosyre på polypeptidet, er den reaktive aminosyren i noen utførelsesformer lysin, som er bundet til den reaktive gruppen av den aktiverte polymeren gjennom dets frie epsilon-aminogruppe, eller glutamin- eller asparbinsyre, som er bundet til polymeren gjennom en amidbinding. I noen utførelsesformer er ikke peptidets reaktive aminosyrer cysteinrester ved posisjonene X2 og X1z.

Graden av polymerkonjugasjon med hvert peptid vil variere avhengig av antallet av reaktive steder på peptidet, molekylvekten, hydrofilisiteten og andre egenskaper ved polymeren, og de særlig valgte peptidderivatiseringsstedene. I noen utførelsesformer har konjugatet et sluttmolarforhold på 1 til 10 polymermolekyler per peptidmolekyl, men større antall av polymermolekyler

bundet til peptidene ifølge oppfinnelsen er også tiltenkt. I noen utførelsesformer inneholder hvert konjugat ett polymermolekyl. Den ønskede mengden av derivatisering oppnås uten videre ved hjelp av en forsøksmatrise hvori tid, temperatur og andre reaksjonsbetingelser varieres for å endre graden av substitusjon, hvorefter nivået av polymersubstitusjon av konjugatene bestemmes ved størrelseseksklusjonskromatografi eller andre midler som er kjent i teknikken.

I noen utførelsesformer inneholder polymeren bare én enkelt gruppe som er reaktiv. Dette bidrar til å unngå kryssbinding av proteinmolekyler. Det er imidlertid innenfor omfanget heri å maksimalisere reaksjonsbetingelsene for å redusere kryssbinding, eller for å rense reaksjonsproduktene gjennom gelfiltrering eller ionebyttekromatografi for å gjenvinne i det vesentlige homogene derivater. I andre utførelsesformer inneholder polymeren to eller flere reaktive grupper i sammenheng med binding av multiple peptider til polymerhovedkjeden.

Gelfiltrering eller ionebyttekromatografi kan igjen anvendes for å gjenvinne ønsket derivat i en i det vesentlige homogen form. I noen utførelsesformer er polymeren kovalent bundet direkte til peptidet uten anvendelsen av et multifunksjonelt (vanligvis bifunksjonelt) kryssbindingsmiddel. I noen utførelsesformer er det et 1: 1 molarforhold mellom PEG-kjede og peptid.

Den kovalente modifikasjonsreaksjonen kan finne sted ved hjelp av enhver egnet fremgangsmåte generelt anvendt til omsetting av biologisk aktive materialer med inerte polymerer, foretrukket ved ca. pH 5–9, mer foretrukket 7–9 hvis de reaktive gruppene på peptidet er lysingrunder. Prosessen involverer generelt fremstilling av en aktivert polymer (polymer som typisk har minst én terminal hydroksylgruppe som skal aktiveres), fremstilling av et aktivt substrat fra denne polymeren og deretter omsetting av peptidet med det aktive substratet for å produsere peptidet som er egnet for formulering. Den ovenstående modifikasjonsreaksjonen kan utføres ved hjelp av flere fremgangsmåter, som kan involvere ett eller flere trinn. Eksempler på modifikasjonsmidler som kan anvendes til å produsere den aktiverte polymeren i en ett-trinnsreaksjon, inkluderer cyanursyreklorid (2,4,6-triklor-S-triazin) og cyanursyrefluorid.

I noen utførelsesformer finner modifikasjonsreaksjonen sted i to trinn hvori polymeren først omsettes med et syreanhydrid slik som ravsyre- eller glutaminanhydrid for å danne en karboksylsyre, og karboksylsyren omsettes deretter med en forbindelse i stand til å omsettes med karboksylsyren for å danne en aktivert polymer med en reaktiv estergruppe som er i stand til å omsettes med peptidet. Eksempler på slike forbindelser inkluderer N-hydroksysukkinimid, 4-hydroksy-3-nitrobenzensulfonsyre og lignende, og foretrukket anvendes N-hydroksysukkinimid eller 4-hydroksy-3-nitrobenzensulfonsyre. Monometylsubstituert PEG kan for eksempel omsettes ved forhøyede temperaturer, foretrukket ca. 100–110 °C i fire timer, med glutaminanhydrid. Den således produserte monometyl-PEG-glutaminsyren omsettes deretter med N-hydroksysukkinimid i nærvær av et karbodiimidreagens slik som disykloheksyl eller isopropylkarbodiimid for å produsere den aktiverte polymeren, metoksypolyetylenglykoly-N-sukkinimidylglutarat, som deretter kan omsettes med GH. Denne fremgangsmåten er beskrevet nærmere i Abuchowski et al., Cancer Biochem. Biophys., 7: 175-186 (1984). I et annet eksempel kan det monometylsubstituerte PEG omsettes med glutaminanhydrid etterfulgt av reaksjon med 4-hydroksy-3-nitrobenzensulfonsyre (HNSA) i nærvær av disykloheksylkarbodiimid for å produsere den aktiverte polymeren. HNSA er beskrevet i Bhatnagar et al., Peptides: Synthesis-Structure-Function. Proceedings of the Seventh American Peptide Symposium, Rich et al. (eds.) (Pierce Chemical Co., Rockford Ill., 1981), s. 97-100 og i Nitecki et al., High-Technology Route to Virus Vaccines (American Society for Microbiology: 1986) kalt "Novel Agent for Coupling Synthetic Peptides to Carriers and Its Applications."

I noen utførelsesformer oppnås kovalent binding til aminogrupper ved kjent kjemi basert på cyanurklorid, karbonyldiimidazol, aldehydreaktive grupper (PEG-alkoksid pluss dietylacetal av bromacetaldehyd, PEG pluss DMSO og eddikanhydrid eller PEG-klorid pluss fenoksidet av 4-hydroksybenzaldehyd, aktiverte sukkinimidylestere, aktivert ditiokarbonat-PEG, 2,4, 5-triklorfenylklorformat eller P-nitrofenylklorformataktivert PEG. Karboksylgrupper derivatiseres ved binding av PEG-amin ved hjelp av karbodiimid. Sulfhydrylgrupper deriveres ved binding til maleimido-substituert PEG (f.eks. alkoksy-PEG-amin pluss sulfosukkinimidyl-4-(N-maleimidometyl)sykloheksan-1-karboksylat) som beskrevet i WO 97/10847 publisert 27. mars, 1997, eller PEG-

maleimid kommersielt tilgjengelig fra Nektar Technologies, San Carlos, CA (tidligere Shearwater Polymers, Inc.). Frie aminogru^opper p^o peptidet (f.eks. epsilonaminogru^opper p^o lysinrester) kan alternativt bindes til N-hydroksysukkinimidylsubstituert PEG (PEG-NHS tilgjengelig fra Nektar Technologies), eller kan tioleres med 2-imino-tiolan (Trauts reagens) og deretter bindes til maleimidinh^oldige derivater av PEG som beskrevet i Pedley et al., Br. J. Cancer, 70: 1126-1130 (1994).

Mange inerte polymerer, inkludert, men ikke begrenset til, PEG, er egnet til anvendelse i legemidler. Se for eksempel Davis et al., Biomedical Polymers: Polymeric Materials and Pharmaceuticals for Biomedical Use, s. 441-451 (1980). I noen utf^orelsesformer av oppfinnelsen er det anvendt en ikke-proteinholdig polymer. Den ikke-proteinholdige polymeren er typisk en hydrofil syntetisk polymer, dvs. en polymer som ikke ellers finnes i naturen. Polymerer som finnes naturlig og produseres ved rekombinante fremgangsm^oter eller in vitro-fremgangsm^oter, er imidlertid ogs^o nyttige; det samme er polymerer som er isolert fra naturlige kilder. Hydrofilpolyvinylpolymerer omfattes av denne oppfinnelsen, f.eks. polyvinylalkohol og polyvinylpyrrolidon. S^orlig nyttige er polyalkylenetere slik som polyetylenglykol (PEG), polyoksyalkylen^{er} slik som polyoksyetylen, polyoksypropylen og blokkerende kopolymerer for polyoksyetylen og polyoksypropylen (Pluronic^s), polymetakrylater, karbomerer; forgrenede eller uforgrenede polysakkarider som omfatter sakkaridmonomerene D-mannose, D- og L-galaktose, fukose, fruktose, D-xylose, L-arabinose, D-glukuronsyre, sialinsyre, D-galakturonsyre, D-mannuronsyre (f.eks. polymannuronsyre eller alginsyre), D-glukosamin, D-galaktosamin, D-glukoseandnevraminsyre, inkludert homopolysakkarider og heteropolysakkarider slik som laktose, amylopektin, stivelse, hydroksyetylstivelse, amylose, dekstransulfat, dekstran, dekstriner, glykogen eller polysakkaridunderenheten av syreholdige mukopolysakkarider, f.eks. hyaluronsyre, polymerer av sukkeralkoholer slik som polysorbitol og polymannitol, heparinoreparon. Polymeren f^or konjugasjon trenger ikke ^o være, men er foretrukket, vannl^oselig, men sluttkonjugatet er foretrukket vannl^oselig. Konjugatet viser foretrukket en vannl^oselighet p^o minst ca. 0,01 mg/ml og mer foretrukket minst ca. 0,1 mg/ml og enda mer foretrukket minst ca. 1 mg/ml.

I tillegg b^or ikke polymeren være s^ov^ort immunogen i konjugatformen, og den b^or heller ikke ha viskositet som er inkompatibel med intraven^os infusjon,

injeksjon eller inhalasjon hvis konjugatet er beregnet på administrering via slike veier.

Polymerens molekylvekt kan være opp til ca. 100 000 D og er foretrukket minst ca. 500 D, eller minst ca. 1000 D, eller minst ca. 5000 D. I noen utførelsesformer har PEG eller andre polymerer en molekylvekt fra 5000 til 20 000 D. Den valgte molekylvekten kan avhenge av den faktiske størrelsen på konjugatet som skal oppnås, polymerens natur (f.eks. struktur, slik som rettkjedet eller forgrenet) og derivatiseringsgraden, dvs. antallet av polymermolekyler per peptid og polymerbindingsstedet eller -stedene på peptidet. I noen utførelsesformer kan forgrenede PEG-er anvendes til å indusere en stor økning i peptidenes faktiske størrelse. PEG eller andre polymerkonjugater kan benyttes til å øke halveringstiden, øke løseligheten, stabilisere mot proteolytiske angrep og redusere immunogenisiteten.

Funksjonaliserte PEG-polymerer for å modifisere peptidene ifølge oppfinnelsen er tilgjengelige fra Nektar Technologies of San Carlos, CA (tidligere Shearwater Polymeres, Inc.). Slike kommersielt tilgjengelige PEG-derivater inkluderer, men er ikke begrenset til, amino-PEG, PEG-aminosyreestere. PEG-N-hydroksysukkinamidkjemi (NHS), PEG-hydrazid, PEG-tiol, PEG-sukkinat, karboksymetylert PEG, PEG-propionsyre, PEG-aminosyrer, PEG-sukkinimidylsukkinat, PEG-sukkinimidylpropionat, sukkinimidylester av karboksymetylert PEG, sukkinimidylkarbonat av PEG, sukkinimidylestere av aminosyre-PEG-er, PEG-xykarbonylimidazol, PEG-nitrofenylkarbonat, PEG-tresylat, PEG-glycidyleter, PEG-aldehyd, PEG-vinylsulfon, PEG-maleimid, PEG-ortopyridyl-disulfid, heterofunksjonelle PEG-er, PEG-vinylderivater, PEG-silaner og PEG-fosfolider. Reaksjonsbetingelsene for binding av disse PEG-derivatene vil variere avhengig av proteinet, ønsket grad av pegylering og det benyttede PEG-derivatet. Noen faktorer involvert i valget av PEG-derivater inkluderer det ønskede bindingspunktet (slik som lysin eller cystein R-grupper), derivatenes hydrolytiske stabilitet og reaktivitet, bindingens stabilitet, toksisitet og antigenisitet, egnetheten til analyse osv. Spesifikke instruksjoner for anvendelse av et eventuelt særlig derivat er tilgjengelige fra produsenten.

Konjugatene kan karakteriseres ved SDS-PAGE, gelfiltrering, NMR, tryptisk kartlegging, væskechromatografi-massespektrofotometri og biologiske assayer in vitro. Graden av PEG-konjugasjon kan for eksempel vises ved SDS-PAGE og

gelfiltrering, og deretter analyseres ved NMR, som har en spesifikk resonanstopp for metylenhydrogenene i PEG. Antall PEG-grupper på hvert molekyl kan beregnes fra NMR-spektrumet eller massespektrometrien. Polyakrylamidgelelektroforese i 10 % SDS kjøres tilstrekkelig i 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl som elueringsbuffer. Tryptisk kartlegging kan utføres for å demonstrere hvilken rest som er pegylert. Pegylerte peptider nedbrytes således med trypsin ved protein/enzym-forholdet fra 100 til 1 på mg-basis ved 37 °C i 4 timer i 100 mM natriumacetat, 10 mM Tris-HCl, 1 mM kalsiumklorid, pH 8,3 og surgjøres til pH < 4 for å stoppe nedbryting før separering på HPLC Nucleosil C-18 (4,6 mm x 150 mm, 5. µm, 100 Å). Kromatogrammet sammenlignes med det for ikke-pegylert utgangsmateriale. Hver topp kan deretter analyseres ved massespektrometri for å verifisere størrelsen på fragmentet i toppen. Fragmentet/ene som bar PEG-grupper, beholdes vanligvis ikke på HPLC-kolonnen etter injeksjon og forsvinner fra kromatografen. Slik forsvinning fra kromatografen er en indikasjon på pegylering på det særlige fragmentet som bør inneholde minst én lysinrest. Pegylerte peptider kan deretter analyseres for evnen til å binde til BLYS ved konvensjonelle fremgangsmåter.

I noen utførelsesformer renses konjugater ved ionebyttekromatografi (f.eks. ionebytte-HPLC). Kjemien til mange av de elektrofilisk aktiverte PEG-ene resulterer i en reduksjon i aminogrupebelasting av det pegylerte produktet. Ionebyttekromatografi med høy oppløsning kan således anvendes til å separere de frie og konjugerte proteinene, og til å løse opp arter med forskjellige pegyleringsnivåer.

Oppløsningen av forskjellige arter (f.eks. inneholdende én eller to PEG-rester) er faktisk også mulig på grunn av forskjellene i de ioniske egenskapene ved de ikke-omsatte aminosyrene. I en utførelsesform oppløses arter med forskjellige pegyleringsnivåer ifølge fremgangsmåtene beskrevet i WO 96/34015 (internasjonal søknad nr.PCT/US96/05550 publisert 31. okt. 1996). Heterologe arter av konjugatene renses fra hverandre på samme måte.

I noen utførelsesformer reagerer PEG-N-hydroksysukkinamid (NHS) med et primæramin (f.eks. lysiner og N-terminalen). I noen utførelsesformer reagerer PEG-NHS med et C-terminalt lysin (K) av polypeptidet. I noen utførelsesformer tilsettes lysinresten til C-terminalen av det 17-mere polypeptidet, mens Xi substitueres med lysin i andre utførelsesformer. I noen utførelsesformer reagerer

polymeren med N-terminalen. I en foretrukket utførelsesform genereres konjugatet ved anvendelse av fremgangsmåtene for derivatisering og rensing beskrevet i eksemplene nedenfor.

5 I ett aspekt beskriver beskrivelsen hvilke som helst av de ovennevnte konjugatene dannet av sine komponenter, dvs. ett eller flere peptider kovalent bundet til ett eller flere polymermolekyler, uten noen ytre materie i konjugatets kovalente molekulære struktur.

10 Beskrivelsen beskriver et antistoff som binder eller ett eller flere av sine tre reseptorer til BLYS, og fremgangsmåter for generering av slike antistoffer.

BLYS eller BLYS-reseptoren som skal anvendes til produksjonen av eller screeningen for antistoffer, kan for eksempel være en løselig form av antigenet
15 eller en del derav, inneholdende den ønskede epitopen. Som beskrevet ovenfor er BLYS-sekvensen og sekvensen for BLYS-reseptorene kjent, hvilket også gjelder grensene for de forskjellige domenene av disse polypeptidene. Peptidfragmenter i det ekstracellulære domenet (ECD) kan anvendes som immunogener. Basert på disse kjente sekvensene og domeneavgrensningene
20 kan en fagmann uttrykke BLYS- eller BLYS-reseptorpolypeptidene og fragmenter derav til anvendelse for å produsere antistoffer.

For å generere antistoffer mot BLYS eller dens reseptorer kan polypeptider av full lengde eller peptidfragmenter med 6 eller flere rester i lengden anvendes
25 som immunogener for å øke antistoffer i gnagere, inkludert mus, hamstere og rotter, i kaniner, geit eller andre egnede dyr. Løselig BLYS eller BLYS-reseptorpolypeptid eller immunogenfragmenter derav kan uttrykkes i egnede vertsceller, slik som bakterier eller eukaryotiske celler. I én utførelsesform produseres humant og murint detergentoppløst BLYS av full lengde i E. coli, og
30 anvendes til å immunisere og screene for hybridomer som produserer BLYS-antistoffer.

Alternativt eller i tillegg kan B-celler eller cellelinjer som uttrykker BLYS eller BLYS-reseptorer på sin celleoverflate, anvendes til å generere, og/eller screene
35 forantistoffer. Andre former for BLYS som er nyttige for generering av antistoffer, vil være åpenlyse for fagmannen, slik som fagvisningsmetodologi, kan også anvendes til å produsere BLYS-bindingsantistoff. Antistoffene som

binder BLyS eller BLyS-reseptorene, kan være kimære, humaniserte eller humane. Slike antistoffer og fremgangsmåter for generering av dem er beskrevet nærmere nedenfor.

- 5 Polyklonale antistoffer dyrkes fortrinnsvis hos dyr ved flere subkutane (sc) eller intraperitoneale (ip) injeksjoner av det relevante antigenet og et adjuvans. Det kan være nyttig å konjugere det relevante antigenet til et protein som er immunogent i artene som skal immuniseres, f.eks. keyhole limpet hemocyanin, serumalbumin, bovint tyroglobulin eller soyabønnetrypsininhitor ved hjelp av et
- 10 bifunksjonelt eller derivatiserende middel, f.eks. maleimidobenzoylsulfosukkinimidester (konjugasjon gjennom cysteinrester), N-hydroksysukkinimid (gjennom lysinrester), glutaraldehyd, ravsyreanhydrid, SOC12 eller $R1N = C = NR$, hvor R og R' er forskjellige alkylgrupper.
- 15 Dyr immuniseres mot antigenet, immunogene konjugater eller derivater ved kombinasjon av for eksempel 100 μ g eller 5 g av proteinet eller konjugatet (for henholdsvis kaniner eller mus) med 3 volumer av Freund's komplette adjuvans og intradermal injeksjon av løsningen på flere steder. En måned senere gis dyrene en påfyllingsdose med 1/5 til 1/10 av den opprinnelige mengden av
- 20 peptid eller konjugat i Freund's komplette adjuvans ved subkutan injeksjon på flere steder. Etter 7 til 14 dager tappes dyrene for blod, og serumet analyseres for antistofftiter. Dyrene får påfyllingsdoser helt til titeren flater ut. Dyret får foretrukket påfyllingsdose med konjugatet av samme antigen, men konjugert til et annet protein og/eller gjennom et annet kryssbindingsreagens. Konjugater
- 25 kan også fremstilles i rekombinant cellekultur som proteinfusjoner. Aggregerende stoffer slik som alun kan også passende anvendes til å forsterke immunresponsen.
- 30 Monoklonale antistoffer oppnås fra en populasjon av i det vesentlige homogene antistoffer, dvs. de individuelle antistoffene omfattende populasjonen er identiske unntatt for mulige naturlig forekommende mutasjoner som kan være til stede i mindre mengder. Adjektivet "monoklonal" indikerer således at antistoffets karakter ikke er en blanding av diskrete antistoffer.
- 35 De monoklonale antistoffene kan for eksempel dannes ved hjelp av hybridomfremgangsmåten først beskrevet i Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975) eller dannes ved hjelp av rekombinante DNA-fremgangsmåter (US-patent

nr. 4 816 567). I hybridomfremgangsmåten immuniseres en mus eller et annet egnet vertsdyr, slik som en hamster, som beskrevet ovenfor for å fremkalle lymfocytter som produserer eller er i stand til å produsere antistoffer som spesifikt vil binde til proteinet som anvendes til immunisering. Lymfocytter kan eventuelt immuniseres in vitro. Lymfocytter fusjoneres deretter med myelomceller ved hjelp av et egnet fusjonsmiddel, slik som polyetylglykol, for å danne en hybridomcelle (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, s. 59–103 (Academic Press, 1986)).

De således fremstilte hybridomcellene utsås og dyrkes i et egnet kulturmedium som foretrukket inneholder ett eller flere stoffer som inhiberer veksten eller overlevelsen av de ufusjonerte, parentale myelomcellene. Hvis de parentale myelomcellene mangler enzymet hypoksantinguaninfosforibosyltransferase (HGPRT eller HPRT), vil kulturmediet for hybridomene typisk omfatte for eksempel hypoksantin, aminopterin og tymidin (HAT-medium), hvilke stoffer forhindrer veksten av HGPRT-fattige celler.

Foretrukne myelomceller er dem som fusjonerer effektivt, støtter stabil produksjon på høyt nivå av antistoff ved de valgte antistoffproduserende cellene og er sensitive overfor et medium slik som HAT-medium.

Blant disse er foretrukne myelomcellelinjer murine myelomlinjer, slik som dem avledet fra MOPC- 21 og MPC-11-murine tumorer tilgjengelige fra Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, USA, og SP-2- eller X63-Ag8-653-celler tilgjengelige fra American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA. Humane myelom- og murine/humane heteromyelomcellelinjer er også beskrevet for produksjon av humane monoklonale antistoffer (Kozbor, *J.Immunol.*, 133: 3001 (1984), Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, s. 51–63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Kulturmedium hvor hybridomceller dyrkes, analyseres for produksjon av monoklonale antistoffer rettet mot antigenet. Bindingsspesifisiteten for monoklonale antistoffer produsert av hybridomceller bestemmes foretrukket ved immunutfelling eller ved et in vitro-bindingsassay, slik som radioimmunassay (RIA) eller enzyumbundet antistoffassay (ELISA). Bindingsaffiniteten for det monoklonale antistoffet kan for eksempel bestemmes ved hjelp av Scatchard-analysen i Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

Etter at det er identifisert hybridomceller som produserer antistoffer med ønsket spesifisitet, affinitet og/eller aktivitet, kan klonene subklones ved begrensende fortynningsprosedyrer og dyrkes ved hjelp av standardfremgangsmåter (Goding, 5 Monoclonal Antibodies Principles and Practice, s. 59–103 (Academic Press, 1986)). Egnede kulturmedier til dette formål inkluderer for eksempel D-MEM- eller RPMI-1640-medium. Hybridomcellene kan dessuten dyrkes in vivo som ascitestumorer hos et dyr.

10 De monoklonale antistoffene som utskilles av subklonene, er passende separert fra kulturmediet, ascitesfluidet eller serumet ved konvensjonelle fremgangsmåter for immunglobulinrensing slik som for eksempel protein A-sefarose, hydroksylapatittkromatografi, gelelektroforese, dialyse eller affinitetskromatografi. DNA som koder for monoklonale antistoffer, isoleres lett 15 og sekvenseres ved hjelp av konvensjonelle fremgangsmåter (f.eks. ved hjelp av oligonukleotidsonder som er i stand til å binde spesifikt til gener som koder for tunge og lette kjeder i murine antistoffer). Hybridomcellene fungerer som den foretrukne kilden til slikt DNA. Når DNA-et er isolert, kan det plasseres i ekspresjonsvektorer som deretter transfekteres til vertsceller slik som E.coli-celler, 20 simian-COS-celler, CHO-celler (eggstokk fra kinesisk hamster) eller myelomceller som ikke på annen måte produserer immunglobulinprotein, for å oppnå syntesen av monoklonale antistoffer i de rekombinante vertscellene. Oversiktsartikler om rekombinant ekspresjon i bakterier av DNA som koder for antistoffet, inkluderer Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5: 256-262 25 (1993) og Pluckthun, Immunol Revs., 130: 151-188 (1992).

I en ytterligere utførelsesform kan antistoffer eller antistoffragmenter isoleres fra antistoffagbiblioteker generert ved hjelp av teknikker beskrevet i McCafferty et al., Nature, 348:552–554 (1990).

30 Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991) og Markset et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) beskriver isoleringen av henholdsvis murine og humane antistoffer ved hjelp av fagbiblioteker. Senere publikasjoner beskriver produksjonen av humane antistoffer med høy affinitet (nM-område) ved 35 kjedeombytting (Marks et al., BiolZ'echraology, 10: 779-783 (1992)) samt kombinatorisk infeksjon og in vivo-rekombinasjon som en strategi for konstruksjon av svært store fagbiblioteker (Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res.,

21: 2265-2266 (1993)). Disse teknikkene er således gjennomførbare alternativer til tradisjonelle monoklonale antistoffhybridomteknikker for isolering av monoklonale antistoffer.

5 DNA-et kan også modifiseres for eksempel ved substitusjon av kodingssekvensen for humane konstante tung- og lettkjede-domener med homologe murine sekvenser (US-patent nr. 4 816 567, Morrison, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81: 6851 (1984)), eller ved kovalent binding til
10 immunglobulinkodingssekvensen av hele eller deler av kodingssekvensen for et ikke-immunglobulinpolypeptid.

Slike ikke-immunglobulinpolypeptider substitueres typisk med de konstante domenene i et antistoff, eller de substitueres med de variable domenene av et antigenkombineringssted i et antistoff for å danne et kimært bivalent antistoff
15 omfattende ett antigenkombineringssted med spesifisitet for et antigen og et annet antigenkombineringssted med spesifisitet for et annet antigen.

Fremgangsmåter for humanisering av ikke-humane antistoffer er beskrevet i teknikken. Et humanisert antistoff har foretrukket én eller flere aminosyrerester
20 introdusert inn i seg fra en kilde som er ikke-human. Disse ikke-humane aminosyrerestene kalles ofte "importrester", som typisk tas fra et variabelt "importdomene". Humanisering kan i det vesentlige utføres ifølge fremgangsmåtene i Winter et al. (Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986), Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988), Verhoeyen et al., Science, 239:
25 1534-1536 (1988)), ved substitusjon av hypervariable regionsekvenser med tilsvarende sekvenser i et humant antistoff. Slike "humaniserte" antistoffer er derfor kimære antistoffer (US-patent nr. 4 816 567), hvori et i det vesentlige mindre enn intakt humant variabelt domene er substituert med den tilsvarende sekvensen fra en ikke-human art. Humaniserte antistoffer er i praksis typisk
30 humane antistoffer hvor noen hypervariable regionrester og muligens noen FR-rester er substituert med rester fra analoge steder i gnagerantistoffer.

Valget av humane variable domener, både lette og tunge, som skal anvendes til fremstilling av de humaniserte antistoffene, er svært viktig for å redusere
35 antigenisiteten. Ifølge den såkalte "best-fit"-metoden screenes det variable domenets sekvens i et gnagerantistoff mot hele biblioteket av kjente humane sekvenser i det variable domenet. Den humane sekvensen som er nærmest

gnagerens, aksepteres deretter som den humane strukturen (FR) for det humaniserte antistoffet (Sims et al., J. Immunol., 151: 2296 (1993), Chothia et al., J. Mol. Biol., 196: 901 (1987)). En annen fremgangsmåte anvender en særlig strukturen avledet fra konsensussekvensen i alle humane antistoffer i en særlig undergruppe av lette eller tunge kjeder. Den samme strukturen kan anvendes for flere forskjellige humaniserte antistoffer (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992), Presta et al., J. Immunol., 15-1 :2623 (1993)).

Det er videre viktig at antistoffer humaniseres med retensjon av høy affinitet for antigenet og andre gunstige biologiske egenskaper. For å nå dette målet fremstilles humaniserte antistoffer ifølge en foretrukket fremgangsmåte ved en fremgangsmåte for analyse av morsekvensene og forskjellige konseptuelle humaniserte produkter ved hjelp av tredimensjonale modeller av morsekvensene og de humaniserte sekvensene.

Tredimensjonale immunglobulinmodeller er vanligvis tilgjengelige og kjent for fagmannen. Det finnes dataprogrammer som illustrerer og viser sannsynlige tredimensjonale konformasjonsstrukturer av valgte kandidatimmunglobulinsekvenser. Inspeksjon av disse visningene gir mulighet for analyse av den sannsynlige rollen til restene i funksjonen til kandidatimmunglobulinsekvensen, dvs. analyse av rester som påvirker kandidatimmunglobulinets evne til å binde antigenet. FR-rester kan således velges og kombineres fra mottager- og importsekvensene, slik at den ønskede antistoffegenskapen oppnås, slik som økt affinitet for målantigenene. Generelt er de hypervariable regionrestene direkte og i det mest vesentlige involvert i påvirkning av antigenbinding.

Som et alternativ til humanisering kan det dannes humane antistoffer. Det er nå for eksempel mulig å produsere transgene dyr (f.eks. mus) som ved immunisering er i stand til å produsere et fullt repertoar av humane antistoffer under fravær av endogen immunglobulinproduksjon. Det er for eksempel beskrevet at den homozyge delesjon av antistoffets tungkjede-koblingsregionen hos kimære og kjønnscelemutante mus resulterer i fullstendig inhibering av endogen antistoffproduksjon.

Overføring av det humane kjønnselle-immunglobulingenserien til slike kjønnscellemutante mus vil resultere i produksjon av humane antistoffer ved antigenprovokasjon. Se for eksempel Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993), Jakobovits et al., Nature, 362: 255-258 (1993),
 5 Bruggermann et al., Year in Immuno., 7: 33 (1993) og US-patent nr. 5,591, 669,5 589 369 og 5 545 807.

Det kan alternativt anvendes fagvisningsteknologi (McCafferty et al., Nature 348: 552-553 (1990)) til å produsere humane antistoffer og antistoffragmenter
 10 in vitro fra genrepertoarer i et immunglobulins variable (V) domene fra ikke-immuniserte donorer. Ifølge denne teknikken klones antistoffets V-domenegener i rammen til enten et større eller mindre kappeproteingen av et filamentøst bakteriofag, slik som M13 eller fd, og vises som funksjonelle antistoffragmenter på overflaten av fagpartikkelen. Siden den filamentøse partikkelen inneholder en
 15 enkelttrådet DNA-kopi av faggenomet, resulterer valg basert på antistoffets funksjonelle egenskaper også i valg av genet som koder for antistoffet som viser disse egenskapene. Faget kopierer således noen av B-cellens egenskaper.

Fagvisning kan utføres i en rekke formater; en gjennomgåelse av disse finnes i
 20 for eksempel Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3: 564-571 (1993). Flere kilder til V-gensegmenter kan anvendes til fagvisning. Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991) isolerte en mangfoldig serie av antiokszolonantistoffer fra et lite, tilfeldig kombinatorisk bibliotek av V-gener avledet fra milten hos immuniserte mus. Et repertoar av V-
 25 gener fra ikke-immuniserte humane donorer kan konstrueres, og antistoffer mot en mangfoldig serie av antigener (omfattende selvantigener) kan isoleres i det vesentlige etter teknikkene beskrevet av Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991) eller Griffith et al., EMBO J. 12: 725-734 (1993). Se også US-patent nr. 5,565, 332 og 5 573 905. Humane antistoffer kan også genereres av in vitro-
 30 aktive B-celler (se US-patent 5 567 610 og 5 229 275).

Det er utviklet forskjellige teknikker for produksjon av antistoffragmenter. Disse fragmentene ble tradisjonelt avledet via proteolytisk nedbryting av intakte antistoffer (se for eksempel Morimoto et al., Journal of Biochemical and
 35 Biophysical Methods 24: 107-117 (1992) og Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)). Men disse fragmentene kan nå fremstilles direkte ved rekombinante vertsceller. Antistoffragmentene kan for eksempel isoleres fra

antistoffbibliotekene behandlet ovenfor. Fab'-SH-fragmenter kan alternativt gjenvinnes direkte fra *E. coli* og bindes kjemisk for å danne F(ab')₂-fragmenter (Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). Ifølge en annen metode kan F(ab')₂-fragmenter isoleres direkte fra rekombinant vertscellekultur. Andre teknikker for produksjon av antistofffragmenter vil være åpenbare for fagmannen. I andre utførelsesformer er det valgte antistoffet et enkjedet Fv-fragment (scFv). Se WO 93/16185, US-patent nr. 5 571 894 og US-patent nr. 5 587 458. Antistofffragmentet kan også være et "lineært antistoff", f.eks. som beskrevet i US-patent 5 641 870. Slike lineære antistofffragmenter kan være monospesifikke eller bispesifikke.

Bispesifikke antistoffer er antistoffer som har bindingsspesifisitet for minst to forskjellige epitoper. Eksempelvis kan bispesifikke antistoffer binde til to forskjellige epitoper av B-celleoverflatemarkøren. Andre slike antistoffer kan binde en første B-cellemarkør og ytterligere binde en andre B-celleoverflatemarkør. En anti-B-cellemarkørbindingsarm kombineres med en arm som binder til et utløsende molekyl på en leukocyt slik som et T-cellereseptormolekyl (f.eks. CD2 eller CD3), eller Fc-reseptorer for IgG (FcγR), slik som FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) og FcγRIII (CD16), for å fokusere cellulære forsvarsmekanismer til B-cellen. Bispesifikke antistoffer kan også anvendes til å lokalisere cytotoxiske stoffer til B-cellen.

Disse antistoffene har en B-cellemarkørbindingsarm og en arm som binder det cytotoxiske stoffet (f.eks. saporin, anti-interferon-, vinkaalkaloid, ricin-A-kjede, metotreksat eller radioaktivt isotophapten).

Bispesifikke antistoffer kan fremstilles som antistoffer av full lengde eller antistofffragmenter (f.eks. bispesifikke F(ab')₂-antistoffer). Fremgangsmåter for fremstilling av bispesifikke antistoffer er kjent i teknikken. Tradisjonell produksjon av bispesifikke antistoffer av full lengde er basert på samtidig ekspresjon av to tungkjede/lettkjede-par i immunglobulin, hvor de to kjedene har forskjellig spesifisitet (Millstein et al., *Nature*, 305: 537-539 (1983)).

På grunn av det tilfeldige utvalget av immunglobulinets tunge og lette kjeder produserer disse hybridomene (kvadromene) en potensiell blanding av forskjellige antistoffmolekyler hvor bare ett har den riktige bispesifikke strukturen. Rensing av det riktige molekylet, som vanligvis utføres ved hjelp av

affinitetskromatografitrinn, er heller tungvint, og produktutbyttene er lave. Lignende prosedyrer er beskrevet i WO 93/08829 og i Traunecker et al., EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).

5 Ifølge en annen fremgangsmåte fusjoneres antistoffets variable domener med ønsket bindingsspesifisitet (kombinasjonsteder for antistoff/antigen) til sekvenser i immunglobulinets konstante domener. Den foretrukne fusjonen er med et immunglobulins konstante tungkjede-domene, omfattende minst en del av hengsel-, CH2- og CH3-regionene. Det er foretrukket at den første tunge
10 kjedens konstante region (CH1) inneholdende stedet som er nødvendig for lettkjedebinding, er til stede i minst én av fusjonene. DNA som koder for immunglobulinets tungkjede-fusjoner og eventuelt immunglobulinets lette kjede, plasseres i separate ekspresjonsvektorer og ko-transfekteres til en egnet vertsorganisme. Dette gir stor fleksibilitet for justering av de gjensidige
15 proporsjonene av de tre polypeptidfragmentene i utførelsesformer når ulike forhold av de tre polypeptidkjedene som anvendes i konstruksjonen, gir de optimale utbyttene. Det er imidlertid mulig å sette inn kodingssekvensene for to eller alle tre av polypeptidkjedene til én ekspresjonsvektor når ekspresjonen av minst to polypeptidkjeder i like forhold resulterer i høye utbytter, eller når
20 forholdene ikke er av særlig betydning.

I en foretrukket utførelsesform av denne fremgangsmåten er de bispesifikke antistoffene sammensatt av et hybrid immunglobulins tunge kjede med en første bindingsspesifisitet i én arm, og et par av et hybrid immunglobulins tunge kjede
25 / lette kjede (som gir en andre bindingsspesifisitet) i den andre armen. Det ble påvist at denne asymmetriske strukturen letter separasjon av den ønskede bispesifikke forbindelsen fra uønskede immunglobulinkjedekombinasjoner, siden forekomsten av et immunglobulins lette kjede i bare én halvdel av det bispesifikke molekylet tilveiebringer en enkel separeringsmåte. Denne metoden
30 er beskrevet i WO 94/04690. Ytterligere detaljer om generering av bispesifikke antistoffer finnes for eksempel i Suresh et al., Methods in Enzymology, 121: 210 (1986). Ifølge en annen metode beskrevet i US-patent nr. 5 731 168 kan kontaktflaten mellom et par med antistoffmolekyler konstrueres slik at den maksimerer prosentandelen av heterodimerer som gjenvinnes fra rekombinant
35 cellekultur. Den foretrukne kontaktflaten omfatter minst en del av CH3-domenet av et antistoffs konstante domene. I denne fremgangsmåten utbyttes én eller flere små aminosyresidekjeder fra fasegrensen for det første antistoffmolekylet

med større sidekjeder (f.eks. tyrosin eller tryptofan). Kompensatoriske "kaviteter" med en størrelse som er identisk med eller lik de store sidekjedene, dannes på fasegrensen for det andre antistoffmolekylet ved å utbytte store aminosyresidekjeder med mindre kjeder (f.eks. alanin eller treonin). Dette tilveiebringer en mekanisme for å øke utbyttet av heterodimerene fremfor andre uønskede sluttprodukter, slik som homodimerer.

Bispesifikke antistoffer omfatter kryssbundne antistoffer eller "heterokonjugat"-antistoffer. Ett av antistoffene i heterokonjugatet kan for eksempel være koblet til avidin, det andre til biotin. Slike antistoffer er for eksempel foreslått for å målrette immune systemceller til uønskede celler (US-patent nr. 4 676 980) og behandle HIV-infeksjon (WO 91/00360, WO 92/200373 og EP 03089). Heterokonjugatantistoffer kan fremstilles ved hjelp av enhver praktisk kryssbindingsfremgangsmåte. Egnede kryssbindingsstoffer er velkjent i teknikken og er beskrevet i US-patent nr. 4 676 980, sammen med et antall kryssbindingsteknikker.

Teknikker for dannelse av bispesifikke antistoffer fra antistofffragmenter er også beskrevet i litteraturen. Bispesifikke antistoffer kan for eksempel fremstilles ved hjelp av kjemisk binding. Brennan et al, Science, 229: 81 (1985) beskriver en fremgangsmåte hvor intakte antistoffer spaltes proteolytisk for å danne F(ab')₂-fragmenter. Disse fragmentene reduseres under nærvær av ditiolkompleksdanneren natriumarsenitt for å stabilisere nærliggende ditioler og forebygge intermolekylær disulfiddannelse. De dannede Fab'-fragmentene omdannes deretter til tionitrobenzoat (TNB)-derivater. Ett av Fab'-TNB-derivatene rekonverteres deretter til Fab'-tiolet ved reduksjon med merkaptoetylamin og blandes med en ekvimolar mengde av det andre Fab'-TNB-derivatet for å danne det bispesifikke antistoffet. De fremstilte bispesifikke antistoffene kan anvendes som stoffer for den selektive immobiliseringen av enzymer.

Fremskritt i den siste tiden har forenklet den direkte gjenvinningen av Fab'-SH-fragmenter fra E. coli, hvilke kan kobles kjemisk for å danne bispesifikke antistoffer. Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992) beskriver produksjonen av et fullstendig humanisert bispesifikt antistoff-F(ab')₂-molekyl. Hvert Fab'-fragment ble separat utskilt fra E. coli og utsatt for kjemisk binding in vitro for å danne det bispesifikke antistoffet. Det således dannede bispesifikke

antistoffet kunne binde til celler som overuttrykker ErbB2-reseptoren og normale humane T-celler, samt utløser den lytiske aktiviteten for humane cytotoksiske lymfocytter mot humane brysttumormål.

5 Det er også beskrevet forskjellige teknikker for fremstilling og isolering av bispesifikke antistofffragmenter direkte fra rekombinant cellekultur. Bispesifikke antistoffer fremstilles for eksempel ved hjelp av leucinglidelåser. Kostelny et al., J. Immunol., 148 (5): 1547-1553 (1992). Leucinglidelåspeptidene fra Fos- og Jun-proteinene ble bundet til Fab'-delene av til forskjellige antistoffer ved
10 genfusjon.

Antistoffhomodimerene ble redusert ved hengselsregionen for å danne monomerer og deretter reoksidert for å danne antistoffheterodimerene. Denne fremgangsmåten kan også anvendes til produksjon av antistoffhomodimerer.

15 "Diastoff"-teknologien beskrevet av Hollinger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993) har tilveiebrakt en alternativ mekanisme for fremstilling av bispesifikke antistofffragmenter. Fragmentene omfatter en tung kjedes variable domene (VH) bundet til en lett kjedes variable domene (VL) ved hjelp
20 av en linker som er for kort til å muliggjøre paring mellom de to domenene på den samme kjeden. VH- og VL-domenene av ett fragment tvinges derfor til å pares med de komplementære VL- og VH-domenene av et annet fragment, og derved danne to antigenbindingssteder. En annen strategi for fremstilling av bispesifikke antistofffragmenter ved hjelp av enkjedede Fv (sFv)-dimerer er også
25 rapportert. Se Gruber et al., J. Immunol, 152: 5368 (1994).

Antistoffer med mer enn to valenser er tiltenkt. Det kan for eksempel fremstilles trispesifikke antistoffer. Tuttet al., J. Immunol. 147: 60(1991).

30 Aminosyresekvensmodifikasjoner av protein- eller peptidantagonister og antistoffer beskrevet heri er behandlet. Det kan for eksempel være ønskelig å forbedre bindingsaffiniteten og/eller andre biologiske egenskaper for BLYS-bindingsantistoffet eller antagonisten. Aminosyresekvensvarianter av antagonisten fremstilles ved å introdusere egnede nukleotidendringer til
35 antagonistnukleinsyren, eller ved peptidsyntese. Slike modifikasjoner inkluderer for eksempel delesjoner fra, og/eller insersjoner til og/eller substitusjoner av rester innenfor antagonistens aminosyresekvenser. En hvilken som helst

kombinasjon av delesjon, insersjon og substitusjon foretas for å oppnå den endelige konstruksjonen, forutsatt at den endelige konstruksjonen innehar de ønskede egenskapene. Aminosyreendringene kan også endre antagonistens posttranslasjonale prosesser, slik som endring av glykosyleringsstedenes antall eller posisjoner.

En nyttig fremgangsmåte for identifikasjon av visse rester eller regioner av antagonist som er foretrukne plasseringer for mutagenese, kalles "alaninskanningsmutagenese", som beskrevet av Cunningham and Wells Science, 244: 1081-1085 (1989). Her identifiseres en rest eller gruppe målrester (f.eks. ladede rester slik som arg, asp, his, lys og glu) og utbyttes med en nøytral eller negativt ladet aminosyre (mest foretrukket alanin eller polyalanin) for å påvirke interaksjonen av aminosyrene med antigen. De aminosyreplassingene som viser funksjonell sensitivitet overfor substitusjonene, raffineres deretter ved introduksjon av ytterligere eller andre varianter ved, eller for, substitusjonsstedene. Selv om stedet for introduksjon av en aminosyresekvensvariasjon er forhåndsbestemt, behøver ikke mutasjonens teknikk i seg selv å forhåndsbestemmes. For å analysere mutasjonens ytelse ved et bestemt sted utføres for eksempel tala-skanning eller tilfeldig mutagenese ved målkodonet eller -regionen, og de uttrykte antagonistvariantene screenes for ønsket aktivitet.

Aminosyresekvensinsersjoner inkluderer amino- og/eller karboksylterminale fusjoner som i lengde strekker seg fra én rest til polypeptider inneholdende hundre eller flere rester, og intrasekvensinsersjoner av enkle eller multiple aminosyrerester. Eksempler på terminale insersjoner inkluderer en antagonist med en N-terminal metionylrest eller antagonistens fusjonert til et cytotoxisk polypeptid. Andre insersjonale varianter av antagonistmolekylet inkluderer fusjonen til N- eller C-terminalen av antagonistens av et enzym, eller et polypeptid som øker antagonistens halveringstid i serum.

En annen varianttype er en aminosyresubstitusjonsvariant. Disse variantene har minst én aminosyrerest i antagonistmolekylet utbyttet med en annen rest. Stedene av størst interesse for substitusjonal mutagenese av antistoffantagonister inkluderer de hypervariable regionene, men FR-endringer er også tiltenkt. Konservative substitusjoner er vist i tabell 1 under overskriften "Foretrukne substitusjoner". Hvis slike substitusjoner resulterer i en endring i

biologisk aktivitet, kan det introduseres mer vesentlige endringer, kalt "eksempelsubstitusjoner" i tabell 1, eller som ytterligere beskrevet nedenfor under henvisning til aminosyreklasser, og produktene screenes.

- 5 Vesentlige modifikasjoner i antagonistens biologiske egenskaper oppnås ved valg av substitusjoner som skiller seg vesentlig i sin virkning på opprettholdelse av a) polypeptidhovedkjedens struktur i substitusjonens område, f.eks. som en plate- eller spiralkonformasjon, b) molekylets lading eller hydrofobisitet på målstedet eller c) sidekjedens hoveddel. Naturlig forekommende rester deles inn i grupper
- 10 basert på felles sidekjedeegenskaper: 1) hydrofob: norleucin, met, ala, val, leu, ile, (2) nøytral hydrofil: cys, ser, thr, (3) sur: asp, glu, (4) basisk: asn, gln, his, lys, arg, (5) rester som påvirker kjedeorientering: gly, pro og (6) aromatisk: trp, tyr, phe. Ikke-konservative substitusjoner vil medføre bytte av et medlem av en av disse klassene med en annen klasse.
- 15 En hvilken som helst cysteinrest som ikke er involvert i opprettholdelse av den riktige konformasjon av antagonisten, kan også substitueres, generelt med serin, for å forbedre molekylets oksidative stabilitet og forhindre uheldig kryssbinding. Cysteinbindinger kan omvendt tilsettes til antagonisten for å
- 20 forbedre dens stabilitet (særlig hvor antagonisten er et antistoffragment slik som et Fv-fragment).
- 25 Én særlig foretrukket type substitusjonal variant involverer substitusjon av én eller flere rester i den hypervariable regionen av et morantistoff. De resulterende variantene valgt for videre utvikling vil generelt ha forbedrede biologiske egenskaper i forhold til morantistoffet de er dannet fra. En praktisk måte å danne slike substitusjonale varianter på er affinitetsmodning ved hjelp av fagvisning. Kort fortalt er flere hypervariable regionssteder (f.eks. 6–7 steder) mutert til å generere alle mulige aminosubstitusjoner på hvert sted. De således
- 30 dannede antistoffvariantene vises på en monovalent måte fra filamentøse fagpartikler som fusjoner til gen III-produktet av M13 pakket i hver partikkel. De fagviste variantene screenes deretter for sin biologiske aktivitet (f.eks. bindingsaffinitet) som beskrevet heri. For å identifisere hypervariable kandidatregionssteder for modifikasjon kan alaninskanningsmutagenese utføres
- 35 for å identifisere hypervariable regionsenheter som bidrar vesentlig til antigenbinding. Det kan alternativt eller i tillegg være gunstig å analysere en krystallstruktur av antigenantistoffkomplekset for å identifisere kontaktpunkter

mellom antistoffet og antigenet. Slike kontaktrester og omkringliggende rester er kandidater for substitusjon ifølge teknikkene beskrevet heri. Straks slike varianter er dannet, utsettes variantpanelet for screening som beskrevet heri, og antistoffer med bedre egenskaper i ett eller flere relevante assayer kan velges for videre utvikling.

En annen type aminosyrevariant av antagonistens endrer antagonistens opprinnelige glykosyleringsmønster. Med endring menes delesjon av én eller flere karbohydratenheter påvist i antagonistens, og/eller tilsetning av ett eller flere glykosyleringssteder som ikke er til stede i antagonistens.

Glykosylering av polypeptider er typisk enten N-bundet eller O-bundet. Med N-bundet menes binding av karbohydratenheten til sidekjeden av en asparaginrest. Tripeptidsekvensene asparagin-X-serin og asparagin-X-treonin, hvor X er en hvilken som helst aminosyre unntatt prolin, er gjenkjenningssekvenser for enzymatisk binding av karbohydratenheten til asparaginsidekjeden. Forekomsten av en hvilken som helst av disse tripeptidsekvensene i et polypeptid danner således et potensielt glykosyleringssted. O-bundet glykosylering betyr binding av ett av sukkerne N-aceylgalaktosamin, galaktose eller xylose til en hydroksyaminosyre, vanligvis serin eller treonin, selv om 5-hydroksyprolin eller 5-hydroksylysin også kan anvendes.

Tilsetning av glykosyleringssteder til antagonistens oppnås enkelt ved endring av aminosyresekvensen slik at den inneholder én eller flere av de ovennevnte tripeptidsekvensene (for N-bundne glykosyleringssteder). Endringen kan også skje ved tilsetning av, eller substitusjon av, én eller flere serin- eller treoninrester til den opprinnelige antagonistens sekvens (for O-bundne glykosyleringssteder).

Nukleinsyremolekyler som koder for aminosyresekvensvarianter av antagonistens, fremstilles ved forskjellige fremgangsmåter som er kjent i teknikken. Disse fremgangsmåtene inkluderer, men er ikke begrenset til, isolering fra en naturlig kilde (når det gjelder naturlig forekommende aminosyresekvensvarianter) eller fremstilling ved oligonukleotidmediert (eller stedsrettet) mutagenese, PCR-mutagenese og kassettmutagenese av en tidligere fremstilt variant eller en ikke-variantversjon av antagonistens.

Det kan være ønskelig å modifisere antagonisten ifølge oppfinnelsen med hensyn til effektorfunksjon, f.eks. for å forsterke antigenavhengig cellemediert cytotoxicitet (ADCC) og/eller komplementære antagonists avhengige cytotoxicitet (CDC). Dette kan oppnås ved introduksjon av én eller flere

5 aminosyresubstitusjoner til en Fc-region i en antistoffantagonist. Cysteinrest(er) kan eventuelt eller i tillegg tilsettes til Fc-regionen, hvilket gir mulighet til dannelse av interkjededisulfidbinding i denne regionen.

Det således dannede homodimere antistoffet kan ha forbedret internaliseringsevne og/eller økt komplementmediert celledreping og antistoffavhengig cellecytotoxicitet (ADCC). Se Caron et al., J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) og Shopes, B.J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992). Homodimere antistoffer med forbedret antitumoraktivitet kan også fremstilles ved hjelp av heterobifunksjonelle kryssbindinger som beskrevet i Wolff et al.

10 Cancer Research 53: 2560-2565 (1993). Et antistoff med dobbelte Fc-regioner kan eventuelt konstrueres og kan derved ha forsterket komplementlyse og bedre ADCC-funksjoner. Se Stevenson et al. Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989).

For å øke antagonists halveringstid i serum kan man inkorporere en redningsreseptorbindingsepitop i antagonisten (spesielt et antistofffragment) som for eksempel beskrevet i US-patent 5 739 277. Som anvendt heri betyr betegnelsen "redningsreseptorbindingsepitop" en epitop fra Fc-regionen i et IgG-molekyl (f.eks. -IgG1, IgG2, IgG3 eller IgG4) som er ansvarlig for økning av

15 IgG-molekylets halveringstid i serum.

Assayer

Perifere B-cellekonsentrasjoner bestemmes ved en FACS-fremgangsmåte som

30 teller CD3-/CD40+-celler.

Prosenten av CD3-CD40+ B-celler av totale lymfocytter i prøver kan oppnås ved følgende gatingstrategi. Lymfocyttopulasjonen markeres på punktdiagrammet med spredning fremover / spredning sideveis for å definere region 1(Ri). Ved

35 hjelp av hendelser i RI vises fluorescensintensitetspunktgrafer for CD40-og CD3-

markører. Fluorescensmerkede isotypekontroller anvendes til å bestemme respektive avskjæringspunkter for CD40- og CD3-positivitet.

FACS-analyse

5

En halv million celler vaskes og suspenderes på nytt i 1001 av FACS-buffer, som er fosfatbufret saltløsning med 1 % BSA, inneholdende 5 ul farging- eller kontrollantistoff. Alle fargingsantistoffene, inkludert isotypekontrollene, er kjøpt fra PharMingen, San Diego, CA. Human BLYS-ekspresjon vurderes ved farging med Rituxan[®], sammen med FITC-konjugert anti-humant sekundært IgG1-antistoff.

10

FACS-analyse utføres ved hjelp av FACScan og Cell Quest (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA). Alle lymfocytene defineres i lysspredningene forover og til siden, mens alle B-lymfocytene defineres med ekspresjonen av B220 på celleoverflaten.

15

B-celledbryting og -gjenvinning vurderes ved analyse av perifere B-celletellinger og analyse av hBLYS+ B-celler av FACS i milten, lymfeknutene og benmargen daglig den første uken etter injeksjon, og deretter ukentlig. Serumnivåer for det injiserte 2H7-variantantistoffet overvåkes.

20

Farmasøytiske formuleringer

25

Terapeutiske formuleringer av BLYS-antagonister, slik som BLYS-bindingsantistoffer, fremstilles for oppbevaring ved blanding av et antistoff med den ønskede renhetsgraden med eventuelle farmasøytisk akseptable bærere, eksipienter eller stabilisatorer (Remitgtorz's Phamamaceutical Science 16. utgave, Osol, A. Ed. (1980)), i form av frysetørkede formuleringer eller vandig

30

løsninger. Akseptable bærere, eksipienter eller stabilisatorer er ikke-toksiske for mottagere ved de benyttede doseringene og konsentrasjonene og inkluderer buffere slik som fosfat, citrat og andre organiske syrer, antioksidanter, inkludert askorbinsyre og metionin, konserveringsmidler (slik som oktadecyldimetylbenzylammoniumklorid, heksametoniumklorid, benzalkoniumklorid, benzetoniumklorid, fenol-, butyl- eller benzylalkohol, alkylparabener slik som metyl- eller propylparaben, catekol, resorcinol,

35

sykloheksanol, 3-pentanol og m-cresol), polypeptider med lav molekylvekt (mindre enn ca. 10 rester), proteiner slik som serumalbumin, gelatin eller immunglobuliner, hydrofilpolymerer slik som olyvinylpyrrolidon, aminosyrer slik som glycin, glutamin, asparagin, histidin, arginin eller lysin, monosakkarider, disakkarider og andre karbohydrater, inkludert glukose, mannose eller dekstriner, kelaterende midler slik som EDTA, sukkere slik som sukrose, mannitol, trehalose eller sorbitol, saltdannende motioner slik som natrium, metallkomplekser (f.eks. Zn-proteinkomplekser) og/eller ikke-ioniske surfaktanter slik som TWEEN, PLURONICSTM eller polyetylglykol (PEG).

Formuleringen heri kan også inneholde mer enn én aktiv forbindelse som nødvendig for den bestemte indikasjonen som blir behandlet, foretrukket dem med komplementære aktiviteter som ikke virker negativt på hverandre. Det kan for eksempel være ønskelig for ytterligere å tilveiebringe et cytotoksisk middel, kjemoterapeutisk middel, cytokin eller immunsuppressivt middel (f.eks. et som virker på T-celler, slik som syklosporin eller et antistoff som binder T-celler, f.eks. et som binder LFA-1). Den virkningsfulle mengden av slike andre stoffer avhenger av mengden av antistoff i formuleringen, typen av sykdom eller lidelse eller behandling og andre faktorer behandlet ovenfor. Disse anvendes generelt i samme doser og med administreringsveier som beskrevet heri eller ca. fra 1 til 99 % av de hittil anvendte dosene.

De aktive ingrediensene kan også være innfanget i mikrokapsler som er fremstilt for eksempel ved koacerveringsteknikker eller ved kontaktflatepolymerisering, f.eks. henholdsvis hydroksymetylcellulose eller gelatinmikrokapsler og poly-(metylmetacrylat)mikrokapsler, i kolloidale legemiddeltilførselssystemer (f.eks. liposomer, albuminmikrosfærer, mikroemulsjoner, nanopartikler og nanokapsler) eller i makroemulsjoner. Slike teknikker er beskrevet i Remington's Pharmaceutical Sciences 16. utgave, Osol, A. Ed. (1980).

Det kan fremstilles fremstillinger for forsinket frisetting. Egnede eksempler på fremstillinger med forsinket frisetting omfatter semipermeable matriser av faste hydrofobe polymerer inneholdende antagonist, hvilke matriser er i form av formede artikler, f.eks. filmer eller mikrokapsler. Eksempler på matriser for forsinket frisetting inkluderer polyestere, hydrogeler (f.eks. poly(2-hydroksyetylmetakrylat) eller poly(vinylalkohol)), polylaktider (US-pat. nr. 3 773 919), kopolymerer av L-glutaminsyre og etyl-L-glutamat, ikke-nedbrytbart etylen-

vinylacetat, nedbrytbare melkesyre-glykolsyre-kopolymerer slik som LUPRON DEPOT (injiserbare mikrosfærer sammensatt av melkesyre-glykolsyre-kopolymer og leuprolidacetat) og poly-D-(-)-3-hydroksysmørsyre.

- 5 Formuleringene som skal anvendes til administrering in vivo, må være sterile. Dette oppnås enkelt ved filtrering gjennom sterile filtreringsmembraner.

Sykdomsbehandling

10

Sykdommer

15

20

25

30

35

De immunsuppressive legemidlene og BLYS-antagonistene ifølge oppfinnelsen er nyttige for å behandle B-celleregulerte autoimmune lidelser. B-celleregulerte autoimmune sykdommer inkluderer artritt (revmatoid artritt, juvenil revmatoid artritt, artrose, psoriasisartritt), psoriasis, dermatitt, inkludert atopisk dermatitt, kronisk autoimmun elveblest, polymyositt/dermatomyositt, toksisk epidermal nekrolyse, systemisk skleroderma og sklerose, responser assosiert med inflammatorisk tarmsykdom (IBD) (Crohns sykdom, ulcerøs kolitt), respiratorisk distressyndrom, lungesviktsyndrom hos voksne (ARDS), meningitt, allergisk rhinitt, encefalitt, uveitt, kolitt, glomerulonefritt, allergiske tilstander, eksem, astma, tilstander som involverer infiltrering av T-celler og kroniske inflammatoriske responser, aterosklerose, autoimmun myokarditt, leukocyttadhesjonssvikt, systemisk lupus erythematosus (SLE), lupus (inkludert nefritt, ikke-renal, diskoid, alopesi), diabetes med juvenil debut, multippel sklerose, allergisk encefalomyelitt, immunresponser assosiert med akutt og forsinket hypersensitivitet medierte av cytokiner og T-lymfocytter, tuberkulose, sarkoidose, granulomatose, inkludert Wegeners granulomatose, agranulocytose, vaskulitt (inkludert ANCA), aplastisk anemi, Coombs positive anemi, Diamond Blackfan-anemi, immun hemolytisk anemi, inkludert autoimmun hemolytisk anemi (AIHA), pernisiøs anemi, ren rødcelleaplasti (PRCA), faktor VIII-mangel, hemofili A, autoimmun neutropeni, pancytopeni, leukopeni, sykdommer som involverer leukocyttadiapedese, CNS-inflammatoriske lidelser, multippelt organskadesyndrom, myasthenia gravis, antigen-antistoff-kompleks-medierte sykdommer, anti-GBM-sykdom, antifosfolipidantistoffsyndrom, allergisk neuritt, Bechets sykdom, Castlemans syndrom, Goodpastures syndrom, Lambert-Eatons

myasteniske syndrom, Reynauds syndrom, Sjögrens syndrom, Stevens-Johnsons syndrom, fastorgantransplantavstøtning (inkludert forbehandling for antistofftitere med høy panelreaktivitet, IgA-avsetning i vev osv.), transplantat-mot-vert-sykdom (GVHD), pemfigoid bulløs, pemfigus (alle inkludert vulgaris, foliaceus), autoimmune polyendokrinopater, Reiters sykdom, Moersch-Woltmanns syndrom, storcelleartritt, immunkompleksnefrititt, IgA-nefropati, IgM-polynevropatier eller IgM-mediert nevropati, ideopatisk trombocytopenisk purpura (ITP), trombotisk trombocytopenisk purpura (TTP), autoimmun trombocytopeni, autoimmun sykdom i testikkel og eggstokk, inkludert autoimmun orkitt og ooforitt, primær hypotyreoidisme, autoimmune endokrine sykdommer, inkludert autoimmun tyroiditt, kronisk tyroiditt (Hashimotos Thyroiditis), subakutt tyroiditt, idiopatisk hypotyreoidisme, Addisons sykdom, Graves sykdom, autoimmune polyglandulære syndromer (eller polyglandulære endokrinopatisyndromer), type I-diabetes også omtalt som insulinavhengig diabetes mellitus (IDDM) og Sheehans syndrom, autoimmun hepatitt, lymfoid interstitial pneumonitt (HIV), obliterativ bronkiolitt (ikke-transplantat) vs. NSIP, Guillain-Barres syndrom, vaskulitt i stort kar (inkludert polymyalgia rheumatica og kjempecelleartritt (Takayusus artritt), vaskulitt i mellomstort kar (inkludert Kawasakis sykdom og polyartritt nodosa), ankyloserende spondylitt, Bergers sykdom (IgA-nefropati), hurtig progressiv glomerulonefritt, primær biliær cirrose, cøliaki (glutenenteropati), cryoglobulinemi, ALS, koronararteriesykdom.

Det ønskede nivået av B-celledbryting vil avhenge av sykdommen. B-celledbrytingen er foretrukket tilstrekkelig til å forebygge progresjon av sykdom i minst 2 måneder, mer foretrukket 3 måneder, enda mer foretrukket 4 måneder, mer foretrukket 5 måneder, enda mer foretrukket 6 måneder eller flere. I enda mer foretrukne utførelsesformer er B-celledbrytingen tilstrekkelig til å øke remisjonstiden med minst 6 måneder, mer foretrukket 9 måneder, mer foretrukket 1 år, mer foretrukket 2 år, mer foretrukket 3 år, enda mer foretrukket 5 år eller mer. I en mest foretrukket utførelsesform er B-celledbrytingen tilstrekkelig til å kurere sykdommen. I foretrukne utførelsesformer er B-celledbrytingen i den autoimmune pasienten minst kortvarig ca. 75 % og mer foretrukket 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % og også 100 % av baselinenivået før behandling.

For behandling av en autoimmun sykdom kan det være ønskelig å modulere graden av B-celledbryting avhengig av sykdommen og/eller tilstandens

alvorlighetsgrad hos den individuelle pasienten, ved å justere dosen av det immunsuppressive legemiddelet eller BLYS-

antagonisten. B-celledbryting kan således, men ikke nødvendigvis, være komplett. Total B-celledbryting kan eventuelt være ønsket i initial behandling, men i etterfølgende behandlinger kan dosen justeres for å oppnå bare partiell nedbryting. I en utførelsesform er B-celledbrytingen minst 20 %, dvs. 80 % eller mindre av B-cellerester sammenlignet med baselinenivået før behandling. I andre utførelsesformer er B-celledbrytingen 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % eller større.

B-celledbrytingen er foretrukket tilstrekkelig til å stoppe progresjon av sykdommen, mer foretrukket til å lindre tegnene og symptomene på den særlige sykdommen under behandling, enda mer foretrukket til å kurere sykdommen.

For terapeutiske anvendelser kan det immunsuppressive legemiddelet og BLYS-antagonistsammensetningene ifølge oppfinnelsen anvendes i kombinasjonsbehandling med ytterligere legemidler, slik som antiinflammatoriske legemidler, inkludert DMARDS og andre biologiske midler. De foregående behandlingsmetodene kan administreres i kombinasjon med andre former for konvensjonell behandling for autoimmun sykdom, enten samtidig med, før eller etter konvensjonell behandling.

En pasient lindres eller behandles med hell for en B-celleregulert autoimmun sykdom ved de foreliggende fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen hvis det er en målbar forbedring i symptomene eller andre aktuelle kriterier etter administrering av sammensetningene ifølge oppfinnelsen, sammenlignet med før behandling. Effekten av behandling kan være åpenbar innen 3–10 uker etter administrering av sammensetningene ifølge oppfinnelsen. De aktuelle kriteriene for hver sykdom vil være velkjent for en lege med erfaring fra egnet teknikk.

Legen kan for eksempel overvåke den behandlede pasienten for kliniske, eller serologiske tegn på sykdom, slik som serologiske sykdomsmarkører, komplett blodtelling, inkludert B-celletelling, og immunglobulinserumnivåer. Nivåer av IgG og IgM i serum reduseres hos mus behandlet med BLYS- og/eller APRIL-antagonister, slik som atacicept. Humane pasienter som responderer på ataciceptbehandling, viser likeledes en reduksjon i IgG- og IgM-serumnivåer.

Parameterne for vurdering av behandlingseffekt eller -suksess for en autoimmun eller autoimmunrelatert sykdom vil være kjent for en lege spesialisert på den aktuelle sykdommen. Den erfarne lege vil generelt se etter reduksjon i tegn og symptomer på den spesifikke sykdommen. Det følgende gis i form av eksempler.

5

Revmatoid artritt (RA) er en autoimmun lidelse av ukjent etiologi. De fleste RA-pasienter lider av et kronisk sykdomsforløp som også med behandling kan resultere i progressiv leddestruksjon, deformitet, uførhet og også premature dødsfall. Målene med RA-behandling er å forebygge eller regulere leddskade, forebygge tap av funksjon og redusere smerte. Initial behandling av RA involverer vanligvis administrering av ett eller flere av følgende legemidler: ikke-steroid antiinflammatoriske midler (NSAID-er), glukokortikoid (via leddinjeksjon) og prednison i lav dose. Se "Guidelines for the management of rheumatoid arthritis" Arthritis & Rheumatism 46 (2): 328–346 (februar 2002). Flertallet av pasienter med nylig diagnostisert RA får først sykdomsmodifiserende antirevmatisk legemiddelbehandling (DMARD) innen 3 måneder etter diagnose.

10

15

DMARD-er ofte anvendt ved RA er hydroksyklorokin, sulfasalazin, metotreksat, leflunomid, etanercept, infliximab (pluss oral og subkutan metotreksat), azatioprin, D-penicillamin, gull (oral), gull (intramuskulært), minosyklin, syklosporin, stafylokokkprotein A-immunadsorpsjon.

20

Siden kroppen produserer tumornekrosefaktor alfa (TNF α) under RA, anvendes TNF α -inhibitorer til behandling av denne sykdommen. Etanercept (ENBREL) er et injiserbart legemiddel godkjent i USA for behandling av aktiv RA. Etanercept binder til TNF α og tjener til å fjerne mesteparten av TNF α fra ledd og blod, hvilket forhindrer at TNF α fremmer inflammasjon og andre symptomer på revmatoid artritt.

25

Etanercept er et "Fc-fusjonsprotein" bestående av den ekstracellulære ligandbindingsdelen av den humane 75 kD (p75) tumornekrosefaktorreseptoren (TNFR) bundet til Fc-delen av et humant Ig G1.

30

Infliximab, solgt under navnet REMICADE, er et immunsuppressivt legemiddel foreskrevet for å behandle RA og Crohns sykdom. Infliximab er et kimært monoklonalt antistoff som binder til TNF og reduserer inflammasjon i kroppen ved målretting og binding til TNF α , som produserer inflammasjon.

35

Adalimumab (HUMIRATM, Abbott Laboratories), tidligere kjent som D2E7, er et humant monoklonalt antistoff som binder til TNFa og er godkjent for å redusere tegn og symptomer og inhibering av progresjonen av strukturell skade hos voksne med moderat til alvorlig aktiv RA som har hatt utilstrekkelig respons på én eller flere tradisjonelle sykdomsmodifiserende DMARD-er.

Behandling av revmatoid artritt ved administrering av immunsuppressive legemidler og en BLYS-antagonist kan utføres i kombinasjon med behandling med ett eller flere av de ovennevnte legemidlene for RA. For revmatoid artritt kan for eksempel målinger for progresjon i behandlingen inkludere antallet av hovne og ømme ledd og varigheten av morgenstivhet. Pasienter kan undersøkes for hvor mye leddene i hendene og føttene har erodert ved hjelp av røntgenstråler og et målesystem kjent som Sharp-score. Et annet scoresystem er basert på American College of Rheumatologys kriterier for vurdering av respons på behandlinger.

En fremgangsmåte for evaluering av behandlingseffekt ved RA er basert på American College of Rheumatologys (ACR) kriterier, som blant annet måler prosentandelen av forbedring i ømme og hovne ledd. RA-pasienten kan scores ved for eksempel ACR 20 (20 prosent forbedring) sammenlignet med ingen antistoffbehandling (f.eks. baseline før behandling) eller behandling med placebo. Andre måter å evaluere effekten av antistoffbehandling på inkluderer røntgenstrålingsscore, slik som Sharp-røntgenscore anvendt til å vurdere strukturell skade, slik som benerosjon og innsnevring av mellomrom mellom ledd. Pasienter kan også evalueres for forebygging eller forbedring av nedsatt funksjonsevne basert på scoren på et helsevurderingsskjema [HAQ], AIMS, SF-36 i tidsperioder under eller etter behandling. ACR 20-kriteriene kan inkludere 20 % forbedring i både antallet av ømme (smertefulle) ledd og antallet av hovne ledd, pluss en 20 % forbedring i minst 3 av 5 ytterligere målinger:

1. Pasientens smertevurdering ved visuell analog skala (VAS),
2. pasientens globale vurdering av sykdomsaktivitet (VAS),
3. legens globale vurdering av sykdomsaktivitet (VAS),
4. pasientens egenvurdering av nedsatt funksjonsevne målt ved HAQ og
5. akutte fasereaktanter, CRP eller ESR.

ACR 50 og 70 defineres tilsvarende. Pasienten får foretrukket administrert en mengde av et BLYS-bindingsantistoff ifølge oppfinnelsen som er virkningsfull for å oppnå minst en score på ACR 20, foretrukket minst ACR 30, mer foretrukket minst ACR 50, enda mer foretrukket minst ACR 70, mest foretrukket minst ACR 75 og høyere.

5

Psoriasisartritt har unike og distinktive radiografiske trekk. For psoriasisartritt kan ledderosjon og innsnevring av mellomrom mellom ledd også evalueres ved Sharp-scoren. De humaniserte BLYS-bindingsantistoffene beskrevet heri kan anvendes til å forebygge leddskader samt redusere sykdomstegn og symptomer på lidelsen.

10

Enda et annet aspekt av oppfinnelsen vedrører behandling av lupus eller SLE hos en pasient som lider av SLE, ved hjelp av en terapeutisk virkningsfull mengde av en BLYS- og/eller APRIL-antagonist (som definert i kravene) i kombinasjon med det immunsuppressive legemiddelet MMF. SLEDAI-målinger tilveiebringer en numerisk mengdebestemmelse av sykdomsaktivitet. SLEDAI er en vektet indeks med 24 kliniske parametere og laboratorieparametere som er kjent for å korrelere med sykdomsaktivitet, med et tallområde fra 0 til 103. Se Bryan Gescuk & John Davis, "Novel therapeutic agent for systemic lupus erythematosus" i Current Opinion in Rheumatology 2002,14 : 515-521. Antistoffer mot dobbelttrådet DNA er antatt å forårsake renale reaksjoner og andre manifestasjoner av lupus. Pasienter som gjennomgår antistoffbehandling, kan overvåkes for tiden til renal reaksjon, som er definert som en signifikant, reproducerbar økning i serumkreatinin, urinprotein eller blod i urinen. Alternativt eller i tillegg kan pasienter overvåkes for nivåer av antinukleære antistoffer og antistoffer mot dobbelttrådet DNA. Behandlinger for SLE inkluderer kortikosteroider med høy dose og/eller syklofosamid (HDCC). For systemisk lupus erythematosus kan pasienter overvåkes for nivåer av antinukleære antistoffer og antistoffer mot dobbelttrådet DNA.

15

20

25

30

Et særlig aspekt ved den foreliggende oppfinnelsen er behandlingen av lupusnefritt med en kombinasjon av det immunsuppressive legemiddelet MMF og en BLYS-antagonist, slik som atacicept, som definert i kravene.

35

Spondyloartropatier er en gruppe av leddlidelser, inkludert ankyloserende spondylitt, psoriasisartritt og Crohns sykdom. Vellykket behandling kan bestemmes ved validerte måleredskaper for global vurdering av pasient og lege.

5 En ytterligere autoimmun sykdom som kan behandles ved hjelp av den foreliggende oppfinnelsen, er psoriasis. Forskjellige legemidler anvendes for øyeblikket til å behandle psoriasis. Behandlingen skiller seg direkte i forbindelse med sykdommens alvorlighetsgrad. Pasienter med en mildere form for psoriasis benytter typisk lokale behandlinger, slik som lokale steroider, antralin, 10 kalsipotrien, klobetasol og tazaroten, til å håndtere sykdommen, mens pasienter med moderat og alvorlig psoriasis sannsynligvis benytter systemiske (metotreksat, retinoider, syklosporin, PLTVA og UVB) behandlinger. Tjære anvendes også. Disse behandlingene har en kombinasjon av sikkerhet, tidkrevende regimer eller besværlige behandlingsprosesser. Noen krever videre 15 dyrt utstyr og spesialtilpassede arbeidsforhold. Systemiske legemidler kan gi alvorlig bivirkninger, inkludert hypertensjon, hyperlipidemi, benmargssuppresjon, leversykdom, nyresykdom og mage-tarm-problemer. Anvendelsen av fototerapi kan også øke insidensen av hudkreft. I tillegg til besværet og ubehaget assosiert med anvendelsen av lokale behandlinger krever 20 fototerapi og systemiske behandlinger sirkulering av pasienter på og av behandling og overvåkning av livslang eksponering på grunn av deres bivirkninger.

Behandlingseffekt for psoriasis vurderes ved overvåkning av endringer i kliniske 25 tegn og symptomer på sykdommen, inkludert endringer i PGA (Physician's Global Assessment) og score på PASI (Psoriasis Area and Severity Index), PSA (Psoriasis Symptom Assessment), sammenlignet med baselinetilstanden. Pasienten kan måles periodisk gjennom hele behandlingen på den visuelle analoge skalaen for å angi graden av kløe opplevd på spesifikke tidspunkter.

30 Forskjellige andre inflammatoriske sykdommer som har en autoimmun årsakssammenheng, omfattes også av den foreliggende oppfinnelsen. Blant sykdommene som er spesifikt tiltenkt, er autoimmun hepatitt og autoimmun tyroiditt. Autoimmun hepatitt involverer inflammasjon av leveren på grunn av selvangrep av pasientens eget immunsystem. Selvangrep og resulterende 35 inflammasjon av skjoldbruskkjertelen er likeledes den biologiske årsaken til autoimmun tyroiditt. Slike sykdommer forventes å lindres ved hjelp av

kombinasjonen av BLyS- og/eller APRIL-antagonist med et immunsuppressivt legemiddel slik som MMF.

Dosering

5

Avhengig av indikasjonen som skal behandles, og faktorer som er relevante for dosering, som en erfaren lege vil være kjent med, administreres BLyS-antagonister og MMF ved en dose som er effektiv for behandlingen av indikasjonen, mens toksisitet og bivirkninger minimeres. BLyS-antagonisten ifølge den foreliggende oppfinnelsen vil generelt bli administrert til en human pasient i et doseringsområde på ca. 0,25 mg/kg til ca. 25 mg/kg kroppsvekt, foretrukket ved ca. 1 mg/kg til ca. 10 mg/kg. Alternativt uttrykt er et foretrukket område av doseringer for BLyS-antagonisten ca. 75 til ca. 190 mg per dose. I en foretrukket utførelsesform er dosen ca. 150 mg per dose for BLyS-antagonisten.

15

Beskrivelsen beskriver en kombinasjon av samtidig og sekvensiell administrering av de immunsuppressive legemidlene og BLyS-antagonisten (begge omtalt heri som behandlingsenheter). Ved sekvensiell administrering kan behandlingsenheter administreres i en hvilken som helst rekkefølge, f.eks. immunsuppressive legemidler først etterfulgt av BLyS-antagonist. Pasienten kan behandles med ett legemiddel og overvåkes for effekt før behandling med det ene legemiddelet. Hvis for eksempel det immunsuppressive legemiddelet gir en partiell respons, kan behandlingen etterfølges med BLyS-antagonisten for å oppnå en full respons, og omvendt. Pasienten kan alternativt initialt få administrert begge legemidlene, og etterfølgende dosering kan være med bare ett eller det andre legemiddelet.

20

25

30

35

For å gjøre pasienten tolerant overfor legemidlene og/eller for å redusere forekomsten av bivirkninger slik som infusjonsrelaterte symptomer som skyldes den initiale og etterfølgende administrasjonen av den terapeutiske forbindelsen, kan pattedyret med behov for det få administrert en første eller initial forberedelsesdose av det ene eller begge legemidlene, og deretter få administrert minst en andre terapeutisk virkningsfull dose av det ene eller begge legemidlene hvori den andre og eventuelle etterfølgende doser er høyere enn den første dosen. Den første dosen tjener til å forberede pattedyret på å tolerere den høyere andre terapeutiske dosen. Pattedyret er således i stand til å tolerere

høyere doser av den terapeutiske forbindelsen enn det som initialt kunne administreres. En "forberedelsesdose" er en dose som demper eller reduserer frekvensen eller alvorlighetsgraden av den første dosens bivirkninger assosiert med administrering av en terapeutisk forbindelse. Forberedelsesdosen kan være

5 en terapeutisk dose, en underterapeutisk dose, en symptomatisk dose eller en undersymptomatisk dose. En terapeutisk dose er en dose som viser en terapeutisk effekt på pasienten, og en underterapeutisk dose er en dose som ikke viser en terapeutisk effekt på den behandlede pasienten. En symptomatisk dose er en dose som induserer minst én bivirkning ved administrering, og en

10 undersymptomatisk dose er en dose som ikke induserer en bivirkning. Noen bivirkninger er feber, hodepine, kvalme, oppkast, pustevansker, myalgi og frysninger.

Utover et forberedelsesdoseregime er det atskillige andre regimer som kan

15 følges for å oppnå sykdomslindring. Én slik metode er et kort behandlingsforløp med ett immunsuppressivt legemiddel, etterfulgt av gradvis seponering, etterfulgt av behandling med kombinasjonen av et annet immunsuppressivt legemiddel og BLYS-antagonisten. Kortikosteroider (ikke omfattet av kravene) kan for eksempel gis oralt i doser på 1000–1500 mg to ganger om dagen i fire

20 uker, etterfulgt av gradvis seponering på 5 mg/uke ned til 10 mg/dag i løpet av 10 uker. Når det er tid for å begynne med BLYS-antagonisten, kan et støtdoseregime være egnet. Atacicept kan særlig administreres to ganger per uke i fire uker, etterfulgt av ukentlig administrering i en forlenget tidsperiode, slik som 48 uker. Til sammenligning vil det immunsuppressive legemiddelet

25 vanligvis administreres i et eskalerende doseregime. MMF kan for eksempel administreres ved en dose på 500 mg to ganger daglig og økes til 750 mg to ganger daglig etter to uker. Ukentlige økninger i dose kan foretas opp til en maksimal dose på 1000 mg 3 ganger daglig hvis pasientens antall av hvite blodceller forblir på akseptable nivåer (dvs. over $3,0 \times 10^9/l$ eller $3000/mm^2$).

30 Det vil særlig forventes at det maksimale området for administrering av MMF vil være fra 2000 til 3000 mg per pasient per dag.

Administreringsvei

35 BLYS-antagonisten og MMF-et kan være for administrering til en human pasient i samsvar med kjente fremgangsmåter, slik som ved intravenøs administrering,

f.eks. som en bolus eller ved kontinuerlig infusjon over en tidsperiode, ved subkutane, intramuskulære, intraperitoneale, intracerebrospinale, intraartikulære, intrasynoviale, intratekale eller inhalerende veier. Immunsuppressive legemidler med egnet formulering kan også administreres oralt eller lokalt. BLYS-antagonisten og MMF vil generelt være for intravenøs eller subkutan administrering. De forskjellige behandlingsenhetene kan administreres ved samme eller forskjellige veier.

Anordninger og kit

Beskrivelsen beskriver en anordning omfattende en BLYS-antagonist og immunsuppressive legemidler for å behandle en B-celleregulert autoimmun lidelse, som beskrevet ovenfor. Anordningen kan inneholde actacept og MMF for behandling av lupusnefritt.

Anordningen omfatter minst én beholder, og en etikett eller et pakningsvedlegg på eller assosiert med beholderen. Egnede beholdere omfatter for eksempel flasker, glass, sprøyter osv. Beholderne kan være dannet fra en rekke materialer slik som glass eller plast. Beholderen inneholder en sammensetning ifølge oppfinnelsen som er virkningsfull for behandling av tilstanden, og kan ha en steril tilgangsport (f.eks. kan beholderen være en intravenøs løsningspose eller et glass med en kork som kan perforeres med en hypoderm injeksjonsnål). Etiketten eller pakningsvedlegget angir at sammensetningen anvendes til behandling av den særlige tilstanden, f.eks. lupusnefritt eller revmatoid artritt. Etiketten eller pakningsvedlegget vil videre omfatte anvisninger for administrering av sammensetningen til pasienten. Anordningen kan videre i tillegg omfatte en andre beholder omfattende en farmasøytisk akseptabel buffer, slik som bakteriostatisk vann for injeksjon (BWFI), fosfatbufret saltløsning, Ringers løsning og dekstroseløsning. Den kan videre omfatte andre materialer som er ønskelige fra et handels- eller brukerperspektiv, herunder andre buffere, fortynningsmidler, filtre, nåler og sprøyter.

Det er også tilveiebrakt kit som er nyttige for forskjellige formål, f.eks. for B-celledrepingsassayer. Som med anordningen omfatter analysesettet en beholder og en etikett eller et pakningsvedlegg på eller assosiert med beholderen. Beholderen inneholder en sammensetning omfattende minst ett

immunsuppressivt legemiddel og én BLYS-antagonist ifølge oppfinnelsen. Det kan være inkludert ytterligere beholdere som for eksempel inneholder fortynningsmidler og buffere, kontrollantistoffer. Etiketten eller pakningsvedlegget kan tilveiebringe en beskrivelse av sammensetningen, samt instruksjoner for den tiltenkte anvendelse in vitro eller diagnostiske anvendelse.

Forsøkseksempler

Eksempel 1

Produksjon av BLYS- og/eller APRIL-antagonist

Det ble generert fire aminoterminal trunkerte versjoner av TACI-Fc. Alle fire hadde en modifisert human vevsplasminogenaktivatorsignalsekvens som beskrevet i WO 02/094852 (SEQ ID NO: 41) fusjonert til aminosyrerest nr. 30 av SEQ ID NO:2. De fire proteinene var imidlertid forskjellige i plasseringen av punktet hvori Fc5 ble fusjonert til TACI-aminosyresekvensen i SEQ ID NO:2. Tabell 1 beskriver strukturene for de fire fusjonsproteinene.

Tabell 1

TACI Fc-fusjonsproteiner	
Betegnelse for TACI-Fc	TACI-aminosyrerester
TACI(d1-29)-Fc5	30 til 154 av SEQ ID NO:2
TACI(d1-29, d107-154)-Fc5	30 til 106 av SEQ ID NO:2
TACI(d1-29, d111-154)-Fc5	30 til 110 av SEQ ID NO:2
TACI(d1-29, d120-154)-Fc5	30 til 119 av SEQ ID. SEQ ID NO:2

Protein som koder for ekspresjonskassetter, ble generert ved overlappende PCR ved hjelp av standardteknikker (se for eksempel Horton et al., Gene 77:61 (1989)). Et nukleinsyremolekyl som koder for TACI, og et nukleinsyremolekyl

som koder for Fc5, ble anvendt som PCR-templater. Oligonukleotidprimere er identifisert i tabell 2 og 3.

Tabell 2

Oligonukleotidprimere anvendt til å produsere TACI-fusjonsproteiner				
Betegnelse for TACI-Fc	Oligonukleotidbetegnelser			
	5' TACI	3' TACI	5' Fc5	3' Fc5
TACI(d1-29)-Fc5	ZC24,903	ZC24,955	ZC24,952	ZC24,946
TACI(d1-29, d107-154)-Fc5	ZC24,903	ZC24,951	ZC24,949	ZC24,946
TACI(d1-29, d111-154)-Fc5	ZC24,903	ZC28,978	ZC28,979	ZC24,946
TACI(d1-29, d120-154)-Fc5	ZC24,903	ZC28,981	ZC28,980	ZC24,946

5

Tabell 3

Oligonukleotidsekvenser		
Primer	Nukleotidsekvens	SEQ ID NO.
C24,903	5' TATTAGGCCGGCCACCATGGATGCAATGA 3'	27
ZC24,955	5' TGAAGATTTGGGCTCCTTGAGACCTGGGA 3'	28
ZC24,952	5' TCCCAGGTCTCAAGGAGCCCAAATCTTCA 3'	29
ZC24,946	5' TAATTGGCGCGCCTCTAGATTATTTACCCGGAGACA 3'	30
ZC24,951	5' TGAAGATTTGGGCTCGTTCTCACAGAAGTA 3'	31
ZC24,949	5' ATACTTCTGTGAGAACGAGCCCAAATCTTCA 3'	32
ZC28,978	5' TTTGGGCTCGCTCCTGAGCTTGTTCTCACA 3'	33
ZC28,979	5' CTCAGGAGCGAGCCCAAATCTTCAGACA 3'	34
ZC28,981	5' TTTGGGCTCCCTGAGCTCTGGTGGAA 3'	35
ZC28,980	5' GAGCTCAGGGAGCCCAAATCTTCAGACA 3'	36

Den første runden med PCR-amplifikasjoner besto av to reaksjoner for hver av de fire aminoterminalene trunkerte versjonene. De to reaksjonene ble utført

10

separat ved hjelp av 5' og 3' TACI-oligonukleotidene i én reaksjon, og 5' og 3' Fc5-oligonukleotidene i en annen reaksjon for hver versjon. Betingelsene for den første rundens PCR-amplifikasjon var som følger. Til et 25 µl sluttvolum ble det tilsatt ca. 200 ng templat-DNA, 2,5 µl 10x Pfu-reaksjonsbuffer (Stratagene), 2 µl av 2,5 mM dNTP-er, 0,5 µl av 20 µM hver 5'-oligonukleotid og 3'-oligonukleotid, og 0,5 µl Pfu-polymerase (2,5 enheter, Stratagene). Amplifikasjonens termiske profil besto av 94 °C i 3 minutter, 35 sykluser ved 94° C i 15 sekunder, 50 °C i 15 sekunder, 72° C i 2 minutter, etterfulgt av en 2 minutters forlengelse ved 72 °C. Reaksjonsproduktene ble fraksjonert ved agarosegelelektroforese, og båndene tilsvarende de predikerte størrelsene ble eksidert fra gelen og gjenvunnet ved hjelp av et QIAGEN QIAQUICK-gelekstraksjonskit (Qiagen), ifølge produsentens bruksanvisning.

Den andre runden med PCR-amplifikasjon, eller overlappende PCR-amplifikasjonsreaksjon, ble utført ved hjelp av de gelrensede fragmentene fra den første runden med PCR som DNA-templat. Betingelsene for andre rundes PCR-amplifikasjon var som følger. Til et 25 µl sluttvolum ble det tilsatt ca. 10 ng templat-DNA hver av TACI-fragmentet og Fc5-fragmentet, 2,5 µl 10x Pfu-reaksjonsbuffer (Stratagene), 2 µl av 2,5 mM dNTP-er, 0,5 µl av 20 µM hver ZC24,903 (SEQ ID NO:27) og ZC24,946 (SEQ ID NO:30) og 0,5 µl Pfu-polymerase (2,5 enheter, Stratagene). Amplifikasjonens termiske profil besto av 94 °C i 1 minutt, 35 sykluser ved 94° C i 15 sekunder, 55 °C i 15 sekunder, 72° C i 2 minutter, etterfulgt av en 2 minutters forlengelse ved 72 °C. Reaksjonsproduktene ble fraksjonert ved agarosegelelektroforese, og båndene tilsvarende de predikerte størrelsene ble eksidert fra gelen og gjenvunnet ved hjelp av et QIAGEN QIAQUICK-gelekstraksjonskit (Qiagen), ifølge produsentens bruksanvisning.

Hver av de fire versjonene av de aminoterminale trunkerte TACI-Fc PCR-produktene ble separat klonet ved hjelp av ZEROBLUNT TOPO PCR-kloningskit fra Invitrogen ifølge produsentens anbefalte protokoll. Tabell 4 identifiserer nukleotid- og aminosyresekvensene for disse TACI-Fc-konstruksjonene.

Tabell 4

Sekvenser av TACI-Fc-varianter	
Betegnelse for TACI-Fc	SEQ ID Nos.

	Nukleotid	Aminosyre
TACI(d1-29)-Fc5	18	19
TACI(d1-29, d107-154)-Fc5	20	21
TACI(d1-29, d111-154)-Fc5	22	23
TACI(d1-29, d120-154)-Fc5	24	25

Etter at nukleotidsekvensene var verifisert, ble plasmider omfattende hver av de fire versjonene av de aminoternale trunkerte TACI-Fc-fusjonene brutt ned med FseI og AscI for å frisette aminosyren som koder for segmentene. FseI – AscI-fragmentene ble ligert til en pattedyrekspresjonsvektor inneholdende en CMV-promoter og et SV40 poly A-segment. Ekspresjonsvektorer ble introdusert til eggstokkceller fra kinesisk hamster, som beskrevet nedenfor.

Eksempel 2

Produksjon av TACI-Fc-proteiner med eggstokkceller fra kinesisk hamster

TACI-Fc-ekspresjonskonstruksjonene ble anvendt til å transfektare, via elektroporering, suspensjonstilpassede CHO DG44-celler (CHO, eggstokk fra kinesisk hamster) dyrket i animalsk proteinfritt medium (Urlaub et al., Som. Cell. Molec. Genet. 12:555 (1986)). CHO DG44-celler mangler et funksjonelt dihydrofolatreduktasegen på grunn av delesjoner på begge de kromosomale stedene for dihydrofolatreduktase. Vekst av cellene i nærvær av økte konsentrasjoner av metotreksat resulterer i amplifikasjonen av dihydrofolatreduktasegenet og det bundne rekombinante proteinkodede genet på ekspresjonskonstruksjonen.

CHO DG44-celler ble passert i PFCHO-medium (JRH Biosciences, Lenexa, KS), 4 mM L-glutamin (JRH Biosciences) og 1x hypotanksin-tymidinsupplement (Life Technologies), og cellene ble inkubert ved 37° C og 5 % CO₂ i Coming-risteflasker ved 120 o/min på en roterende ristepattform. Cellene ble

transfektet separat med lineariserte ekspresjonsplasmider. For å sikre sterilitet ble et enkelt etanolutfellingstrinn utført på is i 25 minutter ved kombinasjon av 200 µg av plasmid-DNA i et Eppendorf-glass med 20 µl bærer-DNA fra skåret laksesperm (5' → 3' Inc. Boulder, CO, 10 mg/ml), 22 µl 3M NaOAc (pH 5,2) og 484 µl 100 % etanol (Gold Shield Chemical Co., Hayward, CA). Etter inkubering ble glassene sentrifugert ved 14 000 o/min i en mikrofuge plassert i et 4 °C kaldt rom, supernatanten ble fjernet og pelleten ble vasket to ganger med 0,5 ml av 70 % etanol og fikk lufttørke.

CHO DG44-cellene ble fremstilt mens DNA-pelleten tørket ved å sentrifugere 10^6 totale celler (16,5 ml) i et 25 ml konisk sentrifugeglass ved 900 o/min i 5 minutter. CHO DG44-cellene ble resuspendert til et totalt volum på 300 µl PFCHO-vekstmedium og plassert i en Gene-Pulser-kyvette med et 0,4 cm elektrodemellomrom (Bio-Rad). DNA-et ble etter ca. 50 minutters tørketid resuspendert til 500 µl PFCHO-vekstmedium og tilsatt til cellene i kyvetten, slik at det totale volumet ikke oversteg 800 µl, og forble ved romtemperatur i 5 minutter for å redusere bobledannelse. Kyvetten ble plassert i en BioRad Gene Pulser II-enhet innstilt på 0,296 kV (kilovolt) og 0,950 HC (høy kapasitet) og elektroporert umiddelbart.

Cellene ble inkubert 5 minutter ved romtemperatur før plassering i 20 ml totalt volum av PFCHO-medium i en CoStar T-75-kolbe. Kolben ble plassert ved 37° C og 5 % CO₂ i 48 timer, og cellene ble deretter talt med hemocytometer som anvender trypanblå-eksklusjon, og satt i PFCHO-seleksjonsmedium uten hypotanksin-tymidin-supplement og inneholdende 200 mM metotreksat (Cal Biochem).

Ved gjenvinning av metotreksatseleksjonsprosessen ble det kondisjonerte mediet inneholdende de utskilte TACI-Fc-proteinene undersøkt med Western Blot-analyse.

Eksempel 3

Kombinasjon av atacicept og MMF i mus

Samtidig administrering av atacicept og MMF (CellCept) ble testet i en 28-dagers studie på CD-1-mus. Ett hundre og femti dyr ble fordelt i fire behandlingsgrupper. Gruppe 1 mottok vehikkelkontrollartikler anvendt for både atacicept og MMF ved bruk av samme vei og regime som anvendt for hver testartikkel. Gruppe 2 mottok MMF (351 mg/kg) via daglig oral tvangsfôring. Gruppe 3 mottok atacicept (20 mg/kg) tre ganger ukentlig via subkutan injeksjon. Gruppe 4 mottok atacicept (20 mg/kg, 3x/uke, SC) og MMF (351 mg/kg, daglig, oral), begge typisk administrert innen 30 minutter. Den administrerte dosen av MMF ble valgt som den høyest mulige dosen hos mus og kopierte den humane tilsvarende dosen for et menneske på 70 kg med 29 mg/kg anvendt for levertransplantasjonspasienter (ca. 2 g/dag) ved hjelp av kroppsareal for å skalere den humane dosen til mus.

Dyr ble avlivet ved baseline (dag -1) og dag 14, 28 (siste behandlingsdag), 42, 56 og 112. Musene ble kontrollert daglig for dødelighet, abnormaliteter og tegn på smerte eller uro. Kroppsvekt ble målt og registrert på dag -1 av studien, og ukentlig deretter og før avlivning. Blod ble samlet fra avlivede dyr for omfattende hematologiske og serumkjemiske analyser, strømningscytometriske analyser av lymfocyttyndertyper og totalt IgG-, IgM- og IgA-konsentrasjoner i serum. Totalt IgG, IgM og IgA i serum ble målt ved hjelp av omfattende nekropsier og ble utført på avlivede dyr for evaluering av organvektendringer, omtrentlig patologi og histopatologi.

Totale IgG-nivåer ble evaluert ved hjelp av et ELISA-kvantiteringskit for murint IgG (katalognr. E90-131, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX), kombinert med ELISA Starter Accessory Package (katalognr. E101, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX). All væskehåndtering ble utført ved hjelp av det integrerte Freedom Evo 150 væskehåndteringssystemet og Columbus Washer (TECAN, Danmark). Mikrotiterbrønner ble overtrukket med affinitetsrenset antimurint IgG fra geit og inkubert ved romtemperatur i 1 time. Brønnene ble aspirert, vasket med vaskeløsning og deretter blokkert med blokkeringsløsning i 30 minutter. Blokkeringsløsningen ble fjernet, platene vasket og prøvene/standardene tilsatt i duplikat. Etter 1 time ble prøvene/standardene aspirert og brønnene vasket med vaskeløsning. Det ble tilsatt pepperrotperoksidasekonjugert antimurint IgG fra geit, og brønnene ble inkubert ved romtemperatur i 1 time. Ubundet konjugert antistoff ble fjernet ved vasking, og mengden av konjugat gjenværende i brønnen ble målt ved inkubering med TMB-substrat (Bethyl Laboratories,

Montgomery, TX) i 10 minutter. Fargereaksjonen ble stoppet med tilsetning av 2 M H_2SO_4 , og den resulterende absorbansen (OD-450) ble målt på en Spectramax 190-mikroplateleser.

- 5 Databeregninger for totalt IgG ble utført på følgende måte: Den gjennomsnittlige nullstandard (tom plate) OD-450-verdien ble trukket fra hver prøve og standard, og duplikatavlesningene ble beregnet. Det ble opprettet en standardkurve ved å
- 10 plote gjennomsnittlig OD for hver standard vs. konsentrasjon ved hjelp av en fire parameters logistisk kurvetilpasning. Prøvekonsentrasjoner ble oppnådd ved interpolering fra standardkurven. Den gjennomsnittlige prøvekonsentrasjonen ble multiplisert med fortynningsfaktoren. Data analysert ved hjelp av SoftMax®Pro-programvare, inkludert OD-verdier, standardkurvene, standardavvik og %-CV mellom replikater, og den interpolerte verdien av de
- 15 ukjente.
- Totale IgM-nivåer ble evaluert ved hjelp av et ELISA kvantiteringskit for et murint IgM (katalognr. E90-101, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX), kombinert med ELISA Starter Accessory Package (katalognr. E101, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX). All væskehåndtering ble utført ved hjelp av det
- 20 integrerte Freedom Evo 150 væskehåndteringssystemet og Columbus Washer (TECAN, Danmark). Mikrotiterbrønner ble overtrukket med affinitetsrenset antimurint IgM fra geit og inkubert ved romtemperatur i 1 time. Brønnene ble aspirert, vasket med vaskeløsning og deretter blokkert med blokkeringsløsning i 30 minutter. Blokkeringsløsningen ble fjernet, platene vasket og
- 25 prøvene/standardene tilsatt i duplikat. Etter 1 time ble prøvene/standardene aspirert og brønnene vasket med vaskeløsning. Det ble tilsatt pepperrotperoksidasekonjugert antimurint IgM fra geit, og brønnene ble inkubert ved romtemperatur i 1 time. Ubundet konjugert antistoff ble fjernet ved vasking, og mengden av konjugat gjenværende i brønnen ble målt ved inkubering med
- 30 TMB-substrat (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) i 10 minutter. Fargereaksjonen ble stoppet med tilsetning av 2 M H_2SO_4 , og den resulterende absorbansen (OD-450) ble målt på en Spectramax 190-mikroplateleser. Databeregninger for totalt IgM ble utført på følgende måte:
- 35 Den gjennomsnittlige nullstandard (tom plate) OD-450-verdien ble trukket fra hver prøve og standard, og duplikatavlesningene ble beregnet. Det ble opprettet en standardkurve ved å plote gjennomsnittlig OD for hver standard vs.

konsentrasjon ved hjelp av en fire parameters logistisk kurvetilpasning. Prøvekonsentrasjoner ble oppnådd ved interpolering fra standardkurven. Den gjennomsnittlige prøvekonsentrasjonen ble multiplisert med fortynningsfaktoren. Data analysert med SoftMax®Pro-programvare, inkludert OD-verdier, standardkurvene, standardavvik og %-CV mellom replikater, og den interpolerte verdien av de ukjente.

Totale IgA-nivåer ble evaluert ved hjelp av et ELISA kvantifiseringskit for et murint IgA (katalognr. E90-103, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX), kombinert med ELISA Starter Accessory Package (katalognr. E101, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX). All væskehåndtering ble utført ved hjelp av det integrerte Freedom Evo 150 væskehåndteringssystemet og Columbus Washer (TECAN, Danmark). Mikrotiterbrønner ble overtrukket med affinitetsrenset antimurint IgA fra geit og inkubert ved romtemperatur i 1 time. Brønnene ble aspirert, vasket med vaskeløsning og deretter blokkert med blokkeringsløsning i 30 minutter. Blokkeringsløsningen ble fjernet, platene vasket og prøvene/standardene tilsatt i duplikat. Etter 1 time ble prøvene/standardene aspirert og brønnene vasket med vaskeløsning. Det ble tilsatt pepperrotperoksidasekonjugert antimurint IgM fra geit, og brønnene ble inkubert ved romtemperatur i 1 time. Ubundet konjugert antistoff ble fjernet ved vasking, og mengden av konjugat gjenværende i brønnen ble målt ved inkubering med TMB-substrat (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) i 10 minutter. Fargereaksjonen ble stoppet med tilsetning av 2 M H₂SO₄, og den resulterende absorbansen (OD-450) ble målt på en Spectramax 190-mikroplateleser.

Databeregninger for totalt IgA ble utført på følgende måte:

Den gjennomsnittlige nullstandard (tom plate) OD-450-verdien ble trukket fra hver prøve og standard, og duplikatavlesningene ble beregnet. Det ble opprettet en standardkurve ved å plote gjennomsnittlig OD for hver standard vs. konsentrasjon ved hjelp av en fire parameters logistisk kurvetilpasning. Prøvekonsentrasjoner ble oppnådd ved interpolering fra standardkurven. Den gjennomsnittlige prøvekonsentrasjonen ble multiplisert med fortynningsfaktoren. Data analysert med SoftMax®Pro-programvare, inkludert OD-verdier, standardkurvene, standardavvik og %-CV mellom replikater, og den interpolerte verdien av de ukjente.

Gjennomsnittresultatene av endringen i immunglobulinmålinger er registrert i tabell 5 nedenfor og grafisk på figurene 1, 2 og 3.

Tabell 5

Numerisk gjennomsnitt IgG, IgM og IgA for dag 28 og differanse fra vehikkel (ug/ml)

	Vehikkel (V)	MMF	Atacicept (A)	Atacicept + MMF (A + M)
IgG	179	185	75	31
IgM	238	317	76	19
IgA	498	506	105	33

	$\Delta 1$ (V - MMF)	$\Delta 2$ (V - A)	$\Delta 1 + \Delta 2$	$\Delta 3$ (V - (A + M))	$\Delta 3$ Sammenlignet med $\Delta 1 + \Delta 2$
IgG	-6	104	98	148	148 > 98
IgM	-79	162	83	219	219 > 83
IgA	-8	393	385	464	464 > 385

5

Fra disse beregningene kan det ses at kombinasjonen har en synergistisk effekt på reduksjonen av immunglobin for alle tre typer (dvs. den gjennomsnittlige endringen fra vehikkel med kombinasjonen ($\Delta 3$) er mer enn tilsetningen av den gjennomsnittlige endringen fra vehikkel til MMF alene ($\Delta 1$) med den gjennomsnittlige endringen fra vehikkel til atacicept alene ($\Delta 2$) (eller matematisk $\Delta 3 > \Delta 1 + \Delta 2$)).

10

Konklusjon

15

Forsøkene heri demonstrerte overraskende resultater ved at kombinasjonen av immunsuppressive legemidler og BlyS- og/eller APRIL-antagonister, slik som MMF og atacicept, resulterte i en synergistisk deplesjon av Ig-nivåer

sammenlignet med reduksjonsnivåene med immunsuppressive legemidler og BLyS- og/eller APRIL-antagonister alene.

5 **Eksempel 4**

Gjentagelse og forlengelse av atacicept- og MMF-kombinasjonsforsøk

10 Ved hjelp av prosedyrer lignende dem beskrevet i eksempel 3 og dosering til dag 91 ble resultatene fra eksempel 3 replikert og forlenget i tid til dag 35, 91, 126 og 182. Resultatene av dette forsøket bekreftet den synergistiske effekten av atacicept og MMF på gjennomsnittsnivåene av immunglobulin for minst én av de tre immunglobulintypene på hvert tidspunkt. De synergistiske resultatene er sammenfattet i tabell 6 nedenfor.

Tabell 6

Synergistiske resultater av det numeriske gjennomsnittet for IgG-, IgM- og IgA-resultater for utvidet forsøk og differanse fra vehikkel (ug/ml)

Prøve-dag	Immunoglobulin-type	Vehikkel (V)	MMF	Atacicept (A)	Atacicept + MMF (A + M)
35	IgG	519.7	940.13	261.35	148.59
35	IgM	105.7	141.34	5.54	5.11
91	IgG	697.01	1192.87	191.84	128.22
91	IgA	924.36	1764.55	37.53	0
126	IgA	1113.48	1467.05	817.22	778.05
182	IgM	73.95	53.77	73.75	47.63

Prøve-dag	Immunoglobulin-type	$\Delta 1$ (V - MMF)	$\Delta 2$ (V - A)	$\Delta 1 + \Delta 2$	$\Delta 3$ (V - (A + M))	$\Delta 3$ Sammenlignet med $\Delta 1 + \Delta 2$
35	IgG	-420.43	258.35	-162.08	371.11	371.11 > -162.08
35	IgM	-35.64	100.16	64.52	100.59	100.59 > 64.52
91	IgG	-495.86	505.17	9.31	568.79	568.79 > 9.31
91	IgA	-840.19	886.83	46.64	924.36	924.36 > 46.64
126	IgA	-353.57	296.26	57.31	335.43	335.43 > 57.31
182	IgM	20.18	.20	20.38	26.32	26.32 > 20.38

Det skal bemerkes at siden valgte immunoglobulinundertyper nådde maksimal suppresjon, maskeres evnen til å observere den synergistiske effekten på grunn av de lave absolutte tallene. Denne "maskeringseffekten" forklarer hvorfor synergien var mindre konsekvent sett gjennom alle de tre immunoglobulinundertypene på senere tidspunkter. Samlet bekrefter disse resultatene de synergistiske effektene av kombinasjonen av atacicept og MMF på det numeriske gjennomsnittet av nivåene av de angitte immunoglobulintypene observert i eksempel 3, og forlenger denne konklusjonen over et tidsforløp på 35, 91, 126 og 182 dager.

For helhetens skyld beskriver følgende gruppene, dosene, de administrerte volumene og de anvendte konsentrasjonene i dette gjentakelses- og forlengelsesforsøket:

Tabell 7

Gruppe		Antall dyr	Dose (mg/kg/dag)	Dosevei	Doseplan
1	Vehikkel 1	20 M + 20	0	s.c. oral	3/uke daglig
+	Vehikkel 2		0		
2	Atacicept	20 M + 20 F	20	s.c.	3/uke
3	MMF	20 M + 20 F	350	oral	daglig
4	Atacicept	20 M + 20 F	20	s.c. oral	3/uke daglig
+	MMF		350		

5 Administreringsregime

ATACICEPT: annenhver dag, i 3 dager/uke, subkutant.

MMF: daglig, oralt.

10 Gruppe 1 mottok både vehikkelen for ATACICEPT og vehikkelen for CellCept ved samme behandlingsfrekvens som de behandlede gruppene. Gruppe 2 ble behandlet med bare ATACICEPT

15 Gruppe 3 mottok bare CellCept. Gruppe 4 mottok CellCept ved oral tvangsfôring etterfulgt av ATACICEPT-injeksjon s.c. innen en periode på ca. 30 minutter. Dagen for første behandling ble ansett som dag 1 av studien. Gjennom hele studieperioden ble det utført kliniske observasjoner, hematologiske og blodkjemiske tester, toksikokinetikk og ytterligere undersøkelser.

20 Totalt IgG-, IgM- og IgA-bestemmelser/satellittgruppe 9, 10, 11 og 12

Ytterligere satellittgrupper med dyr ble anvendt for totalt immunglobulinbestemmelser og antistoffbestemmelser. De ble behandlet og veiet ifølge samme prosedyrer som hovedstudien.

25

Tabell 8

Gruppe/kjønn	ATACICEPT-doser	MMF-doser
(Antall dyr)	(mg/kg/dag) subkutan	(mg/kg/dag) oralt
9 M (15)	0	0
9 F (15)		
10 M (12)	20	n.a.
10 F (12)		
11 M (12)	n.a.	350
11 F (12)		
12 M (12)	20	350
12 F (12)		

Dyr ble plassert i 3 mus/kjønn/bur.

5 Det ble tatt blodprøver fra 3 dyr/kjønn/gruppe (i progressiv numerisk rekkefølge) for bestemmelse av IgG-, IgM- og IgA-nivåer i serum på følgende tidspunkter:

fra dyr i kontrollgruppen (gr. 9): Forhåndsdose

fra dyr i gruppe 9, 10, 11 og 12:

- 10
- på dag 34 i den 5-ukers behandlingsperioden
 - på dag 90 i den 13-ukers behandlingsperioden
 - på dag 34 i den 5-ukers rekonvalesensperioden
 - på dag 90 i den 13-uker rekonvalesensperioden

15 Det ble tatt blodprøver (minst 0,8–1 ml) etter avlivning fra den abdominale aorta hos mus etter at de var blitt fullstendig bedøvet med dietyleter.

20 Prøvene ble samlet i glass uten antikoagulerende middel og fikk koagulere i ca. 1 time ved romtemperatur. Koagulatet ble rotet ved sentrifugering ved 3000 o/min ved +4 °C i 15 minutter. Blodcellene ble kassert, og serumet ble plassert i 100 µl alikvoter (fire alikvoter for hver enkelt analyse) og lagret ved -80° C frem til analyse. Totale IgG-, IgM- og IgA-nivåer ble bestemt ved validerte ELISA-fremgangsmåter.

5 Avliving ble utført etter endt 5-ukers behandlingsperiode på 4 dyr/kjønn/gruppe (de første i numerisk rekkefølge), etter endt 13-ukers behandlingsperiode på 8 dyr/kjønn/gruppe (de andre i numerisk rekkefølge), etter endt 5-ukers gjenvinningsperiode på 4 dyr/kjønn/gruppe (de første gjenvunne dyrene i numerisk rekkefølge) og etter endt 13-ukers gjenvinningsperiode på 4 dyr/kjønn/gruppe (de gjenværende dyrene).

Konklusjon

10 Forlengelsesforsøket rapportert heri støtter resultatene i eksempel 3 hvor det overraskende ble vist at kombinasjonen av immunsuppressive legemidler og BlyS- og/eller APRIL-antagonister, slik som MMF og atacicept, resulterte i en synergistisk nedbryting av Ig-nivåer sammenlignet med reduksjonsnivået av immunsuppressive legemidler og BlyS- og/eller APRIL-antagonister alene.

15

Patentkrav

- 5 **1.** BLYS-antagonist og mykofenolatmofetil (MMF) til anvendelse i behandling av en B-celleregulert autoimmun lidelse hos et pattedyr ved reduksjon av immunglobulinnivåer,
- hvor i BLYS-antagonisten er et TACI-Fc-fusjonsprotein omfattende det ekstracellulære domenet TACI eller et funksjonelt fragment derav, og hvor i BLYS-antagonisten og MMF-en er for administrering i en mengde som virker synergistisk for å redusere immunglobulinnivåer,
- 10 hvor i immunglobulinnivået som er redusert, foretrukket er valgt fra gruppen bestående av IgM, IgG og IgA.
- 2.** BLYS-antagonist og mykofenolatmofetil (MMF) til anvendelse ifølge krav 1, hvor i BLYS-antagonisten administreres ved en dose på 1 til 2,5 mg/kg og MMF-en administreres ved en dose på 1 til 4 mg/kg, hvor i BLYS-antagonisten og MMF-en virker synergistisk for å redusere immunglobulinnivåer,
- 15 hvor i immunglobulinnivået som er redusert, foretrukket er valgt fra gruppen bestående av IgM, IgG og IgA.
- 3.** BLYS-antagonist og mykofenolatmofetil (MMF) til anvendelse ifølge krav 1, hvor i den autoimmune sykdommen er valgt fra gruppen bestående av juvenil revmatoid artritt, Wegeners sykdom, inflammatorisk tarmsykdom, idiopatisk trombocytopenisk purpura (ITP), trombotisk trombocytopenisk purpura (TTP), autoimmun trombocytopeni, psoriasis, IgA-nefropati, IgM-polyneuropatier,
- 20 myasthenia gravis, vaskulitt, diabetes mellitus, Reynaulds syndrom, glomerulonefritt, autoimmun hepatitt og autoimmun tyroiditt.
- 4.** BLYS-antagonist og mykofenolatmofetilet (MMF) til anvendelse ifølge krav 1 eller 2, hvor i den autoimmune sykdommen er lupusnefritt.
- 30 **5.** BLYS-antagonist og mykofenolatmofetilen (MMF) til anvendelse ifølge krav 1 eller 2, hvor i den autoimmune sykdommen er systemisk lupus erythematosus.
- 6.** BLYS-antagonist og mykofenolatmofetilen (MMF) til anvendelse ifølge krav 1 eller 2, hvor i den autoimmune sykdommen er revmatoid artritt.
- 35

7. BlyS-antagonist og mykofenolatmofetilen (MMF) til anvendelse ifølge krav 1 eller 2, hvori den autoimmune sykdommen er Sjögrens syndrom.

8. BlyS-antagonist og mykofenolatmofetil (MMF) til anvendelse ifølge krav 1 eller 2, hvori BlyS-antagonisten og MMF-en er for administrering i kombinasjon med behandling ved hjelp av et andre immunsuppressivt legemiddel valgt fra gruppen bestående av ikke-steroide antiinflammatoriske midler (NSAID-er), glukokortikoid, prednison og sykdomsmodifiserende antirevmatiske legemidler (DMARD-er).

9. BlyS-antagonist og mykofenolatmofetil (MMF) til anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1–7, hvori TACI-Fc-fusjonsproteinet omfatter aminosyrene 30 til 110 i SEQ ID NO:2.

10. BlyS-antagonist og mykofenolatmofetil (MMF) til anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1–7, hvori TACI-Fc-fusjonsproteinet omfatter polypeptidsekvensen valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 og SEQ ID NO: 25, hvori den modifiserte vevsplasminogenaktiveringssignalsekvensen (SEQ ID NO:41) er fjernet fra polypeptidsekvensen.

11. BlyS-antagonist og mykofenolatmofetil (MMF) til anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1-7, hvori TACI-Fc-fusjonsproteinet omfatter polypeptidsekvensen angitt i SEQ ID NO: 23, hvori den modifiserte vevsplasminogenaktiveringssignalsekvensen er fjernet fra polypeptidsekvensen.

12. BlyS-antagonist og mykofenolatmofetil (MMF) til anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1-7, hvori TACI-Fc-fusjonsproteinet omfatter en utskilt form av en polypeptidsekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 og SEQ ID NO: 25.

13. BlyS-antagonist og mykofenolatmofetil (MMF) til anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 1-7, hvori TACI-Fc-fusjonsproteinet omfatter en utskilt form av polypeptidet angitt i SEQ ID NO: 23.

14. Sammensetning omfattende en BlyS-antagonist og en mykofenolatmofetil (MMF), hvori BlyS-antagonisten omfatter et TACI-Fc-fusjonsprotein omfattende

det ekstracellulære domenet TACI eller et funksjonelt fragment derav, og hvori BlyS-antagonisten og MMF-et er til stede i en mengde som virker synergistisk for å redusere immunglobulinnivåer,

5 hvori immunglobulinnivået som er redusert, foretrukket er valgt fra gruppen bestående av IgM, IgG og IgA.

15. Kit omfattende en sammensetning ifølge krav 14 og en etikett, hvori etiketten angir at sammensetningen er for behandling av en B-celleregulert autoimmun lidelse.

10

16. Sammensetningen eller kitet ifølge krav 14 eller 15, hvori TACI-Fc-fusjonsproteinet omfatter aminosyrene 30 til 110 i SEQ ID NO:2.

15

17. Sammensetningen eller kitet ifølge krav 16, hvori TACI-Fc-fusjonsproteinet omfatter polypeptidsekvensen valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 og SEQ ID NO: 25, hvori den modifiserte aktiveringssignalsekvensen for vevsplasminogen (SEQ ID NO:41) er fjernet fra polypeptidsekvensen.

20

18. Sammensetningen eller kitet ifølge krav 17, hvori Fc-fusjonsproteinet omfatter polypeptidsekvensen angitt i SEQ ID NO: 23, hvori den modifiserte vevsplasminogenaktiveringssignalsekvensen er fjernet fra polypeptidsekvensen.

25

19. Sammensetningen eller kitet ifølge krav 16, hvori Fc-fusjonsproteinet omfatter en utskilt form av en polypeptidsekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 og SEQ ID NO: 25.

30

20. Sammensetningen eller kitet ifølge krav 19, hvori Fc-fusjonsproteinet omfatter en utskilt form av polypeptidet angitt i SEQ ID NO:23.

SEKVENSLISTE

<110> Rafael A. Ponce, Jr. Wayne J. wallis Matthew S. Holdren Linda zuckerman
Alisa M. Littau Kirk P. Van Ness Claudia Pena Rossi Hans Otto Lennart Graffner

<120> COMBINATION OF BLyS AND/OR APRIL INHIBITION AND
IMMUNNOSUPPRESSANTS FOR TREATMENT OF AUTOIMMUNE DISEASE

<130> 07-04PC

<150> 60/908,365

<151> 2007-03-27

<160> 41

<170> FastSEQ for windows version 4.0

<210> 1

<211> 1377

<212> DNA

<213> homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (14)...(892)

<400> 1

```

agcatcctga gta atg agt ggc ctg ggc cgg agc agg cga ggt ggc cgg
49
      Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg
      1      5      10
agc cgt gtg gac cag gag gag cgc ttt cca cag ggc ctg tgg acg ggg
97
Ser Arg Val Asp Gln Glu Glu Arg Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly
      15      20      25
gtg gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag tac tgg gat cct ctg ctg
145
Val Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu
      30      35      40
ggg acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc aac cat cag agc cag cgc
193
Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg
      45      50      55      60
acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc tgc cgc aag gag caa ggc
241
Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly
      65      70      75

```

aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc atc agc tgt gcc tcc atc
289
Lys Phe Tyr Asp₈₀ His Leu Leu Arg Asp₈₅ Cys Ile Ser Cys Ala₉₀ Ser Ile
tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac ttc tgt gag aac aag ctc
337
Cys Gly Gln₉₅ His Pro Lys Gln Cys₁₀₀ Ala Tyr Phe Cys Glu₁₀₅ Asn Lys Leu
agg agc cca gtg aac ctt cca cca gag ctc agg aga cag cgg agt gga
385
Arg Ser₁₁₀ Pro Val Asn Leu Pro₁₁₅ Pro Glu Leu Arg Arg₁₂₀ Gln Arg Ser Gly
gaa gtt gaa aac aat tca gac aac tcg gga agg tac caa gga ttg gag
433
Glu Val Glu Asn Asn Ser₁₃₀ Asp Asn Ser Gly Arg₁₃₅ Tyr Gln Gly Leu Glu₁₄₀
cac aga ggc tca gaa gca agt cca gct ctc ccg ggg ctg aag ctg agt
481
His Arg Gly Ser Glu₁₄₅ Ala Ser Pro Ala Leu₁₅₀ Pro Gly Leu Lys Leu₁₅₅ Ser
gca gat cag gtg gcc ctg gtc tac agc acg ctg ggg ctc tgc ctg tgt
529
Ala Asp Gln Val₁₆₀ Ala Leu Val Tyr Ser₁₆₅ Thr Leu Gly Leu Cys₁₇₀ Leu Cys
gcc gtc ctc tgc tgc ttc ctg gtg gcg gtg gcc tgc ttc ctc aag aag
577
Ala Val Leu₁₇₅ Cys Cys Phe Leu Val₁₈₀ Ala Val Ala Cys Phe₁₈₅ Leu Lys Lys
agg ggg gat ccc tgc tcc tgc cag ccc cgc tca agg ccc cgt caa agt
625
Arg Gly₁₉₀ Asp Pro Cys Ser Cys₁₉₅ Gln Pro Arg Ser Arg₂₀₀ Pro Arg Gln Ser
ccg gcc aag tct tcc cag gat cac gcg atg gaa gcc ggc agc cct gtg
673
Pro Ala Lys Ser Ser Gln₂₁₀ Asp His Ala Met Glu₂₁₅ Ala Gly Ser Pro Val₂₂₀
agc aca tcc ccc gag cca gtg gag acc tgc agc ttc tgc ttc cct gag
721
Ser Thr Ser Pro Glu₂₂₅ Pro Val Glu Thr Cys₂₃₀ Ser Phe Cys Phe Pro₂₃₅ Glu
tgc agg gcg ccc acg cag gag agc gca gtc acg cct ggg acc ccc gac
769
Cys Arg Ala Pro₂₄₀ Thr Gln Glu Ser Ala₂₄₅ Val Thr Pro Gly Thr₂₅₀ Pro Asp
ccc act tgt gct gga agg tgg ggg tgc cac acc agg acc aca gtc ctg
817
Pro Thr Cys₂₅₅ Ala Gly Arg Trp Gly₂₆₀ Cys His Thr Arg Thr₂₆₅ Thr Val Leu

cag cct tgc cca cac atc cca gac agt ggc ctt ggc att gtg tgt gtg
 865
 Gln Pro Cys Pro His Ile Pro Asp Ser Gly Leu Gly Ile Val Cys Val
 270 275 280

cct gcc cag gag ggg ggc cca ggt gca taaatggggg tcagggaggg
 912
 Pro Ala Gln Glu Gly Gly Pro Gly Ala
 285 290

aaaggaggag ggagagagat ggagaggagg ggagagagaa agagagggtg ggagagggga
 972
 gagagatatg aggagagaga gacagaggag gcagaaaggg agagaaacag aggagacaga
 1032
 gagggagaga gagacagagg gagagagaga cagaggggaa gagaggcaga gagggaaaga
 1092
 ggcagagaag gaaagagaca ggcagagaag gagagaggca gagagggaga gaggcagaga
 1152
 gggagagagg cagagagaca gagagggaga gagggacaga gagagataga gcaggagggtc
 1212
 ggggcactct gagtcccagt tcccagtgcg gctgtagggtc gtcacacacgt aaccacacgt
 1272
 gcaataaagt cctcgtgcct gctgctcaca gcccccgaga gcccctcctc ctggagaata
 1332
 aaacctttgg cagctgccct tcctcaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa
 1377

<210> 2

<211> 293

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

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

gtc ctg gcg ctg gtc ctg gtg ggt ctg gtg agc tgg agg cgg cga cag
341
val Leu Ala Leu val Leu val Gly Leu val Ser Trp Arg Arg Arg Gln
90 95 100 105

6

cgg cgg ctt cgc ggc gcg tcc tcc gca gag gcc ccc gac gga gac aag
 389 Arg Arg Leu Arg Gly Ala Ser Ser Ala Glu Ala Pro Asp Gly Asp Lys
 110 115 120
 gac gcc cca gag ccc ctg gac aag gtc atc att ctg tct ccg gga atc
 437 Asp Ala Pro Glu Pro Leu Asp Lys Val Ile Ile Leu Ser Pro Gly Ile
 125 130 135
 tct gat gcc aca gct cct gcc tgg cct cct cct ggg gaa gac cca gga
 485 Ser Asp Ala Thr Ala Pro Ala Trp Pro Pro Pro Gly Glu Asp Pro Gly
 140 145 150
 acc acc cca cct ggc cac agt gtc cct gtg cca gcc aca gag ctg ggc
 533 Thr Thr Pro Pro Gly His Ser Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu Gly
 155 160 165
 tcc act gaa ctg gtg acc acc aag acg gcc ggc cct gag caa caa
 578 Ser Thr Glu Leu Val Thr Thr Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln
 170 175 180
 tagcaggg
 586

<210> 4

<211> 184

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 4

Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro
 1 5 10 15
 Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys
 20 25 30
 Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala
 35 40 45
 Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly
 50 55 60
 Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Leu Pro Leu Pro Gly Leu Leu Phe Gly
 65 70 75 80
 Ala Pro Ala Leu Leu Gly Leu Ala Leu Val Leu Ala Leu Val Leu Val
 85 90 95
 Gly Leu Val Ser Trp Arg Arg Arg Gln Arg Arg Leu Arg Gly Ala Ser
 100 105 110
 Ser Ala Glu Ala Pro Asp Gly Asp Lys Asp Ala Pro Glu Pro Leu Asp
 115 120 125
 Lys Val Ile Ile Leu Ser Pro Gly Ile Ser Asp Ala Thr Ala Pro Ala
 130 135 140
 Trp Pro Pro Pro Gly Glu Asp Pro Gly Thr Thr Pro Pro Gly His Ser
 145 150 155 160
 Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu Gly Ser Thr Glu Leu Val Thr Thr
 165 170 175
 Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln
 180

<210> 5

<211> 995

<212> DNA

<213> homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (219)...(770)

<400> 5

aagactcaaa cttagaaact tgaattagat gtggtattca aatccttacg tgccgcgaag
 60
 acacagacag cccccgtaag aaccacgaa gcaggcgaag ttcatgttc tcaacattct
 120
 agctgctctt gctgcatttg ctctggaatt cttgtagaga tattacttgt ccttccaggc
 180
 tggtctttct gtagctccct tggtttcttt ttgtgatc atg ttg cag atg gct ggg
 236

Met Leu Gln Met Ala Gly
 1 5

cag tgc tcc caa aat gaa tat ttt gac agt ttg ttg cat gct tgc ata
 284
 Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser Leu Leu His Ala Cys Ile
 10 15 20

cct tgt caa ctt cga tgt tct tct aat act cct cct cta aca tgt cag
 332
 Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr Pro Pro Leu Thr Cys Gln
 25 30 35

cgt tat tgt aat gca agt gtg acc aat tca gtg aaa gga acg aat gcg
 380
 Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser Val Lys Gly Thr Asn Ala
 40 45 50

att ctc tgg acc tgt ttg gga ctg agc tta ata att tct ttg gca gtt
 428
 Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu Ile Ile Ser Leu Ala Val
 55 60 65 70

ttc gtg cta atg ttt ttg cta agg aag ata agc tct gaa cca tta aag
 476
 Phe Val Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile Ser Ser Glu Pro Leu Lys
 75 80 85

gac gag ttt aaa aac aca gga tca ggt ctc ctg ggc atg gct aac att
 524
 Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly Leu Leu Gly Met Ala Asn Ile
 90 95 100

gac ctg gaa aag agc agg act ggt gat gaa att att ctt ccg aga ggc
 572
 Asp Leu Glu Lys Ser Arg Thr Gly Asp Glu Ile Ile Leu Pro Arg Gly
 105 110 115

8

```

ctc gag tac acg gtg gaa gaa tgc acc tgt gaa gac tgc atc aag agc
620
Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys Glu Asp Cys Ile Lys Ser
120 125 130

aaa ccg aag gtc gac tct gac cat tgc ttt cca ctc cca gct atg gag
668
Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe Pro Leu Pro Ala Met Glu
135 140 145 150

gaa ggc gca acc att ctt gtc acc acg aaa acg aat gac tat tgc aag
716
Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys Thr Asn Asp Tyr Cys Lys
155 160 165

agc ctg cca gct gct ttg agt gct acg gag ata gag aaa tca att tct
764
Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr Glu Ile Glu Lys Ser Ile Ser
170 175 180

gct agg taattaacca ttctgactcg agcagtgcca ctttaaaaat cttttgtcag
820
Ala Arg

```

```

aatagatgat gtgtcagatc tcttttaggat gactgtatatt ttcagttgcc gatacagctt
880
tttgtcctct aactgtggaa actctttatg ttagatatat ttctctaggt tactgtttggg
940
agcttaaatgg tagaaacttc cttggtttca tgattaaagt cttttttttt cctga
995

```

<210> 6

<211> 184

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 6

```

Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser
1 5 10 15
Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr
20 25 30
Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser
35 40 45
Val Lys Gly Thr Asn Ala Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu
50 55 60
Ile Ile Ser Leu Ala Val Phe Val Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile
65 70 75 80
Ser Ser Glu Pro Leu Lys Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly Leu
85 90 95
Leu Gly Met Ala Asn Ile Asp Leu Glu Lys Ser Arg Thr Gly Asp Glu
100 105 110
Ile Ile Leu Pro Arg Gly Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys
115 120 125
Glu Asp Cys Ile Lys Ser Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe
130 135 140
Pro Leu Pro Ala Met Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys
145 150 155 160
Thr Asn Asp Tyr Cys Lys Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr Glu

```

```

Ile Glu Lys Ser Ile Ser Ala Arg
165 170 175
180

```

<210> 7

<211> 1149

<212> DNA

<213> homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (173)...(1023)

<400> 7

gaattcggca cgaggcagaa aggagaaaat tcaggataac tctcctgagg ggtgagccaa
 60
 gccctgccat gtagtgcacg caggacatca acaaacacag ataacaggaa atgatccatt
 120
 ccctgtggtc acttattcta aaggcccca ccttcaaagt tcaagtagtg at atg gat
 178

Met Asp
 1

gac tcc aca gaa agg gag cag tca cgc ctt act tct tgc ctt aag aaa
 226
 Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu Lys Lys
 5 10 15

aga gaa gaa atg aaa ctg aag gag tgt gtt tcc atc ctc cca cgg aag
 274
 Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro Arg Lys
 20 25 30

gaa agc ccc tct gtc cga tcc tcc aaa gac gga aag ctg ctg gct gca
 322
 Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu Ala Ala
 35 40 45 50

acc ttg ctg ctg gca ctg ctg tct tgc tgc ctc acg gtg gtg tct ttc
 370
 Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Cys Leu Thr Val Val Ser Phe
 55 60 65

tac cag gtg gcc gcc ctg caa ggg gac ctg gcc agc ctc cgg gca gag
 418
 Tyr Gln Val Ala Ala Leu Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg Ala Glu
 70 75 80

ctg cag ggc cac cac gcg gag aag ctg cca gca gga gca gga gcc ccc
 466
 Leu Gln Gly His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly Ala Pro
 85 90 95

aag gcc ggc ctg gag gaa gct cca gct gtc acc gcg gga ctg aaa atc
 514
 Lys Ala Gly Leu Glu Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu Lys Ile
 100 105 110

10

```

ttt gaa cca cca gct cca gga gaa ggc aac tcc agt cag aac agc aga
562 Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn Ser Arg
115 120 125 130

aat aag cgt gcc gtt cag ggt cca gaa gaa aca gtc act caa gac tgc
610 Asn Lys Arg Ala Val Gln Gly Pro Glu Glu Thr Val Thr Gln Asp Cys
135 140 145

ttg caa ctg att gca gac agt gaa aca cca act ata caa aaa gga tct
658 Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys Gly Ser
150 155 160

tac aca ttt gtt cca tgg ctt ctc agc ttt aaa agg gga agt gcc cta
706 Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser Ala Leu
165 170 175

gaa gaa aaa gag aat aaa ata ttg gtc aaa gaa act ggt tac ttt ttt
754 Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr Phe Phe
180 185 190

ata tat ggt cag gtt tta tat act gat aag acc tac gcc atg gga cat
802 Ile Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met Gly His
195 200 205 210

cta att cag agg aag aag gtc cat gtc ttt ggg gat gaa ttg agt ctg
850 Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser Leu
215 220 225

gtg act ttg ttt cga tgt att caa aat atg cct gaa aca cta ccc aat
898 Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu Pro Asn
230 235 240

aat tcc tgc tat tca gct ggc att gca aaa ctg gaa gaa gga gat gaa
946 Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly Asp Glu
245 250 255

ctc caa ctt gca ata cca aga gaa aat gca caa ata tca ctg gat gga
994 Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu Asp Gly
260 265 270

gat gtc aca ttt ttt ggt gca ttg aaa ct gctgtgacct acttacacca
1043 Asp Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys
275 280

tgtctgtagc tattttcctc cctttctctg tacctctaag aagaaagaat ctaactgaaa
1103
ataacaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa ccctcgagcg gccgcc
1149

```

<210> 8

<211> 283

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 8

11

Met₁ Asp Asp Ser Thr₅ Glu Arg Glu Gln Ser₁₀ Arg Leu Thr Ser Cys₁₅ Leu
 Lys Lys Arg Glu₂₀ Glu Met Lys Leu Lys₂₅ Glu Cys Val Ser Ile₃₀ Leu Pro
 Arg Lys Glu₃₅ Ser Pro Ser Val Arg₄₀ Ser Ser Lys Asp Gly₄₅ Lys Leu Leu
 Ala₅₀ Ala Thr Leu Leu Leu Ala₅₅ Leu Leu Ser Cys Cys₆₀ Leu Thr Val Val
 Ser₆₅ Phe Tyr Gln Val Ala₇₀ Ala Leu Gln Gly Asp₇₅ Leu Ala Ser Leu Arg
 Ala₈₀ Glu Leu Gln Gly₈₅ His His Ala Glu Lys₉₀ Leu Pro Ala Gly Ala₉₅ Gly
 Ala Pro Lys Ala₁₀₀ Gly Leu Glu Glu Ala₁₀₅ Pro Ala Val Thr Ala₁₁₀ Gly Leu
 Lys Ile Phe Glu₁₁₅ Pro Pro Ala₁₂₀ Gly Glu Gly Asn Ser₁₂₅ Ser Gln Asn
 Ser₁₃₀ Arg Asn Lys Arg Ala Val₁₃₅ Gln Gly Pro Glu Glu Thr Val Thr Gln
 Asp₁₄₅ Cys Leu Gln Leu Ile₁₅₀ Ala Asp Ser Glu Thr₁₅₅ Pro Thr Ile Gln Lys
 Gly Ser Tyr Thr₁₆₅ Phe Val Pro Trp Leu Leu₁₇₀ Ser Phe Lys Arg Gly Ser
 Ala Leu Glu Glu₁₈₀ Lys Glu Asn Lys Ile₁₈₅ Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr
 Phe Phe Ile₁₉₅ Tyr Gly Gln Val Leu₂₀₀ Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met
 Gly His₂₁₀ Leu Ile Gln Arg Lys₂₁₅ Lys Val His Val Phe₂₂₀ Gly Asp Glu Leu
 Ser₂₂₅ Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu
 Pro Asn Asn Ser₂₄₅ Cys Tyr Ser Ala Gly Ile₂₅₀ Ala Lys Leu Glu Glu Gly
 Asp Glu Leu Gln₂₆₀ Leu Ala Ile Pro Arg₂₆₅ Glu Asn Ala Gln Ile₂₇₀ Ser Leu
 Asp Gly Asp₂₇₅ Val Thr Phe Phe Gly₂₈₀ Ala Leu Lys

<210> 9

<211> 1680

<212> DNA

<213> mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (164)...(1093)

<400> 9

tactcactat agggctcgag cggccgcccg ggcaggtgct cctgggggaa cccagccctg
 60
 ccattgctctg agggcagtct cccaggacac agatgacagg aaatgaccca cccctgtggt
 120

cacttactcc aaaggcctag accttcaaag tgctcctcgt gga atg gat gag tct
 175
 Met Asp Glu Ser
 1

gca aag acc ctg cca cca ccg tgc ctc tgt ttt tgc tcc gag aaa gga
 223
 Ala Lys Thr Leu Pro Pro Pro Cys Leu Cys Phe Cys Ser Glu Lys Gly
 5 10 15 20

gaa gat atg aaa gtg gga tat gat ccc atc act ccg cag aag gag gag
 271
 Glu Asp Met Lys Val Gly Tyr Asp Pro Ile Thr Pro Gln Lys Glu Glu
 25 30 35

ggt gcc tgg ttt ggg atc tgc agg gat gga agg ctg ctg gct gct acc
 319
 Gly Ala Trp Phe Gly Ile Cys Arg Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ala Thr
 40 45 50

ctc ctg ctg gcc ctg ttg tcc agc agt ttc aca gcg atg tcc ttg tac
 367
 Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Ser Ser Phe Thr Ala Met Ser Leu Tyr
 55 60 65

cag ttg gct gcc ttg caa gca gac ctg atg aac ctg cgc atg gag ctg
 415
 Gln Leu Ala Ala Leu Gln Ala Asp Leu Met Asn Leu Arg Met Glu Leu
 70 75 80

cag agc tac cga ggt tca gca aca cca gcc gcc gcg ggt gct cca gag
 463
 Gln Ser Tyr Arg Gly Ser Ala Thr Pro Ala Ala Ala Gly Ala Pro Glu
 85 90 95 100

ttg acc gct gga gtc aaa ctc ctg aca ccg gca gct cct cga ccc cac
 511
 Leu Thr Ala Gly Val Lys Leu Leu Thr Pro Ala Ala Pro Arg Pro His
 105 110 115

aac tcc agc cgc ggc cac agg aac aga cgc gct ttc cag gga cca gag
 559
 Asn Ser Ser Arg Gly His Arg Asn Arg Arg Ala Phe Gln Gly Pro Glu
 120 125 130

gaa aca gaa caa gat gta gac ctc tca gct cct cct gca cca tgc ctg
 607
 Glu Thr Glu Gln Asp Val Asp Leu Ser Ala Pro Pro Ala Pro Cys Leu
 135 140 145

cct gga tgc cgc cat tct caa cat gat gat aat gga atg aac ctc aga
 655
 Pro Gly Cys Arg His Ser Gln His Asp Asp Asn Gly Met Asn Leu Arg
 150 155 160

aac atc att caa gac tgt ctg cag ctg att gca gac agc gac acg ccg
 703
 Asn Ile Ile Gln Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Asp Thr Pro
 165 170 175 180

13

act ata cga aaa gga act tac aca ttt gtt cca tgg ctt ctc agc ttt
 751
 Thr Ile Arg Lys Gly Thr Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe
 185 190 195

aaa aga gga aat gcc ttg gag gag aaa gag aac aaa ata gtg gtg agg
 799
 Lys Arg Gly Asn Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Val Val Arg
 200 205 210

caa aca ggc tat ttc ttc atc tac agc cag gtt cta tac acg gac ccc
 847
 Gln Thr Gly Tyr Phe Phe Ile Tyr Ser Gln Val Leu Tyr Thr Asp Pro
 215 220 225

atc ttt gct atg ggt cat gtc atc cag agg aag aaa gta cac gtc ttt
 895
 Ile Phe Ala Met Gly His Val Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe
 230 235 240

ggg gac gag ctg agc ctg gtg acc ctg ttc cga tgt att cag aat atg
 943
 Gly Asp Glu Leu Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met
 245 250 255 260

ccc aaa aca ctg ccc aac aat tcc tgc tac tcg gct ggc atc gcg agg
 991
 Pro Lys Thr Leu Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Arg
 265 270 275

ctg gaa gaa gga gat gag att cag ctt gca att cct cgg gag aat gca
 1039
 Leu Glu Glu Gly Asp Glu Ile Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala
 280 285 290

cag att tca cgc aac gga gac gac acc ttc ttt ggt gcc cta aaa ctg
 1087
 Gln Ile Ser Arg Asn Gly Asp Asp Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu
 295 300 305

ctg taa ctcaattgct ggagtgcgtg atccccctcc ctctctctct ctgtacctcc
 1143
 Leu *

gagggagaaa cagacgactg gaaaaactaa aagatgggga aagccgtcag cgaaagtttt
 1203
 ctctgtgaccc gttgaatctg atccaaacca ggaaatataa cagacagcca caaccgaagt
 1263
 gtgccatgtg agttatgaga aacggagccc gcgctcagaa agaccggatg aggaagaccg
 1323
 ttttctccag tcctttgcc aacgcacccg caaccttgct ttttgccctg ggtgacacat
 1383
 gttcagaatg cagggagatt tccttgTTTT gcgatttgcc atgagaagag ggccccacaac
 1443
 tgcagggtcac tgaagcattc acgctaagtc tcaggattta ctctcccttc tcatgctaag
 1503

tacacacacg ctctttttcca ggtaatacta tgggatacta tggaaagggtt gtttgTTTT
 1563
 aaatctagaa gtcttgaact ggcaatagac aaaaatcctt ataaattcaa gtgtaaaata
 1623
 aacttaatta aaaaggtaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa
 1680

<210> 10

<211> 309

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 10

```

Met Asp Glu Ser Ala Lys Thr Leu Pro Pro Pro Cys Leu Cys Phe Cys
 1      5      10      15
Ser Glu Lys Gly Glu Asp Met Lys Val Gly Tyr Asp Pro Ile Thr Pro
 20      25      30
Gln Lys Glu Glu Gly Ala Trp Phe Gly Ile Cys Arg Asp Gly Arg Leu
 35      40      45
Leu Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Ser Ser Phe Thr Ala
 50      55      60
Met Ser Leu Tyr Gln Leu Ala Ala Leu Gln Ala Asp Leu Met Asn Leu
 65      70      75      80
Arg Met Glu Leu Gln Ser Tyr Arg Gly Ser Ala Thr Pro Ala Ala Ala
 85      90      95
Gly Ala Pro Glu Leu Thr Ala Gly Val Lys Leu Leu Thr Pro Ala Ala
100      105      110
Pro Arg Pro His Asn Ser Ser Arg Gly His Arg Asn Arg Arg Ala Phe
115      120      125
Gln Gly Pro Glu Glu Thr Glu Gln Asp Val Asp Leu Ser Ala Pro Pro
130      135      140
Ala Pro Cys Leu Pro Gly Cys Arg His Ser Gln His Asp Asp Asn Gly
145      150      155      160
Met Asn Leu Arg Asn Ile Ile Gln Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp
165      170      175
Ser Asp Thr Pro Thr Ile Arg Lys Gly Thr Tyr Thr Phe Val Pro Trp
180      185      190
Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Asn Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys
195      200      205
Ile Val Val Arg Gln Thr Gly Tyr Phe Phe Ile Tyr Ser Gln Val Leu
210      215      220
Tyr Thr Asp Pro Ile Phe Ala Met Gly His Val Ile Gln Arg Lys Lys
225      230      235      240
Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys
245      250      255
Ile Gln Asn Met Pro Lys Thr Leu Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala
260      265      270
Gly Ile Ala Arg Leu Glu Glu Gly Asp Glu Ile Gln Leu Ala Ile Pro
275      280      285
Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Arg Asn Gly Asp Asp Thr Phe Phe Gly
290      295      300
Ala Leu Lys Leu Leu
305

```

<210> 11

<211> 185

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 11

15

```

Met  Arg  Arg  Gly  Pro  Arg  Ser  Leu  Arg  Gly  Arg  Asp  Ala  Pro  Ala  Pro
 1      5      10      15      20      25      30      35      40      45      50      55      60      65      70      75      80
Thr  Pro  Cys  Val  Pro  Ala  Glu  Cys  Phe  Asp  Leu  Leu  Val  Arg  His  Cys
20      25      30      35      40      45      50      55      60      65      70      75      80      85      90      95      100
Val  Ala  Cys  Gly  Leu  Leu  Arg  Thr  Pro  Arg  Pro  Lys  Pro  Ala  Gly  Ala
35      40      45      50      55      60      65      70      75      80      85      90      95      100      105      110      115
Ala  Ser  Ser  Pro  Ala  Pro  Arg  Thr  Ala  Leu  Gln  Pro  Gln  Glu  Ser  Val
50      55      60      65      70      75      80      85      90      95      100      105      110      115      120      125      130
Gly  Ala  Gly  Ala  Gly  Glu  Ala  Ala  Leu  Pro  Leu  Pro  Gly  Leu  Leu  Phe
65      70      75      80      85      90      95      100      105      110      115      120      125      130      135      140      145
Gly  Ala  Pro  Ala  Leu  Leu  Gly  Leu  Ala  Leu  Val  Leu  Ala  Leu  Val  Leu
85      90      95      100      105      110      115      120      125      130      135      140      145      150      155      160      165
Val  Gly  Leu  Val  Ser  Trp  Arg  Arg  Arg  Gln  Arg  Arg  Leu  Arg  Gly  Ala
100      105      110      115      120      125      130      135      140      145      150      155      160      165      170      175      180
Ser  Ser  Ala  Glu  Ala  Pro  Asp  Gly  Asp  Lys  Asp  Ala  Pro  Glu  Pro  Leu
115      120      125      130      135      140      145      150      155      160      165      170      175      180      185      190      195
Asp  Lys  Val  Ile  Ile  Leu  Ser  Pro  Gly  Ile  Ser  Asp  Ala  Thr  Ala  Pro
130      135      140      145      150      155      160      165      170      175      180      185      190      195      200      205      210
Ala  Trp  Pro  Pro  Pro  Gly  Glu  Asp  Pro  Gly  Thr  Thr  Pro  Pro  Gly  His
145      150      155      160      165      170      175      180      185      190      195      200      205      210      215      220      225
Ser  Val  Pro  Val  Pro  Ala  Thr  Glu  Leu  Gly  Ser  Thr  Glu  Leu  Val  Thr
165      170      175      180      185      190      195      200      205      210      215      220      225      230      235      240      245
Thr  Lys  Thr  Ala  Gly  Pro  Glu  Gln  Gln  Gln  Gln  Gln  Gln  Gln  Gln  Gln  Gln
180      185      190      195      200      205      210      215      220      225      230      235      240      245      250      255      260

```

<210> 12

<211> 247

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 12

```

Met  Ser  Gly  Leu  Gly  Arg  Ser  Arg  Arg  Gly  Gly  Arg  Ser  Arg  Val  Asp
 1      5      10      15      20      25      30      35      40      45      50      55      60      65      70      75      80
Gln  Glu  Glu  Arg  Trp  Ser  Leu  Ser  Cys  Arg  Lys  Glu  Gln  Gly  Lys  Phe
20      25      30      35      40      45      50      55      60      65      70      75      80      85      90      95      100
Tyr  Asp  His  Leu  Leu  Arg  Asp  Cys  Ile  Ser  Cys  Ala  Ser  Ile  Cys  Gly
35      40      45      50      55      60      65      70      75      80      85      90      95      100      105      110      115
Gln  His  Pro  Lys  Gln  Cys  Ala  Tyr  Phe  Cys  Glu  Asn  Lys  Leu  Arg  Ser
50      55      60      65      70      75      80      85      90      95      100      105      110      115      120      125      130
Pro  Val  Asn  Leu  Pro  Pro  Glu  Leu  Arg  Arg  Gln  Arg  Ser  Gly  Glu  Val
65      70      75      80      85      90      95      100      105      110      115      120      125      130      135      140      145
Glu  Asn  Asn  Ser  Asp  Asn  Ser  Gly  Arg  Tyr  Gln  Gly  Leu  Glu  His  Arg
85      90      95      100      105      110      115      120      125      130      135      140      145      150      155      160      165
Gly  Ser  Glu  Ala  Ser  Pro  Ala  Leu  Pro  Gly  Leu  Lys  Leu  Ser  Ala  Asp
100      105      110      115      120      125      130      135      140      145      150      155      160      165      170      175      180
Gln  Val  Ala  Leu  Val  Tyr  Ser  Thr  Leu  Gly  Leu  Cys  Leu  Cys  Ala  Val
115      120      125      130      135      140      145      150      155      160      165      170      175      180      185      190      195
Leu  Cys  Cys  Phe  Leu  Val  Ala  Val  Ala  Cys  Phe  Leu  Lys  Lys  Arg  Gly
130      135      140      145      150      155      160      165      170      175      180      185      190      195      200      205      210
Asp  Pro  Cys  Ser  Cys  Gln  Pro  Arg  Ser  Arg  Pro  Arg  Gln  Ser  Pro  Ala
145      150      155      160      165      170      175      180      185      190      195      200      205      210      215      220      225
Lys  Ser  Ser  Gln  Asp  His  Ala  Met  Glu  Ala  Gly  Ser  Pro  Val  Ser  Thr
165      170      175      180      185      190      195      200      205      210      215      220      225      230      235      240      245
Ser  Pro  Glu  Pro  Val  Glu  Thr  Cys  Ser  Phe  Cys  Phe  Pro  Glu  Cys  Arg
180      185      190      195      200      205      210      215      220      225      230      235      240      245      250      255      260      265
Ala  Pro  Thr  Gln  Glu  Ser  Ala  Val  Thr  Pro  Gly  Thr  Pro  Asp  Pro  Thr

```

```

Cys  Ala  Gly  Arg  Trp  Gly  Cys  His  Thr  Arg  Thr  Thr  Val  Leu  Gln  Pro
195      200      205      210      215      220      225      230      235      240      245      250      255      260      265      270      275
Cys  Pro  His  Ile  Pro  Asp  Ser  Gly  Leu  Gly  Ile  Val  Cys  Val  Pro  Ala
210      215      220      225      230      235      240      245      250      255      260      265      270      275      280      285      290
Gln  Glu  Gly  Gly  Pro  Gly  Ala
225      230      235      240      245      250      255      260      265      270      275      280      285      290      295      300

```

<210> 13

16

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLYS binding polypeptide

<400> 13

Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg Ala Trp Val Pro Cys Ser Val Leu
 1 5 10 15
 Lys

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLYS binding polypeptide

<400> 14

Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Trp Val Pro Cys Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Arg

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLYS binding polypeptide

<400> 15

Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg Arg Trp Val Pro Cys Glu Met Leu
 1 5 10 15
 Gly

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

17

<223> BLYS binding polypeptide

<400> 16

Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg Ser Trp Val Pro Cys His Met Leu
 1 5 10 15
 Arg

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLYS binding polypeptide

<400> 17

Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Trp Val Ala Cys Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Arg

<210> 18

<211> 1214

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TACI-Fc fusion protein

<221> CDS

<222> (17)...(1192)

<400> 18

tattaggccg gccacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg
 52
 Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu
 1 5 10
 ctg ctg tgt ggc gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc
 100
 Leu Leu Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala
 15 20 25
 gag ttg aga cgc ttc cgt aga gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag
 148
 Glu Leu Arg Arg Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln
 30 35 40
 tac tgg gat cct ctg ctg ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc
 196
 Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys
 45 50 55 60
 aac cat cag agc cag cgc acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc
 244

```

Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser
                65                70                75
tgc cgc aag gag caa ggc aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc
292
Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys
                80                85                90
atc agc tgt gcc tcc atc tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac
340
Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr
                95                100                105
ttc tgt gag aac aag ctc agg agc cca gtg aac ctt cca cca gag ctc
388
Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu
                110                115                120
agg aga cag cgg agt gga gaa gtt gaa aac aat tca gac aac tcg gga
436
Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val Glu Asn Asn Ser Asp Asn Ser Gly
125                130                135
agg tac caa gga ttg gag cac aga ggc tca gaa gca agt cca gct ctc
484
Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg Gly Ser Glu Ala Ser Pro Ala Leu
                145                150                155
cca ggt ctc aag gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc cca
532
Pro Gly Leu Lys Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
                160                165                170
ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc
580
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe
                175                180                185
ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc
628
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
                190                195                200
aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc
676
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
205                210                215
aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg
724
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
                225                230                235
cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc
772
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
                240                245                250

```

19

gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc
 820 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 255 260 265
 tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc
 868 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 270 275 280
 aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg
 916 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 285 290 295 300
 gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc
 964 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 305 310 315
 ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg
 1012 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 320 325 330
 gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc
 1060 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 335 340 345
 ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag
 1108 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 350 355 360
 ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac
 1156 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 365 370 375 380
 tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taatctagag
 1202 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 385 390
 gcgcgccaat ta
 1214

<210> 19

<211> 392

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TACI-Fc fusion protein

<400> 19

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15

20

Ala	Val	Phe	Val	Ser	Leu	Ser	Gln	Glu	Ile	His	Ala	Glu	Leu	Arg	Arg
			20					25					30		
Phe	Arg	Arg	Ala	Met	Arg	Ser	Cys	Pro	Glu	Glu	Gln	Tyr	Trp	Asp	Pro
		35					40					45			
Leu	Leu	Gly	Thr	Cys	Met	Ser	Cys	Lys	Thr	Ile	Cys	Asn	His	Gln	Ser
	50					55					60				
Gln	Arg	Thr	Cys	Ala	Ala	Phe	Cys	Arg	Ser	Leu	Ser	Cys	Arg	Lys	Glu
	65				70					75				80	
Gln	Gly	Lys	Phe	Tyr	Asp	His	Leu	Leu	Arg	Asp	Cys	Ile	Ser	Cys	Ala
				85					90					95	
Ser	Ile	Cys	Gly	Gln	His	Pro	Lys	Gln	Cys	Ala	Tyr	Phe	Cys	Glu	Asn
			100					105					110		
Lys	Leu	Arg	Ser	Pro	Val	Asn	Leu	Pro	Glu	Leu	Arg	Arg	Gln	Arg	
		115					120				125				
Ser	Gly	Glu	Val	Glu	Asn	Asn	Ser	Asp	Asn	Ser	Gly	Arg	Tyr	Gln	Gly
	130					135					140				
Leu	Glu	His	Arg	Gly	Ser	Glu	Ala	Ser	Pro	Ala	Leu	Pro	Gly	Leu	Lys
	145				150					155				160	
Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala
				165					170					175	
Pro	Glu	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro
			180					185					190		
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val
		195					200					205			
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
	210					215					220				
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln
	225				230					235				240	
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
				245					250					255	
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala
			260					265					270		
Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro
		275					280					285			
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr
	290					295					300				
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser
	305				310					315				320	
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr
				325					330					335	
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr
			340					345				350			
Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe
		355					360					365			
Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys
	370					375					380				
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								
	385				390										

<210> 20

<211> 1070

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TACI-Fc fusion protein

<221> CDS

<222> (17)...(1048)

<400> 20

tattaggccg gccacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg
 52 Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu
 1 5 10

ctg ctg tgt ggc gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc
 100 Leu Leu Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala
 15 20 25

gag ttg aga cgc ttc cgt aga gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag
 148 Glu Leu Arg Arg Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln
 30 35 40

tac tgg gat cct ctg ctg ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc
 196 Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys
 45 50 55 60

aac cat cag agc cag cgc acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc
 244 Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser
 65 70 75

tgc cgc aag gag caa ggc aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc
 292 Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys
 80 85 90

atc agc tgt gcc tcc atc tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac
 340 Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr
 95 100 105

ttc tgt gag aac gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc cca
 388 Phe Cys Glu Asn Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 110 115 120

ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc
 436 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe
 125 130 135 140

ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc
 484 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 145 150 155

aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc
 532 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 160 165 170

22

```

aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg
580
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
175 180 185

cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc
628
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
190 195 200

gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc
676
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
205 210 215 220

tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc
724
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
225 230 235

aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg
772
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
240 245 250

gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc
820
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
255 260 265

ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg
868
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
270 275 280

gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc
916
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
285 290 295 300

ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag
964
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
305 310 315

ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac
1012
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
320 325 330

tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taatctagag
1058
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
335 340

gcgcgccaat ta
1070

```

<210> 21

<211> 344

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TACI-FC fusion protein

<400> 21

23

```

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1   2   3   4   5   6   7   8   9  10  11  12  13  14  15  16
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34
Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys 35 36 37 38 39 40 41 42
Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser
50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64
Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu
65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79
Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala
80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94
Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn
100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114
Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129
Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Gln
175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338
339 340

```

<210> 22

<211> 1082

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TACI-Fc fusion protein

<221> CDS

<222> (17)...(1060)

<400> 22

tattaggccg gccacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg
 52 Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Val Leu
 1 5 10

ctg ctg tgt ggc gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc
 100 Leu Leu Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala
 15 20 25

gag ttg aga cgc ttc cgt aga gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag
 148 Glu Leu Arg Arg Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln
 30 35 40

tac tgg gat cct ctg ctg ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc
 196 Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys
 45 50 55 60

aac cat cag agc cag cgc acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc
 244 Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser
 65 70 75

tgc cgc aag gag caa ggc aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc
 292 Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys
 80 85 90

atc agc tgt gcc tcc atc tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac
 340 Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr
 95 100 105

ttc tgt gag aac aag ctc agg agc gag ccc aaa tct tca gac aaa act
 388 Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
 110 115 120

cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca
 436 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser
 125 130 135 140

gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg
 484 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 145 150 155

acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct
 532

25

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 160 165 170
 gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc
 580
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 175 180 185
 aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc
 628
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 190 195 200
 agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac
 676
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 205 210 215 220
 aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc
 724
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 225 230 235
 atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg
 772
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 240 245 250
 ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc
 820
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 255 260 265
 ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc
 868
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 270 275 280
 aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac
 916
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 285 290 295 300
 tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc
 964
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 305 310 315
 agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct
 1012
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 320 325 330
 ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa
 1060
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 335 340 345

taatctagag gcgcgccaat ta

1082

<210> 23

<211> 348

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TACI-Fc fusion protein

<400> 23

```

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1      5      10      15
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
20      25      30
Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro
35      40      45
Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser
50      55      60
Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu
65      70      75      80
Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala
85      90      95
Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn
100     105     110
Lys Leu Arg Ser Glu Pro Lys Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
115
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe
130     135
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
145     150     155     160
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
165     170     175
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
180     185     190
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
195     200     205
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
210     215     220
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
225     230     235
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
245     250     255
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
260     265     270
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
275     280     285
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
290     295     300
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
305     310     315     320
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
325     330     335
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
340     345

```

<210> 24

<211> 1109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TACI-FC fusion protein

<221> CDS

<222> (17)...(1090)

<400> 24

tattaggccg gccacc atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg
 52 Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Val Leu
 1 5 10

ctg ctg tgt ggc gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc
 100 Leu Leu Cys Gly Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala
 15 20 25

gag ttg aga cgc ttc cgt aga gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag
 148 Glu Leu Arg Arg Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln
 30 35 40

tac tgg gat cct ctg ctg ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc
 196 Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys
 45 50 55 60

aac cat cag agc cag cgc acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc
 244 Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser
 65 70 75

tgc cgc aag gag caa ggc aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc
 292 Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys
 80 85 90

atc agc tgt gcc tcc atc tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac
 340 Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr
 95 100 105

ttc tgt gag aac aag ctc agg agc cca gtg aac ctt cca cca gag ctc
 388 Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu
 110 115 120

agg gag ccc aaa tct tca gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca
 436 Arg Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 125 130 135 140

gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa
 484 Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

145 150 155
 CCC aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg
 532
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 160 165 170
 gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac
 580
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 175 180 185
 gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag
 628
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 190 195 200
 cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac
 676
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 205 210 215 220
 cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa
 724
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 225 230 235
 gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag
 772
 Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 240 245 250
 CCC cga gaa cca cag gtg tac acc ctg CCC cca tcc cgg gat gag ctg
 820
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 255 260 265
 acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat CCC
 868
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 270 275 280
 agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac
 916
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 285 290 295 300
 tac aag acc acg cct CCC gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc
 964
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 305 310 315
 tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc
 1012
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 320 325 330
 ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag
 1060

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 335 340 345

aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa tctagaggcg cgccaatta
 1109
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys *
 350 355

<210> 25

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TACI-FC fusion protein

<400> 25

```

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1      5      10      15
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
 20      25      30
Phe Arg Arg Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro
 35      40      45
Leu Leu Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser
 50      55      60
Gln Arg Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu
 65      70      75
Gln Gly Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala
 85      90      95
Ser Ile Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn
100      105      110
Lys Leu Arg Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Glu Pro Lys
115      120      125
Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
130      135      140
Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
145      150      155
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
165      170      175
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
180      185      190
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
195      200      205
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
210      215      220
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser
225      230      235
Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
245      250      255
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
260      265      270
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
275      280      285
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
290      295      300
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
305      310      315
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

```

```

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
325      330      335
Leu Ser Pro Gly Lys
340      345      350
355

```

<210> 26

<211> 311

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BAFF-R-FC fusion protein

<400> 26

```

Met Ser Ala Leu Leu Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Ala Val Ala Ser
 1      5      10      15
Thr Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro
20      25      30
Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys
35      40      45
Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala
50      55      60
Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Gln Val
65      70      75      80
Thr Asp Lys Ala Ala His Tyr Thr Leu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
85      90      95
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
100     105     110
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
115     120     125
Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
130     135     140
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
145     150     155     160
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
165     170     175
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
180     185     190
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
195     200     205
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
210     215     220
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
225     230     235     240
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
245     250     255
Thr Thr Pro pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
260     265     270
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
275     280     285
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
290     295     300
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
305     310

```

<210> 27

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer sequence

<400> 27

tattaggccg gccaccatgg atgcaatga
29

<210> 28

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer sequence

<400> 28

tgaagatttg ggctccttga gacctggga
29

<210> 29

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer sequence

<400> 29

tcccaggtct caaggagccc aaatcttca

29

<210> 30

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer sequence

<400> 30

taattggcgc gcctctagat tatttaccgc gagaca
36

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer sequence

<400> 31

tgaagatttg ggctcgttct cacagaagta
30

32

<210> 32

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer sequence

<400> 32

atacttctgt gagaacgagc ccaaattcttc a
31

<210> 33

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer sequence

<400> 33

tttgggctcg ctctgagct tgttctcaca
30

<210> 34

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer sequence

<400> 34

ctcaggagcg agcccaaadc ttcagaca
28

<210> 35

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

33

<223> primer sequence

<400> 35

tttgggctcc ctgagctctg gtggaa
26

<210> 36

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer sequence

<400> 36

gagctcaggg agcccaaatc ttcagaca
28

<210> 37

<211> 1216

<212> DNA

<213> homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (141)...(890)

<400> 37

```

gaattcggct cgagcctttt tatttctcct tgcgtaacaa ctttcttccc ttctgcacca
60
ctgcccgtac ccttaccgcg cccgccacct ccttgctacc ccactcttga aaccacagct
120
gttggcaggg tccccagctc atg cca gcc tca tct cct ttc ttg cta gcc ccc
173
Met Pro Ala Ser Ser Pro Phe Leu Leu Ala
Pro
1 5 10
aaa ggg cct cca ggc aac atg ggg ggc cca gtc aga gag ccg gca ctc
221
Lys Gly Pro Pro Gly Asn Met Gly Gly Pro Val Arg Glu Pro Ala Leu
15 20 25
tca gtt gcc ctc tgg ttg agt tgg ggg gca gct ctg ggg gcc gtg gct
269
Ser Val Ala Leu Trp Leu Ser Trp Gly Ala Ala Leu Gly Ala Val Ala
30 35 40
tgt gcc atg gct ctg ctg acc caa caa aca gag ctg cag agc ctc agg
317
Cys Ala Met Ala Leu Leu Thr Gln Gln Thr Glu Leu Gln Ser Leu Arg
45 50 55
aga gag gtg agc cgg ctg cag ggg aca gga ggc ccc tcc cag aat ggg
365
Arg Glu Val Ser Arg Leu Gln Gly Thr Gly Gly Pro Ser Gln Asn Gly
60 65 70 75
gaa ggg tat ccc tgg cag agt ctc ccg gag cag agt tcc gat gcc ctg
413
Glu Gly Tyr Pro Trp Gln Ser Leu Pro Glu Gln Ser Ser Asp Ala Leu
80 85 90
gaa gcc tgg gag aat ggg gag aga tcc cgg aaa agg aga gca gtg ctc
461
Glu Ala Trp Glu Asn Gly Glu Arg Ser Arg Lys Arg Arg Ala Val Leu
95 100 105
acc caa aaa cag aag aag cag cac tct gtc ctg cac ctg gtt ccc att
509
Thr Gln Lys Gln Lys Lys Gln His Ser Val Leu His Leu Val Pro Ile
110 115 120
aac gcc acc tcc aag gat gac tcc gat gtg aca gag gtg atg tgg caa
557
Asn Ala Thr Ser Lys Asp Asp Ser Asp Val Thr Glu Val Met Trp Gln

```

35

```

      125              130              135
cca gct ctt agg cgt ggg aga ggc cta cag gcc caa gga tat ggt gtc
605
Pro Ala Leu Arg Arg Gly Arg Gly Leu Gln Ala Gln Gly Tyr Gly Val
140      145      150      155

cga atc cag gat gct gga gtt tat ctg ctg tat agc cag gtc ctg ttt
653
Arg Ile Gln Asp Ala Gly Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Gln Val Leu Phe
      160      165      170

caa gac gtg act ttc acc atg ggt cag gtg gtg tct cga gaa ggc caa
701
Gln Asp Val Thr Phe Thr Met Gly Gln Val Val Ser Arg Glu Gly Gln
      175      180      185

gga agg cag gag act cta ttc cga tgt ata aga agt atg ccc tcc cac
749
Gly Arg Gln Glu Thr Leu Phe Arg Cys Ile Arg Ser Met Pro Ser His
      190      195      200

ccg gac cgg gcc tac aac agc tgc tat agc gca ggt gtc ttc cat tta
797
Pro Asp Arg Ala Tyr Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Val Phe His Leu
      205      210      215

cac caa ggg gat att ctg agt gtc ata att ccc cgg gca agg gcg aaa
845
His Gln Gly Asp Ile Leu Ser Val Ile Ile Pro Arg Ala Arg Ala Lys
220      225      230      235

ctt aac ctc tct cca cat gga acc ttc ctg ggg ttt gtg aaa ctg
890
Leu Asn Leu Ser Pro His Gly Thr Phe Leu Gly Phe Val Lys Leu
      240      245      250

tgattgtgtt ataaaaagtg gctcccagct tggaagacca gggtgggtac atactggaga
950
cagccaagag ctgagtatat aaaggagagg gaatgtgcag gaacagaggc gtcttcctgg
1010
gtttggctcc ccgttcctca cttttccctt ttcattccca ccccctagac tttgatttta
1070
cggatatctt gcttctgttc cccatggagc tccgaattct tgcgtgtgtg tagatgaggg
1130
gcgggggacg ggcgccaggc attgttcaga cctggtcggg gccactgga agcatccaga
1190
acagcaccac catctagcgg ccgccc
1216

```

<210> 38

<211> 250

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 38

```

Met Pro Ala Ser Ser Pro Phe Leu Leu Ala Pro Lys Gly Pro Pro Gly
 1      5      10      15
Asn Met Gly Gly Pro Val Arg Glu Pro Ala Leu Ser Val Ala Leu Trp

```

36

Leu	Ser	Trp	20 Gly	Ala	Ala	Leu	Gly	25 Ala	Val	Ala	Cys	30 Ala	Met	Ala	Leu
Leu	Thr	35 Gln	Gln	Thr	Glu	Leu	40 Gln	Ser	Leu	Arg	Arg	45 Glu	Val	Ser	Arg
Leu	Gln	Gly	Thr	Gly	Gly	Pro	Ser	Gln	Asn	Gly	Glu	Gly	Tyr	Pro	Trp
65 Gln	Ser	Leu	Pro	85 Glu	Gln	Ser	Ser	Asp	Ala	90 Leu	Glu	Ala	Trp	95 Glu	Asn
Gly	Glu	Arg	Ser	100 Arg	Lys	Arg	Arg	Ala	105 Val	Leu	Thr	Gln	Lys	110 Gln	Lys
Lys	Gln	His	Ser	Val	Leu	His	Leu	120 Val	Pro	Ile	Asn	Ala	125 Thr	Ser	Lys
Asp	Asp	Ser	Asp	Val	Thr	Glu	135 Val	Met	Trp	Gln	Pro	Ala	Leu	Arg	Arg
Gly	130 Arg	Gly	Leu	Gln	Ala	Gln	Gly	Tyr	Gly	Val	140 Arg	Ile	Gln	Asp	Ala
145 Gly	Val	Tyr	Leu	165 Leu	Tyr	Ser	Gln	Val	Leu	Phe	Gln	Asp	Val	175 Thr	Phe
Thr	Met	Gly	Gln	180 Val	Val	Ser	Arg	Glu	185 Gly	Gln	Gly	Arg	Gln	190 Glu	Thr
Leu	Phe	Arg	Cys	Ile	Arg	Ser	Met	Pro	Ser	His	Pro	Asp	Arg	Ala	Tyr
Asn	Ser	Cys	Tyr	Ser	Ala	Gly	215 Val	Phe	His	Leu	His	220 Gln	Gly	Asp	Ile
Leu	Ser	Val	Ile	Ile	Pro	Arg	Ala	Arg	Ala	Lys	Leu	Asn	Leu	Ser	Pro
225 His	Gly	Thr	Phe	245 Leu	Gly	Phe	Val	Lys	250 Leu						

<210> 39

<211> 762

<212> DNA

<213> homo sapiens

$\langle 220 \rangle$

<221> CDS

<222> (7)...(759)

<400> 39

ggatcc atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc
48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro
1 5 10

aga tgg gtc ctg tcc gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc
96
Arg Trp Val Leu Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
15 20 25 30

cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc
144
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
35 40 45

ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag
192
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

37

	50		55		60	
gtc 240	aca tgc	gtg gtg	gtg gac	gtg agc	cac gaa	gac cct
val	Thr Cys	val val	val Asp	val Ser	His Glu	Asp Pro
	65		70		75	
ttc 288	aac tgg	tac gtg	gac ggc	gtg gag	gtg cat	aat gcc
Phe	Asn Trp	Tyr Val	Asp Gly	val Glu	val His	Asn Ala
	80		85		90	
ccg 336	cgg gag	gag cag	tac aac	agc acg	tac cgt	gtg gtc
Pro	Arg Glu	Glu Gln	Tyr Asn	Ser Thr	Tyr Arg	val val
	95		100		105	
acc 384	gtc ctg	cac cag	gac tgg	ctg aat	ggc aag	gag tac
Thr	val Leu	His Gln	Asp Trp	Leu Asn	Gly Lys	Glu Tyr
		115			120	
gtc 432	tcc aac	aaa gcc	ctc cca	gcc ccc	atc gag	aaa acc
val	Ser Asn	Lys Ala	Leu Pro	Ala Pro	Ile Glu	Lys Thr
		130		135		140
gcc 480	aaa ggg	cag ccc	cga gaa	cca cag	gtg tac	acc ctg
Ala	Lys Gly	Gln Pro	Arg Glu	Pro Gln	val Tyr	Thr Leu
		145		150		155
cgg 528	gat gag	ctg acc	aag aac	cag gtc	agc ctg	acc tgc
Arg	Asp Glu	Leu Thr	Lys Asn	Gln val	Ser Leu	Thr Cys
	160		165		170	
ggc 576	ttc tat	ccc agc	gac atc	gcc gtg	gag tgg	gag agc
Gly	Phe Tyr	Pro Ser	Asp Ile	Ala val	Glu Trp	Glu Ser
	175		180		185	
ccg 624	gag aac	aac tac	aag acc	acg cct	ccc gtg	ctg gac
Pro	Glu Asn	Asn Tyr	Lys Thr	Thr Pro	Pro val	Leu Asp
		195		200		205
tcc 672	ttc ttc	ctc tac	agc aag	ctc acc	gtg gac	aag agc
Ser	Phe Phe	Leu Tyr	Ser Lys	Leu Thr	val Asp	Lys Ser
		210		215		220
cag 720	ggg aac	gtc ttc	tca tgc	tcc gtg	atg cat	gag gct
Gln	Gly Asn	val Phe	Ser Cys	Ser val	Met His	Glu Ala
		225		230		235
cac 762	tac acg	cag aag	agc ctc	tcc ctg	tct ccg	ggt aaa
						tga

His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys
	240					245					250	

<210> 40

<211> 251

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 40

```

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

```

<210> 41

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

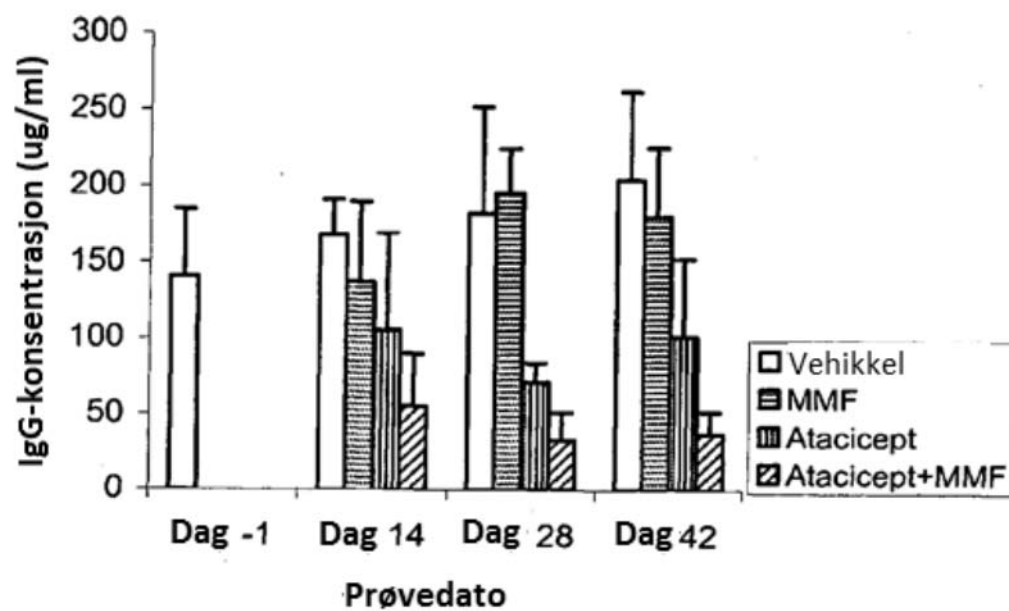
<223> Optimized tPA leader

<400> 41

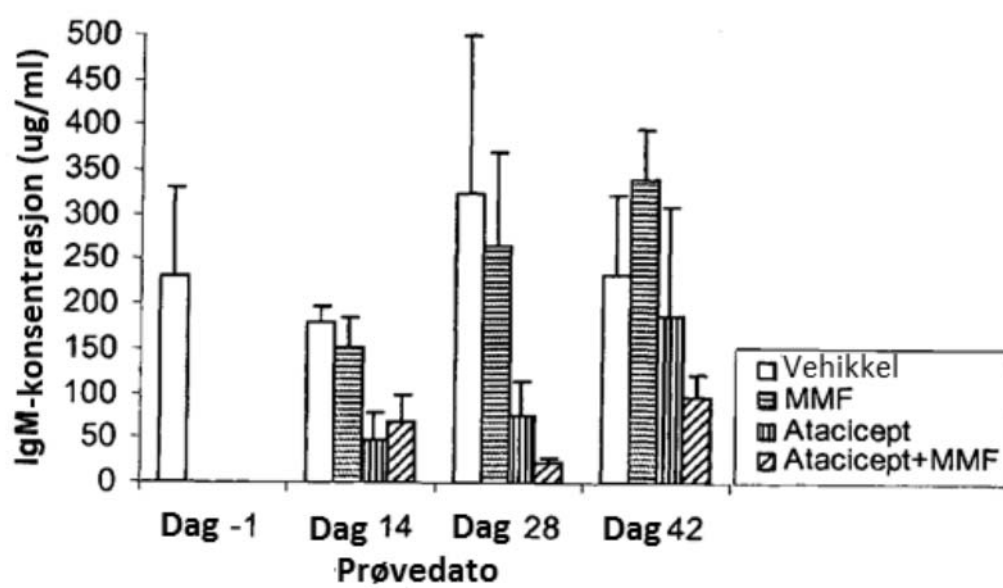
```

Met  Asp  Ala  Met  Lys  Arg  Gly  Leu  Cys  Cys  Val  Leu  Leu  Leu  Cys  Gly
 1      5      10      15
Ala  Val  Phe  Val  Ser  Leu  Ser  Gln  Glu  Ile  His  Ala  Glu  Leu  Arg  Arg
20      25      30
Phe  Arg  Arg
35

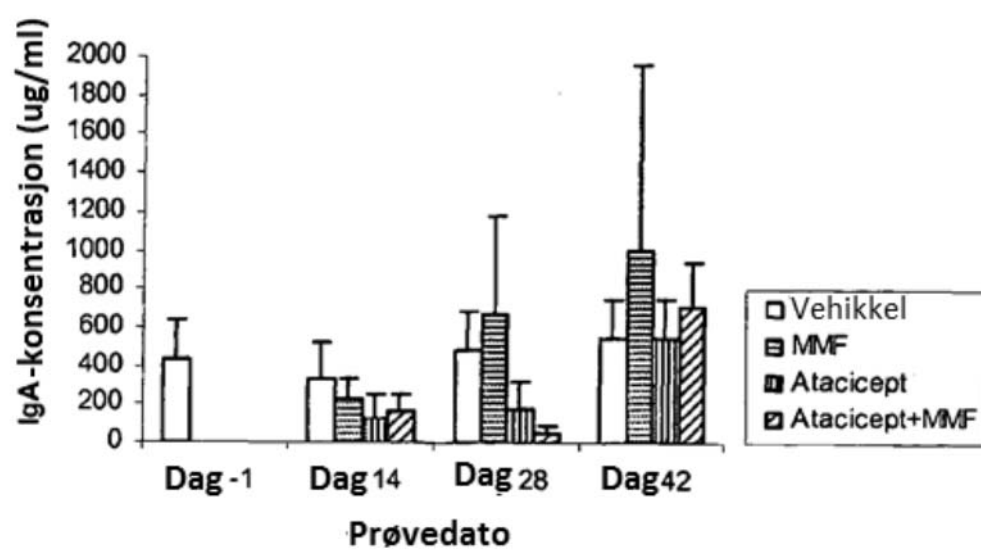
```



Figur 1



Figur 2



Figur 3