



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2152755 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

C07K 16/40 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2015.05.25
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.12.31
(86)	Europeisk søknadsnr	08756130.4
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.05.22
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.02.17
(30)	Prioritet	2007.05.23, US, 939791 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	Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, US-USA
(72)	Oppfinner	HASS, Philip, 558 Sierra Street, Moss Beach, CA 94038, US-USA JIANPING, Yin, 110 E. Court Lane, Poster City, CA 94404, US-USA KATSCHKE, Kenneth Jr., 9 Rosalita Lane, Millbrae, CA 94030, US-USA STEFFEK, Micah, 1743 Carmel Drive, 7, Walnut Creek, CA 94596, US-USA WIESMANN, Christian, Fuchshagweg 27, 4103 Bottmingen, CH-Sveits VAN LOOKEREN CAMPAGNE, Menno, 261 Molino Drive, San Francisco, CA 94127, US-USA
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Forebygging og behandling av komplementforbundne øyelidelser
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A-99/42133 WO-A-2006/042329 WO-A-2007/056227 K. PETRUKHIN: "New therapeutic targets in atrophic age-related macular degeneration." EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC TARGETS, vol. 11, no. 5, May 2007 (2007-05), pages 625-639, XP008094820 GB P. BORA ET AL.: "Role of complement and complement membrane attack complex in laser-induced choroidal neovascularization." THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 174, no. 1, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 491-497, XP002456229 Baltimore, MD, USA E. TANHEHCO ET AL.: "The anti-factor D antibody, MAb 166-32, inhibits the alternative pathway of the human complement system." TRANSPLANTATION PROCEEDINGS, vol. 31, no. 5, August 1999 (1999-08), pages 2168-2171, XP002454359 New York, NY, USA M. HARBOE ET AL.: "The quantitative role of alternative pathway amplification in classical pathway induced terminal complement activation." CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, vol. 138, no. 3, December 2004 (2004-12), pages 439-446, XP002454358 GB Ü. AKIF ET AL.: "Novel anti-factor D monoclonal antibody inhibits complement and leukocyte activation in a baboon model of cardiopulmonary bypass." THE ANNALS OF THORACIC

SURGERY, vol. 74, no. 2, August 2002 (2002-08), pages 355-362, XP002490167 USA
HARBOE M ET AL: "The quantitative role of alternative pathway amplification in classical
pathway induced terminal complement activation", CLINICAL AND EXPERIMENTAL
IMMUNOLOGY, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB, vol. 138, no. 3, 1 December 2004
(2004-12-01), pages 439-446, XP002454358, ISSN: 0009-9104, DOI: 10.1111/J.1365-
2249.2004.02627.X

FOREBYGGING OG BEHANDLING AV KOMPLEMENTFORBUNDNE ØYELIDELSER

OPPFINNELSENS FELT

5

[0001] Den foreliggende oppfinnelsen dreier seg om forebygging og behandling av komplementforbundne øyelidelser, som koroidal neovaskularisering (CNV) og aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD).

10 **Bakgrunnen for Oppfinnelsen**

[0002] Komplementsystemet er en kompleks enzymkaskade som består av en serie serumglykoproteiner som vanligvis eksisterer i inaktiv proenzymform. Komplementet kan aktiveres med to prosesser, den klassiske og den
15 alternativ, som går sammen på C3-nivået, der to liknende C3-konvertaser spalter C3 til C3a og C3b.

[0003] Makrofager er spesialistceller som har utviklet en egen evne til å kjenne igjen små forskjeller i strukturen til identifikasjonsmerker som uttrykkes på
20 celleoverflaten, såkalte molekylmønstre (Taylor, m.fl., Eur J Immunol 33, 2090–2097 (2003); Taylor, m.fl., Annu Rev Immunol 23, 901–944 (2005)). Direkte gjenkjenning av disse overflatestrukturene er et fundamentalt aspekt av egenimmuniteten, men med opsonisering kan generiske makrofagreseptorer formidle inneslutning, øke effektiviteten og gjøre gjenkjenningsrepertoaret til
25 fagocytten mer mangfoldig (Stuart og Ezekowitz, Immunity 22, 539–550 (2005)). Fagocytoseprosessen involverer mange ligand-reseptorinteraksjoner, og i dag er det klart at forskjellige opsoniner, blant annet immunoglobuliner, styrer celleaktiviteten som trengs for å internalisere patogener, ved å interagere med overflatereseptorer på overflaten av makrofagcellene (gjennomgått av Aderem og Underhill, Annu Rev
30 Immunol 17, 593–623 (1999); Underhill og Ozinsky, Annu Rev Immunol 20, 825–852 (2002)). Naturlige immunoglobuliner som kimbanegener koder for, kan kjenne igjen et bredt utvalg av patogener, men hoveddelen av det opsoniserende IgG dannes ved adaptiv immunitet, og derfor er ikke utskillingen gjennom Fc-reseptorer momentan (Carroll, Nat Immunol 5, 981–986 (2004)). På den annen side kjenner
35 komplementet raskt igjen overflatemolekyler på patogenet og primer partikkelen for opptak av komplementreseptorene (Brown, Infect Agents Dis 1, 63–70 (1991)).

[0004] Komplementet består av over 30 serumproteiner som opsoniserer et rikt utvalg patogener for gjenkjenning av komplementreseptorene. Det kan skilles ut tre prosesser som henger sammen med hva som opprinnelig utløste kaskaden (gjennomgått av (Walport, N Engl J Med 344, 1058–1066 (2001))). Alle tre har

5 trinnet der den sentrale komponenten C3 blir aktivert til felles, men de har forskjellig slags gjenkjenning og forskjellige biokjemiske trinn som fører til C3-aktiveringen. Den klassiske prosessen aktiveres av antistoffer bundet til patogenoverflaten, som så binder C1q-komplementkomponenten og starter en

10 serinproteasekaskade som ender med at C3 spaltes til sin aktive form C3b. Lektinprosessen aktiveres etter at lektinproteiner har kjent igjen karbohydratmotiver. Hittil er det identifisert tre medlemmer av denne prosessen: de

15 mannosebindende lektinene (MBL), SIGN-R1-familien av lektiner og fikoliner (Pyz m.fl., Ann Med 38, 242–251 (2006)). Både MBL og fikoliner er forbundet med serinproteaser, som fungerer som C1 i den klassiske prosessen og aktiverer

20 komponentene C2 og C4 som innledning til det sentrale C3-trinnet. Den alternative prosessen skiller seg både fra den klassiske og lektinprosessen ved at den aktiveres på grunn av direkte reaksjon mellom den interne C3-esteren og gjenkjenningsmotiver på patogenoverflaten. Når C3 først bindes til en aktiverende

25 flate, amplifiseres C3b-avsettingen raskt gjennom aktiviteten til proteasene faktor B og faktor D i den alternative prosessen. Det er viktig at C3b som avsettes både i den klassiske prosessen og lektinprosessen kan føre til amplifisering av C3b-avsettingen gjennom aktiviteten til faktor B og D. I alle tre prosessene mot

30 komplementaktivering er det avgjørende trinnet i opsoniseringen at komponent C3 omdannes til C3b. Spaltingen av C3 med enzymer i komplementkaskaden utsetter

35 tioesteren for nukleofilt angrep slik at C3b kan bindes kovalent til antigenoverflater gjennom tioesterdomenet. Dette er det første trinnet i komplementopsoniseringen. Det bundne C3b proteolyseres så til iC3b, C3c og C3dg, fragmenter som kjennes igjen av forskjellige reseptorer (Ross og Medof, Adv Immunol 37, 217–267 (1985)). Denne spaltingen avskaffer evnen hos C3b til å forsterke C3b-avsettingen

ytterligere og aktiverer de sene komponentene av komplementkaskaden, blant annet membranangrepskomplekset, som kan skade membraner direkte. De fagocytiske reseptorene til makrofagen gjenkjenner imidlertid helst C3b og fragmenter av det, og på grunn av fleksibiliteten til esterbindingsdannelsen er den C3-formidlede opsoniseringen sentral for patogengjenkjenningen (Holers m.fl.,

Immunol Today 13, 231–236 (1992)), og reseptorer for de forskjellige nedbrytingsproduktene av C3 spiller derfor en viktig rolle i vertens immunrespons.

[0005] C3 er selv et komplekst og fleksibelt protein som består av 13 distinkte domener. Kjernen av molekylet består av 8 såkalte makroglobulindomener (MG), som utgjør de tettpakkede α - og β -kjedene i C3. I denne strukturen er CUB-domenet (C1r/C1s, Uegf og Beinmorfogenetisk protein 1) og TED-domenet, som
 5 inneholder tioesterbindingen der C3b kan bindes kovalent til patogenoverflatene. Resten av domenene inneholder C3a eller fungerer som bindeledd og fyllmasse for kjernedomenene. Hvis C3b- og C3c-strukturen sammenliknes med C3, viser det at molekylet har store konformasjonsendringer for hver proteolyse, som eksponerer ikke bare TED, men også nye flater av molekylet som kan vekselvirke med
 10 cellereseptorer (Janssen og Gros, Mol Immunol 44, 3–10 (2007)).

[0006] Aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD) er den vanligste årsaken til blindhet hos eldre i hele verden. AMD karakteriseres ved økende tap av sentralsyn som skyldes degenerative og neovaskulære forandringer i makula, et høyt
 15 spesialisert område av netthinnen som er ansvarlig for den detaljerte synsskarpheten. De siste estimatene tyder på at 14 millioner personer er blinde eller sterkt svaksynte på grunn av AMD. Sykdommen har stor virkning på den fysiske og mentale helsen til eldre og familiene deres og er i ferd med å bli en betydelig belastning for helsetjenestene.

20

[0007] De siste oppdagelsene er imidlertid i ferd med å gi oss et klarere bilde av de relevante celleprosessene, genetiske faktorene og biokjemiske prosessene som er forbundet med tidlig AMD. Genet for faktor H i komplementet er det første genet som er identifisert i flere uavhengige studier som gir vesentlig genetisk risiko for å
 25 utvikle AMD. Tre separate grupper rapporterer altså at en tyrosin-histidinpolyformisme i aminosyreposisjon 402 på faktor H er forbundet med utvikling av AMD (Klein m.fl., Science 308:385–389 (2005); Haines m.fl., Science 308:419–421 (2005) og Edwards m.fl., Science 308:421–424 (2005)). Det er foreslått at svekket hemming av den alternative prosessen gjennom det
 30 sykdomsforbundne faktor H-allelet enten forårsaker eller bidrar vesentlig til utviklingen av AMD (Thurman og Holers, J Immunol 176:1305-1310 (2006)).

[0008] WO 2006/042329 bekjentgjør karakterisering av medlemmet CRIg av den alternative komplementprosessen, og trekker inn defekt alternativ prosess
 35 i utviklingen av komplementforbundne øyesykdommer.

[0009] Bora m.fl., J Immunol. 2005; 147(1): 491–497 bekjentgjør at komplementaktiveringen, også gjennom den alternative prosessen, er involvert i utviklingen av CNV og identifiserer et antistoff mot C6 som hemmer C6 og svekker CNV.

5

[0010] Tanhehco m.fl., Transplan Proc. 1999; 31(5): 2168-71 bekjentgjør antifaktoren D mAb 166-32, at den hemmer den alternative komplementprosessen og at den kan brukes til å hindre avvisning av xenotransplantater.

10 **[0011]** Petrukhin m.fl., Expert Opin Ther Targets. 2007; 11(5):625-39 bekjentgjør bruk av monoklonale antistoffer mot faktor D til nedregulering av den alternative komplementprosessen som potensiell terapi mot AMD.

15 **[0012]** WO 2007/056227 dreier seg om komplementhemmere for behandling eller forebygging av øyesykdommer som AMD og CNV, og bekjentgjør det monoklonale antistoffet mot faktor D, mAb 166-32.

Sammendrag av Oppfinnelsen

20 **[0013]** Ett aspekt av den foreliggende oppfinnelsen dreier seg om et middel som definert i patentkravene for å forebygge eller behandle en komplementforbundet øyelidelse ved å gi en trengende pasient en effektiv mengde av en faktor D-antagonist.

25 **[0014]** I forskjellige utførelsesformer er den trengende pasienten et pattedyr, for eksempel et menneske. Faktor D-antagonisten er et antistoff eller et antistofffragment. I forskjellige utførelsesformer kan antistoffet bindes til det aktive setet på faktor D, eller til en epitop som inkluderer rester fra det aktive setet på faktor D.

30

[0015] Spesifikke antistoffer innenfor gyldighetsområdet for denne oppfinnelsen inkluderer, uten innskrenkninger, antistoff 20D12, og varianter av dette som defineres i patentkravene. I en foretrukket utførelsesform bindes antistoffet eller antistofffragmentet i det vesentlige til den samme epitopen som antistoff 20D12, eller omfatter den tunge og/eller den lette CDR-sekvensen til antistoff 20D12
35 (SEQ ID NO: 1 og 2), eller er antistoff 20D12 eller et fragment av det.

[0016] Antistoffene mot faktor D inkluderer humane, humaniserte eller kimære antistoffer.

[0017] Antistoffragmentene kan for eksempel være Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, (scFv)₂, lineære antistoffer, enkeltkjedeantistoffmolekyler, miniantistoffer, diaantistoffer eller flerspesifikke antistoffer lagd av antistoffragmenter.

[0018] Komplementforbundne øyelidelser er for eksempel aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD), koroidal neovaskularisering (CNV), uveitt, diabetiske og andre iskemirelaterte retinopatier, diabetisk makulaødem, patologisk myopi, von Hippel-Lindaus sykdom, øyehistoplasmose, sentral netthinneveneokklusjon (CRVO), hornhinneneovaskularisering og netthinneveneovaskularisering.

[0019] Det bekjentgjøres også et sett som omfatter en faktor D-antagonist og instruksjoner for å gi denne antagonisten for å behandle en komplementforbundet øyelidelse.

[0020] Ett spesifikt aspekt av oppfinnelsen som defineres i patentkravene dreier seg om å bruke en faktor D-antagonist til å lage et legemiddel for å behandle en komplementforbundet øyelidelse.

[0021] Et annet spesifikt aspekt av oppfinnelsen som defineres i patentkravene dreier seg om en faktor D-antagonist til bruk i behandlingen av en komplementforbundet øyelidelse.

25

Kort Beskrivelse av Illustrasjonene

[0022]

Fig. 1A. Konsentrasjoner av faktor D i glasslegemet og Bruchs membran fra normale og AMD-rammede donorøyne. Faktor D-konsentrasjonene ble målt med en faktor D-spesifikk ELISA som beskrevet. B: totale konsentrasjoner av faktor D i øyet ble bestemt ved å beregne det totale bidraget fra faktor D uttrykt i Bruchs membran og den totale mengden av faktor D som ble funnet i glasslegemet.

Fig. 2. Faktor D-immunkjemi for et tverrsnitt av en Bruchs membran fra et AMD-rammet donorøye. Den innfelte figuren viser farging av faktor D i druser i lag oppå Bruchs membran. I tillegg til drusene var Bruchs membran og årehinnen var positive for faktor D.

Fig. 3. Karakterisering av 12D20 i en hemolytisk analyse som var selektiv for den alternative komplementprosessen. IC50-verdiene er angitt nedenfor og analysen ble utført som beskrevet i punktet om framgangsmåter.

Fig. 4. Lette og tunge sekvenser av det murine monoklonale antistoffet 12D20 (SEQ ID NO: 1 og 2).

Fig. 5. Epitopkart over de forskjellige antistoffene mot faktor D. Figuren angir den relative styrken deres i hemolyseanalysen.

Fig. 6. Aminosyresekvensen til naturlig humant faktor D-polypeptid (SEQ ID NO: 3).

Tabell 1. Analyse av komplementkomponenter ved AMD.

Tabell 2. Donorvev brukt i studiene.

Detaljert Beskrivelse av den Foretrukne Utførelsesformen

I. Definisjoner

[0023] Betegnelsene «faktor D» og «komplementfaktor D» brukes om hverandre, og står for faktor D-polypeptider både med naturlig sekvens og varianter.

[0024] En faktor D med «naturlig sekvens» er et polypeptid med den samme aminosyresekvensen som et faktor D-polypeptid i naturen, uansett hvordan man lager det. Altså kan faktor D med naturlig sekvens isoleres fra naturen eller produseres rekombinant og/eller syntetisk. I tillegg til et modent faktor D-protein, for eksempel et modent humant faktor D-protein (NM_001928, SEQ ID NO: 3), inkluderer betegnelsen «faktor D med naturlig sekvens» spesifikt naturlige forløperformer for faktor D (f.eks. et inaktivt preprotein, som spaltes proteolytisk for å danne den aktive formen), naturlige variantformer (f.eks. alternativt spleisede former) og naturlige allelvarianter av faktor D, samt strukturelle konformasjonsvarianter av faktor D-molekyler med samme aminosyresekvens som et faktor D-polypeptid utvunnet fra naturen. Faktor D-polypeptider fra ikke-menneskelige dyr, blant annet høyere primater og ikke-menneskelige pattedyr, inkluderes spesifikt av denne definisjonen.

[0025] «Faktor D-variant» eller «komplementfaktor D-variant» betyr et aktivt faktor D-polypeptid som definert nedenfor med minst 80 % identisk aminosyresekvens med et faktor D-polypeptid med naturlig sekvens, for eksempel det menneskelige faktor D-polypeptidet med naturlig sekvens i SEQ ID

NO: 3. Vanligvis vil en faktor D-variant ha minst rundt 80 % identisk aminosyresekvens eller minst rundt 85 % identisk aminosyresekvens eller minst rundt 90 % identisk aminosyresekvens eller minst rundt 95 % identisk aminosyresekvens eller minst rundt 98 % identisk aminosyresekvens eller minst
 5 rundt 99 % identisk aminosyresekvens med den modne menneskelige aminosyresekvensen i SEQ ID NO: 3. Det foretrekkes at den høyeste graden av sekvensidentitet opptrer inne i det aktive setet til faktor D.

[0026] Det «aktive setet» til faktor D er definert ved His-57, Asp-102 og Ser-
 10 195 (kymotrypsinogenummerering) i den menneskelige faktor D-sekvensen. Faktor D har Asp189 (kymotrypsinnummerering) i bunnen av den primære spesifisitetsslommen, og spalter en Arg-peptidbinding. Den katalytiske triaden består av His-57, Asp-102 og Ser-195. Asp-102 og His57 har atypisk konformasjon sammenliknet med andre serinproteaser (Narayana m.fl., J. Mol.
 15 Biol. 235 (1994), 695–708). Det observeres en unik sal-bro mellom Asp189 og Arg218 i bunnen av S1-lommen som har hevet løkken 214–218 og dannet en dyp og trang S1-lomme (Jing m.fl., J. Mol. Biol. 282 (1998) 1061–1081). Denne løkken og flere andre rester rundt det aktive setet er påvist ved mutasjonsanalyse å være de viktigste strukturdeterminantene for den
 20 esterolytiske aktiviteten til faktor D (Kim m.fl., J. Biol. Chem. 270 (1995) 24399–24405). Ut fra disse resultatene er det foreslått at faktor D kan få en konformasjonsendring når den binder C3b-bundet faktor B, og dermed uttrykker proteolytisk aktivitet (Volanakis og Narayana, Protein Sci. 5 (1996) 553–564).

[0027] «Prosent (%) aminosyresekvensidentitet» er definert som antall prosent aminosyrerester i en kandidatsekvens som er identiske med aminosyrene i en faktor D referansesekvens, når sekvensene sammenstilles og det innføres åpninger hvis det er nødvendig for å oppnå høyest mulig prosent sekvensidentitet, og eventuelle konservative substitusjoner ikke regnes som del av sekvensidentiteten.
 30 Sammenstillinger for å bestemme prosentvis aminosyresekvensidentitet kan gjøres på mange kjente måter, for eksempel med offentlig tilgjengelige datamaskinprogrammer som BLAST, BLAST-2, ALIGN eller Megalign (DNASTAR). Fagpersoner vil kunne bestemme passende parametere for å måle sammenstillingen, inkludert eventuelle algoritmer som måtte være nødvendig for å
 35 oppnå maksimal sammenstilling gjennom hele lengden av sekvensene som skal sammenliknes. Så beregnes sekvensidentiteten i forhold til den lengste sekvensen,

dvs. at selv om en kortere sekvens viser 100 % sekvensidentitet med en del av den lengre sekvensen, vil den totale sekvensidentiteten være mindre enn 100 %.

[0028] «Prosent (%) nukleinsyresekvensidentitet» defineres som prosentandelen av nukleotider i en kandidatsekvens som er identiske med nukleotidene i en faktor D-kodende referansesekvens, når sekvensene sammenstilles og det innføres åpninger hvis det er nødvendig for å oppnå høyest mulig prosent sekvensidentitet. Sammenstillinger for å bestemme prosentvis nukleinsyresekvensidentitet kan gjøres på mange kjente måter, for eksempel med offentlig tilgjengelige datamaskinprogrammer som BLAST, BLAST-2, ALIGN eller Megalign (DNASTAR). Fagpersoner vil kunne bestemme passende parametere for å måle sammenstillingen, inkludert eventuelle algoritmer som måtte være nødvendig for å oppnå maksimal sammenstilling gjennom hele lengden av sekvensene som skal sammenliknes. Så beregnes sekvensidentiteten i forhold til den lengste sekvensen, dvs. at selv om en kortere sekvens viser 100 % sekvensidentitet med en del av den lengre sekvensen, vil den totale sekvensidentiteten være mindre enn 100 %.

[0029] Et «isolert» nukleinsyremolekyl er et nukleinsyremolekyl som er identifisert og utskilt fra minst ett forurensende nukleinsyremolekyl som det vanligvis er forbundet med i den naturlige kilden for nukleinsyren. Et isolert nukleinsyremolekyl er annerledes enn den formen eller situasjonen som finnes i naturen. Isolerte nukleinsyremolekyler skiller seg derfor fra nukleinsyremolekylene slik de eksisterer i naturlige celler. Men et isolert nukleinsyremolekyl inkluderer nukleinsyremolekyler som befinner seg i celler som vanligvis uttrykker et kodet polypeptid der for eksempel nukleinsyremolekylet er i en annen kromosomposisjon enn i naturlige celler.

[0030] Et «isolert» faktor D-kodende nukleinsyremolekyl er et nukleinsyremolekyl som er identifisert og utskilt fra minst ett forurensende nukleinsyremolekyl som det vanligvis er forbundet med i den naturlige kilden for den faktor D-kodende nukleinsyren. Et isolert faktor D-kodende nukleinsyremolekyl er annerledes enn den formen eller situasjonen som finnes i naturen. Isolerte nukleinsyremolekyler som koder for faktor D-polypeptider skiller seg derfor fra (et) kodende nukleinsyremolekyl(er) slik de eksisterer i naturlige celler. Men et isolert faktor D-kodende nukleinsyremolekyl inkluderer faktor D-kodende nukleinsyremolekyler som befinner seg i celler som vanligvis uttrykker faktor D der for eksempel nukleinsyremolekylet er i en annen kromosomposisjon enn i naturlige celler.

[0031] Betegnelsen «antagonist» brukes i sin videste forstand, og inkluderer alle molekyler som kan nøytralisere, blokkere, helt eller delvis hemme, oppheve, redusere eller forstyrre en biologisk aktivitet hos faktor D. Faktor D-antagonister inkluderer, uten innskrenkninger, antistoffer mot faktor D og antigenbindende fragmenter av dem, andre bindende polypeptider, peptider og ikke-peptidiske små molekyler som bindes til faktor D og kan nøytralisere, blokkere, helt eller delvis hemme, oppheve, redusere eller forstyrre aktivitetene til faktor D, for eksempel evnen hos faktor D til å delta i patologien til en komplementforbundet øyelidelse.

[0032] Et «lite molekyl» defineres her ved at det har molekylvekt på under rundt 600, fortrinnsvis under rundt 1000 dalton.

[0033] «Aktiv» eller «aktivitet» eller «biologisk aktivitet» i sammenheng med en faktor D-antagonist ifølge den foreliggende oppfinnelsen er evnen til å antagonisere (helt eller delvis hemme) en biologisk aktivitet hos faktor D. En foretrukket biologisk aktivitet hos en faktor D-antagonist er evnen til å oppnå en målbar forbedring i tilstanden, f.eks. patologien ved en faktor D-forbundet sykdom, for eksempel en komplementforbundet øyelidelse. Aktiviteten kan bestemmes ved tester *in vitro* eller *in vivo*, blant annet bindingsanalyser, relevante dyremodeller eller kliniske forsøk på mennesker.

[0034] Uttrykket «komplementforbundet øyelidelse» brukes i sin videste forstand og inkluderer alle øyelidelser med patologi som involverer komplementet, blant annet den klassiske og den alternative prosessen, og spesielt den alternative prosessen i komplementet. Komplementforbundne øyelidelser inkluderer, uten innskrenkninger, makuladegenerative sykdommer, som alle stadier av aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD), blant annet tør og våt (ikke-eksudativ og eksudativ) form, koroidal neovaskularisering (CNV), uveitt, diabetisk og annen iskemirelatert retinopati, samt andre intraokulære neovaskulære sykdommer som diabetisk makulaødem, patologisk myopi, von Hippel-Lindaus sykdom, øyehistoplasmose, sentral netthinneveneokklusjon (CRVO), hornhinneneovaskularisering og netthinneovaskularisering. En foretrukket gruppe av komplementforbundne øyelidelser er aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD), inkludert ikke-eksudativ (våt) og eksudativ (tørr eller atrofisk) AMD, koroidal neovaskularisering (CNV), diabetisk retinopati (DR) og endoftalmitt.

[0035] «Behandling» er en intervensjon som utføres for å hindre at en sykdom utvikler seg eller for å endre patologien dens. Altså står «behandling» både for terapeutisk behandling og profylaktiske eller forebyggende tiltak. De som trengte behandling inkluderer både de som allerede har sykdommen og de som sykdommen skal forebygges for. Ved behandling av en immunrelatert sykdom kan et legemiddel direkte forandre størrelsen av en respons på en del av immunresponsen eller gjøre sykdommen mer mottakelig for behandling med andre legemidler, *f.eks.* antibiotika, soppmidler, antiinflammatorika, kjemoterapeutika osv.

10

[0036] «Patologien» til en sykdom, for eksempel en komplementforbundet øyelidelse, inkluderer alle fenomener som går ut over pasientens velvære. Dette inkluderer, uten innskrenkninger, unormal eller ukontrollerbar cellevekst (av nøytrofiler, eosinofiler, monocytter, lymfocytter), antistoffproduksjon, autoantistoffproduksjon, komplementproduksjon, forstyrrelser i den normale funksjonen til naboceller, frigjøring av cytokiner eller andre sekresjonsprodukter i unormale konsentrasjoner, undertrykking eller forverring av alle inflammatoriske eller immunologiske responser, infiltrering av inflammasjonsceller (nøytrofiler, eosinofiler, monocytter, lymfocytter) i cellerom osv.

20

[0037] Slik den brukes her står betegnelsen «pattedyr» for ethvert dyr som klassifiseres som pattedyr, inkludert, uten innskrenkninger, mennesker, høyere primater, husdyr og bufe, samt sportsdyr og kjæledyr som hester, griser, kveg, hunder, katter, vesel osv. I en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen er pattedyret et menneske.

25

[0038] Administrering «i kombinasjon med» ett eller flere andre legemidler inkluderer både samtidig og påfølgende administrering i enhver rekkefølge.

[0039] «Terapeutisk effektiv mengde» er den mengden av en «faktor D-antagonist» som trengs for å oppnå en målbar forbedring i tilstanden, *f.eks.* patologien til målsykdommen, for eksempel en komplementforbundet øyelidelse.

30

[0040] Betegnelsen «kontrollsekvenser» står for DNA-sekvenser som trengs for å uttrykke en operativt forbundet kodingssekvens i en bestemt vertsorganisme. Kontrollsekvensene som egner seg for prokaryoter inkluderer for eksempel en

35

promotor, eventuelt en operatorsekvens, og et ribosombindingssete. Det er kjent at eukaryotceller bruker promotorer, polyadenyleringssignaler og forøkere.

[0041] Nukleinsyrer er «operativt forbundet» når de står i et operativt forhold til en annen nukleinsyresekvens. For eksempel er DNA for en presekvens eller sekretorisk ledesekvens operativt forbundet med DNA for et polypeptid hvis den uttrykkes som et preprotein som deltar i utskillingen av polypeptidet, en promotor eller forøker er operativt forbundet med en kodingssekvens hvis den påvirker transkriberingen av sekvensen, og et ribosombindingssete er operativt forbundet med en kodingssekvens hvis det er plassert slik at det letter translateringen. Generelt betyr «operativt forbundet» at DNA-sekvensene som kobles sammen er sammenhengende, og når det gjelder sekretoriske ledersekvenser, er sammenhengende og i lesefase. Forøkere trenger imidlertid ikke å være sammenhengende. Sammenbindingen oppnås ved binding i egnede restriksjonssteder. Hvis det ikke eksisterer slike seter, brukes de syntetiske oligonukleotidadaptorene eller -linkerne i samsvar med konvensjonell praksis.

[0042] «Stringensen» til hybridiseringsreaksjoner er lett å bestemme for en vanlig kvalifisert fagperson. Den er vanligvis en empirisk beregning som er avhengig av probelengden, vasketemperaturen og saltkonsentrasjonen. Generelt krever lengre prober høyere temperatur for tilstrekkelig hybridisering, mens kortere prober trenger lavere temperatur. Hybridiseringen er generelt avhengig av evnen hos det denaturerte DNA til å hybridisere igjen når det finnes komplementære strenger i et miljø under smeltetemperaturen deres. Jo høyere homologi det ønskes mellom probe og hybridiserbar sekvens, jo høyere relativ temperatur kan det brukes. Derfor vil høyere temperatur ha en tendens til å gjøre reaksjonsforholdene mer stringente mens lavere temperatur virker motsatt. Flere opplysninger og forklaringer om stringensen ved hybridiseringsreaksjoner finnes i Ausubel m.fl., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

30

[0043] «Stringente forhold» eller «forhold med høy stringens» defineres her som forhold der: (1) det brukes lav ionestyrke og høy temperatur til vasking, for eksempel 0,015 M natriumklorid/0,0015 M natriumsitrat/0,1 % natriumdodekylsulfat ved 50 °C, (2) det brukes et denatureringsmiddel under hybridiseringen, som formamid, for eksempel 50 volum-% formamid med 0,1 % bovint serumalbumin/0,1 % Ficoll/0,1 % polyvinylpyrrolidon/50 mM natriumfosfatbuffer ved pH 6,5 med 750 mM natriumklorid, 75 mM natriumsitrat ved

35

42 °C, eller (3) det brukes 50 % formamid, 5 x SSC (0,75 M NaCl, 0,075 M natriumsitrat), 50 mM natriumfosfat (pH 6,8), 0,1 % natriumpyrofosfat, 5 x Denhardts løsning, ultralydbehandlet laksemelke-DNA (50 µg/ml), 0,1 % SDS og 10 % dekstransulfat ved 42 °C, med vasking ved 42 °C i 0,2 x SSC
 5 (natriumklorid/natriumsitrat) og 50 % formamid ved 55 °C og så en høystringensvask som består av 0,1 x SSC som inneholder EDTA ved 55 °C.

[0044] «Moderat stringente forhold» kan identifiseres som slike forhold som beskrives av Sambrook m.fl., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New
 10 York: Cold Spring Harbor Press, 1989, og inkluderer bruk av vaskeløsnings- og hybridiseringsforhold (f.eks. temperatur, ionestyrke og % SDS) som er mindre stringente enn de som beskrives ovenfor. Et eksempel på moderat stringente forhold er inkubering over natten ved 37 °C i en løsning som omfatter: 20 % formamid, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM trinatriumsitrat), 50 mM natriumfosfat
 15 (pH 7,6), 5 x Denhardts løsning, 10 % dekstransulfat og 20 mg/ml denaturert skjærfragmentert laksemelke-DNA, så vaskes filtrene i 1 x SSC ved rundt 37-50 °C. En fagperson vil vite hvordan temperaturen, ionestyrken osv. skal justeres for å tilpasse seg til faktorer som probelengde eller liknende.

20 **[0045]** Betegnelsen «epitopmerket» slik den brukes her står for et kimært polypeptid som omfatter et polypeptid ifølge oppfinnelsen fusjonert med et «merkepolypeptid». Merkepolypeptidet har tilstrekkelig mange rester til å utgjøre en epitop som det kan lages et antistoff mot, og samtidig kort nok til at det ikke forstyrrer aktiviteten til polypeptidet det er fusjonert med. Det
 25 foretrekkes også at merkepolypeptidet er forholdsvis unikt slik at antistoffet ikke reagerer vesentlig med andre epitoper. Egnede merkepolypeptider har vanligvis minst seks aminosyrerester og vanligvis mellom omtrent 8 og 50 aminosyrerester (fortrinnsvis mellom rundt 10 og 20 aminosyrerester).

30 **[0046]** Betegnelsen «antistoff» brukes i sin videste forstand og dekker spesifikt, uten at det skal oppfattes innskrenkende, enkelte monoklonale antistoffer mot faktor D (inkludert agonist, antagonist og nøytraliserende antistoffer) og sammensetninger med antistoffer mot faktor D som har polyepitopisk spesifisitet. Uttrykket «monoklonalt antistoff» står her for et
 35 antistoff fra en populasjon av stort sett homogene antistoffer, dvs. at de individuelle antistoffene som omfatter populasjonen er identiske bortsett fra mulige naturlige mutasjoner som kan være til stede i mindre mengder.

- [0047]** Uttrykket «monoklonalt antistoff» står her for et antistoff fra en populasjon av stort sett homogene antistoffer, dvs. at de individuelle antistoffene som omfatter populasjonen er identiske bortsett fra mulige naturlige mutasjoner som kan være til stede i mindre mengder. Monoklonale antistoffer er svært spesifikke og rettet mot et enkelt antigensete. I motsetning til konvensjonelle (polyklonale) antistoffpreparater som vanligvis inkluderer forskjellige antistoffer rettet mot forskjellige determinanter (epitoper), er hvert av de monoklonale antistoffene rettet mot en enkelt determinant på antigenet. Adjektivet «monoklonal» betyr at antistoffet stammer fra en stort sett homogen populasjon av antistoffer, og det skal ikke oppfattes slik at det krever produksjon av antistoffet ved noen bestemt framgangsmåte. For eksempel kan de monoklonale antistoffene som skal brukes ifølge den foreliggende oppfinnelsen lages med hybridometoden som ble beskrevet først av Kohler m.fl. (1975) Nature 256:495, eller de kan lages ved rekombinante DNA-metoder (se f.eks. U.S. Patent No. 4,816,567). De «monoklonale antistoffene» kan også isoleres fra bakteriofantantistoffbibliotek med metodene som beskrives i Clackson m.fl. (1991) Nature 352:624–628 og Marks m.fl. (1991) J. Mol. Biol. 222:581–597, for eksempel.
- [0048]** De monoklonale antistoffene som omtales her inkluderer spesifikt «kimære» antistoffer (immunoglobuliner) der en del av den tunge og/eller lette kjeden er identiske med eller homologe med tilsvarende sekvenser i antistoffer som stammer fra bestemte arter eller hører til en bestemt antistoffklasse eller underklasse, mens resten av kjeden(e) er identiske med eller homologe med tilsvarende sekvenser i antistoffer som stammer fra en annen art eller hører til en annen antistoffklasse eller underklasse, samt fragmenter av slike antistoffer, så lenge de viser den ønskede biologiske aktiviteten (U.S. Patent No. 4,816,567 og Morrison m.fl. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851–6855).
- [0049]** «Humaniserte» former for ikke-humane (f.eks. murine) antistoffer er kimære antistoffer som inneholder minimalt med sekvens fra ikke-humant immunoglobulin. For det meste er humaniserte antistoffer humane immunoglobuliner (mottakerantistoffer) der rester fra en hypervariabel region av mottakeren er byttet ut med rester fra en hypervariabel region av en ikke-menneskelig art (donorantistoff) som mus, rotte, kanin eller ikke-menneskelig primat, som har den ønskede spesifisiteten, affiniteten og kapasiteten. I noen tilfeller byttes rester i Fv-rammeregionen (FR) i humant immunoglobulin ut med

tilsvarende ikke-humane rester. Dessuten kan humaniserte antistoffer omfatte rester som ikke finnes i mottakerantistoffene eller i donorantistoffene. Disse modifikasjonene lages for å raffinere antistoffytelsen ytterligere. Generelt vil det humaniserte antistoffet omfatte stort sett alt av minst ett og gjerne to variable domener der alle eller stort sett alle de hypervariable løkkene svarer til løkkene i et ikke-humant immunoglobulin og alle eller stort sett alle FR-regionene er fra en human immunoglobulinsekvens. Det humaniserte antistoffet omfatter også alternativt minst en del av en konstant immunoglobulinregion (Fc), vanligvis fra et menneskelig immunoglobulin. Flere opplysninger finnes i Jones m.fl. (1986) Nature 321:522–525; Riechmann m.fl. (1988) Nature 332:323–329 og Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2:593–596.

[0050] Et «artsavhengig» antistoff er et antistoff som har sterkere bindingsaffinitet for et antigen fra en første pattedyrart enn for en homolog av antigenet fra en annen pattedyrart. Normalt vil det artsavhengige antistoffet «bindes spesifikt» til et humant antigen (dvs. ha en bindingsaffinitet (K_d) som ikke er over 1×10^{-7} M, fortrinnsvis ikke mer enn rundt 1×10^{-8} M og mest foretrukket ikke mer enn rundt 1×10^{-9} M), men har bindingsaffinitet for en homolog av antigenet fra en andre ikke-human pattedyrart som er minst rundt 50 eller minst rundt 500 eller minst rundt 1000 ganger så svak som bindingsaffiniteten til det humane antigenet. Det artsavhengige antistoffet kan være en hvilken som helst av de forskjellige typene av antistoff som defineres ovenfor, men fortrinnsvis et humanisert eller humant antistoff.

[0051] Slik det brukes her står «antistoffmutant» eller «antistoffvariant» for en aminosyresekvensvariant av det artsavhengige antistoffet der en eller flere av aminosyrerestene i det artsavhengige antistoffet er modifisert. Slike mutanter er mindre enn 100 % sekvensidentiske med eller liknende det artsavhengige antistoffet. I en foretrukket utførelsesform vil antistoffmutanten ha en aminosyresekvens som har minst 75 % sekvensidentitet eller likhet med aminosyresekvensen til enten det tunge eller lette variable domenet til det artsavhengige antistoffet, fortrinnsvis minst 80 %, mer foretrukket minst 85 %, mer foretrukket minst 90 % og mest foretrukket minst 95 %. Identitet eller likhet med denne sekvensen defineres her som prosentandelen av aminosyrerester i kandidatsekvensen som er identisk med (dvs. samme rest) eller likner (dvs. aminosyrerest fra samme gruppe inndelt etter felles sidekjedegenskaper, se nedenfor) restene i det artsavhengige antistoffet etter at sekvensene er sammenstilt

og det er innført åpninger hvis det er nødvendig for å oppnå høyest mulig prosentvis sekvensidentitet. Det skal ikke oppfattes slik at noen av forlengelsene, delesjonene eller insersjonene i N-enden, C-enden eller midt i antistoffsekvensen utenfor det variable domenet påvirker sekvensidentiteten eller likhetsgraden.

5

[0052] Et «isolert» antistoff er et antistoff som er identifisert og skilt ut eller utvunnet fra en bestanddel av sitt naturlige miljø. Forurensende bestanddeler av det naturlige miljøet er stoffer som ville forstyrre diagnostiske eller terapeutiske anvendelser av antistoffet og kan inkludere enzymer, hormoner og andre proteiner eller andre stoffer i løsning. I foretrukne utførelsesformer vil antistoffet være renset (1) til mer enn 95 vektprosent antistoff ifølge Lowry-metoden og fortrinnsvis mer enn 99 vektprosent, (2) til en grad som er tilstrekkelig for å oppnå minst 15 rester av aminosyresekvensen i N-enden eller internt ved hjelp av en dreiebegersekvenator eller (3) til homogenitet ifølge SDS-PAGE under reduserende eller ikke-reduserende forhold ved hjelp av Coomassie-blått eller fortrinnsvis sølvfarging. Isolert antistoff inkluderer antistoffet in situ i rekombinante celler, siden minst én bestanddel av det naturlige miljøet til antistoffet ikke er til stede. Men vanligvis vil isolerte antistoffer bli framstilt med minst ett rensetrinn.

[0053] Slik det brukes her står «variabelt antistoffdomene» for delene av den lette og tunge kjeden til antistoffmolekylet som inneholder aminosyresekvensene til de komplementaritetsbestemmende regionene (CDR, dvs. CDR1, CDR2 og CDR3) og rammeregionene (FR). V_H står for det variable domenet til den tunge kjeden. V_L står for det variable domenet til den lette kjeden. Ifølge framgangsmåtene som brukes i denne oppfinnelsen kan aminosyreposisjonene som tilordnes CDR og FR defineres ifølge Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 og 1991)). Aminosyrenummereringen til antistoffer eller antigenbindende fragmenter følger også Kabat.

30

[0054] Slik det brukes her står uttrykket «komplementaritetsbestemmende regioner» (CDR, dvs. CDR1, CDR2 og CDR3) for aminosyrerestene i et variabelt antistoffdomene som må være til stede for at antistoffet skal kunne binde antigen. Hvert av de variable domene har vanligvis tre CDR-regioner som identifiseres CD1, CDR2 og CDR3. Alle de komplementaritetsbestemmende regionene kan omfatte aminosyrerester fra en «komplementaritetsbestemmende region» som definert av Kabat (dvs. omtrent restene 24–34 (L1), 50–56 (L2) og 89–97 (L3) i det

35

lette variable domenet og 31–35 (H1), 50–65 (H2) og 95–102 (H3) i det tunge variable domenet, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. utg. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. (1991)) og/eller restene fra en «hypervariabel løkke» (dvs. omtrent restene 26–32 (L1), 50–52 (L2) og 91–96 (L3) i det lette variable domenet og 26–32 (H1), 53–55 (H2) og 96–101 (H3) i det tunge variable domenet; Chothia og Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901–917). I noen tilfeller kan en komplementaritetsbestemmende region inneholde aminosyrer både fra en CDR-region definert ifølge Kabat og en hypervariabel løkke. For eksempel inneholder CDRH1 i den tunge kjeden til antistoffet 4D5 aminosyrene 26 til 35.

[0055] «Rammeregioner» (heretter FR) er alle andre aminosyrerester i de variable domenene enn CDR-restene. Alle variable domener har vanligvis fire FR identifisert som FR1, FR2, FR3 og FR4. Hvis CDR defineres ifølge Kabat, er posisjonen til FR-restene i den lette kjeden omtrent rest 1–23 (LCFR1), 35–49 (LCFR2), 57–88 (LCFR3) og 98–107 (LCFR4), og FR-restene i den tunge omtrent rest 1–30 (HCFR1), 36–49 (HCFR2), 66–94 (HCFR3) og 103–113 (HCFR4) av restene i den tunge kjeden. Hvis CDR omfatter aminosyrerester fra hypervariable løkker, er posisjonen til FR-restene i den lette kjeden omtrent rest 1–25 (LCFR1), 33–49 (LCFR2), 53–90 (LCFR3) og 97–107 (LCFR4) i den lette kjeden, og til FR-restene i den tunge omtrent rest 1–25 (HCFR1), 33–52 (HCFR2), 56–95 (HCFR3) og 102–113 (HCFR4) av restene i den tunge kjeden. I noen tilfeller, når CDR omfatter aminosyrer både fra en CDR ifølge Kabat og aminosyrer fra en hypervariabel løkke, blir FR-restene justert i samsvar med dette. Hvis CDRH1 for eksempel inneholder aminosyrene H26–H35, er FR1-restene i den tunge kjeden i posisjonene 1–25, mens FR2-restene er i posisjon 36–49.

[0056] Slik det brukes her står «kodonsett» for et sett av forskjellige nukleotidtriplettsekvenser som brukes til å kode for ønskede variantamino-syrer. Et sett av nukleotider kan for eksempel framstilles ved fastfasesyntese, blant annet sekvenser som står for alle mulige kombinasjoner av nukleotidtriplekker som kodonsettet tilveiebringer, og som vil kode for den ønskede gruppen av aminosyrer. En standard form for benevnin-g av kodonene er IUB-koden, som er kjent i faget og beskrives her. Et kodonsett representeres vanligvis med tre versaler i kursiv, f.eks. *NNK*, *NNS*, *XYZ*, *DVK* eller liknende. Et «ikke tilfeldig kodonsett» står altså her for et kodonsett som koder for utvalgte aminosyrer som delvis, fortrinnsvis helt oppfyller kriteriene for aminosyrevalg slik de beskrives her. Framstilling av oligonukleotider

med utvalgt nukleotid-«degenerasjon» i visse posisjoner er velkjent, for eksempel TRIM-metoden (Knappek m.fl. (1999) J. Mol. Biol. 296:57–86), Garrard & Henner (1993) Gene 128:103). Slike sett av oligonukleotider som har visse kodonsett kan framstilles med kommersielle nukleinsyresynteseapparater (som fås i handelen for eksempel fra Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), eller de kan kjøpes (for eksempel fra Life Technologies, Rockville, MD, USA). Derfor vil et sett av oligonukleotider som framstilles med et bestemt kodonsett vanligvis inkludere mange oligonukleotider med forskjellige sekvenser, mens forskjellene utgjøres av kodonsettet inne i den totale sekvensen. Oligonukleotider, slik de omtales ifølge oppfinnelsen, har sekvenser som gjør det mulig for dem å hybridiseres til en nukleinsyremal for et variabelt domene, og de kan, men må ikke inneholde restriksjonsenzymseter som for eksempel kan brukes til kloning.

[0057] Betegnelsen «antistofffragment» brukes her i sin videste betydning og inkluderer, uten at det skal oppfattes innskrenkende, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, (scFv)₂, dAb, og fragmenter av den komplementaritetsbestemmende regionen (CDR), lineære antistoffer, enkjedede antistoffmolekyler, miniantistoffer, diaantistoffer og flerspesifikke antistoffer dannet av antistofffragmenter.

[0058] Et «Fv»-fragment er et antistofffragment som inneholder et komplett gjenkjennings- og bindingssete for antigener. Regionen består av en dimer av et tungt og et lett variabelt domene tett forbundet med hverandre på en måte som kan være kovalent, som for eksempel i scFv. Det er i denne konfigurasjonen at de tre CDR-ene i hvert variabelt domene interagerer slik at de definerer et antigenbindingssete på overflaten av V_H-V_L-dimeren. Sammen gir de seks CDR-ene eller en undergruppe av dem antistoffet antigenbindingsspesifisitet. Men også et enkelt variabelt domene (eller et halvt Fv som bare har tre CDR som er spesifikke for et antigen) kan gjenkjenne og binde antigen, om enn affiniteten vanligvis er lavere enn for hele bindingssetet.

[0059] «Fab»-fragmentet inneholder et variabelt og et konstant domene fra den lette kjeden og et variabelt domene og det første konstante domenet (CH1) fra den tunge kjeden. F(ab')₂-antistofffragmenter omfatter et par Fab-fragmenter som vanligvis er bundet sammen kovalent nær karboksyendene ved hjelp av hengselcysteiner. Andre kjemiske koblinger av antistoffer er også kjent.

«Enkjedet Fv» eller «scFv»-antistofffragmenter omfatter V_H- og V_L-domenene til antistoffer hvis disse domenene foreligger i en enkelt polypeptidkjede.

Vanligvis omfatter Fv-polypeptidet også et polypeptidmellomledd mellom V_H - og V_L -domenet, som gjør det mulig for scFv å danne den ønskede strukturen for antigenbindingen. En gjennomgang av scFv er presentert av Pluckthun i *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, bd 113, Rosenberg og Moore red.
 5 Springer-Verlag, New York, s. 269–315 (1994).

[0060] Betegnelsen «diaantistoffer» står for små antistofffragmenter med to antigenbindende seter og som omfatter et tungt variabelt domene (V_H) koblet til et lett variabelt domene (V_L) i den samme polypeptidkjeden (V_H og V_L). Ved å bruke et
 10 bindeledd som er for kort til at det opptrer paring mellom de to domenene på den samme kjeden, tvinges domenene til å pare seg med de komplementære domenene på en annen kjede slik at det dannes to antigenbindende seter. Diaantistoffer beskrives nærmere for eksempel i EP 404,097, WO 93/11161 og Hollinger m.fl. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444–6448).

15 **[0061]** Uttrykket «lineære antistoffer» står for antistoffene som beskrives i Zapata m.fl. (1995 *Protein Eng*, 8(10):1057–1062). Kort fortalt omfatter disse antistoffene et par dobbelte Fd-segmenter ($V_H-C_H1-V_H-C_H1$) som sammen med komplementære lette polypeptider danner et par antigenbindende regioner.
 20 Lineære antistoffer kan være enten bispesifikke eller monospesifikke.

[0062] Slik det brukes her står «bibliotek» for en mengde antistoff- eller antistofffragmentsekvenser (for eksempel polypeptidene ifølge oppfinnelsen) eller nukleinsyrene som koder for disse sekvensene, som har forskjeller i
 25 kombinasjonene av variantaminoasyrer som er innført i disse sekvensene etter framgangsmåtene ifølge oppfinnelsen.

[0063] «Bakteriofagvisning» er en metode der det vises variantpolypeptider som fusjonsproteiner med minst en del av kappeproteinet på overflaten av
 30 bakteriofagpartikler, f.eks. filamentøse bakteriofagpartikler. Bakteriofagvisning er nyttig fordi store bibliotek av randomiserte proteinvarianter kan sorteres raskt og enkelt på de sekvensene som binder et målantigen med høy affinitet. Visning av peptid- og proteinbibliotek på bakteriofag er brukt til å sortere ut polypeptider med spesifikke bindingsegenskaper blant millioner av polypeptider. Flerverdige
 35 bakteriofagvisningsmetoder har vært brukt til å vise små tilfeldige peptider og små proteiner ved å fusjonere dem til enten gen III eller gen VIII i den filamentøse bakteriofagen. Wells og Lowman (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.*

3:355–362, og referanser som siteres der. Ved enverdig bakteriofagvisning fusjoneres et protein- eller peptidbibliotek til en gen III ell en del av et og uttrykkes med lav konsentrasjon i nærvær av naturlig gen III-proteiner slik at bakteriofagpartikkelen viser enten én eller ingen kopier av fusjonsproteinene.

- 5 Aviditetsvirkningen reduseres sammenliknet med flerverdige bakteriofager slik at sorteringen er på grunnlag av ligandens egen affinitet, og det brukes fagemidvektorer slik at DNA-manipuleringen blir enklere. Lowman og Wells (1991) *Methods: A companion to Methods in Enzymology* 3:205–0216.

- 10 **[0064]** Et «fagemid» er en plasmidvektor med bakteriell replikeringsorigo, f.eks. ColE1, og en kopi av en intergenregion av en bakteriofag. Fagemidet kan brukes på alle kjente bakteriofager, blant annet filamentøse og lambdoide bakteriofager. Plasmidet vil også vanligvis inneholde en valgbar markør for antibiotikaresistens. Segmenter av DNA som klones inn i disse vektorene kan forplantes som
- 15 plasmider. Når celler med disse vektorene forsynes med alle gener de trenger for å produsere bakteriofagpartikler, forandrer replikeringsmåten for plasmidet seg til rullende sirkel-replikering slik at det lages kopier av én streng av plasmid-DNA-et og pakningsbakteriofagpartiklene. Fagemidet kan danne infiserende eller ikke-infiserende bakteriofagpartikler. Denne betegnelsen inkluderer fagemider som
- 20 inneholder et gen for bakteriofagkappeprotein eller et fragment av det, bundet til et heterologt polypeptidgen som en genfusjon slik at det heterologe peptidet vises på overflaten av bakteriofagpartikkelen.

- [0065]** Betegnelsen «bakteriofagvektor» betyr en tostrenget replikativ form av
- 25 en bakteriofag som inneholder et heterologt gen og kan replikere. Bakteriofagvektoren har en bakteriofagreplikeringsorigo som gjør det mulig å replikere bakteriofagen og danne bakteriofagpartikler. Det foretrekkes at bakteriofagen er en filamentøs bakteriofag, for eksempel en M13-, f1-, fd-, Pf3-bakteriofag eller avledet fra dem, eller en lambdoid bakteriofag, for eksempel
- 30 lambda, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434 osv. eller avledet fra dem.

- [0066]** Slik det brukes her står «løsningsmiddeltilgjengelig posisjon» for en posisjon for en aminosyrerest i de variable regionene av den tunge og lette kjeden til et kildeantistoff eller antigenbindende fragment som ut fra strukturen,
- 35 kombinasjonen av strukturer og/eller modellstruktur hos antistoff eller antigenbindende fragment, er bestemt å være potensielt tilgjengelig for løsningsmidler og/eller kontakt med et molekyl, for eksempel et antistoffspesifikt

antigen. Disse posisjonene finnes vanligvis i CDR og utenpå proteinet. De løsningsmiddeltilgjengelige posisjonene til et antistoff eller et antigenbindende fragment slik de defineres her, kan bestemmes med en av flere kjente algoritmer. Det foretrekkes å bestemme løsningsmiddeltilgjengelige posisjoner ved hjelp av koordinater fra en 3-dimensjonal modell av et antistoff, fortrinnsvis ved hjelp av et datamaskinprogram som for eksempel InsightII-programmet (Accelrys, San Diego, CA, USA). Løsningsmiddeltilgjengelige posisjoner kan også bestemmes med kjente algoritmer (f.eks. Lee and Richards (1971) J. Mol. Biol. 55, 379 og Connolly (1983) J. Appl. Cryst. 16, 548). De løsningsmiddeltilgjengelige posisjonene kan bestemmes med programvare som egner seg for proteinmodellering sammen med 3-dimensjonal strukturinformasjon fra et antistoff. Programvare til disse formålene er blant annet SYBYL Biopolymer Module (Tripos Associates). Hvis en algoritme (program) krever at brukeren oppgir en størrelsesparameter, settes «størrelsen» på en probe som brukes i beregningen generelt og fortrinnsvis til omtrent 1,4 ångstrøm eller mindre i radius. I tillegg er framgangsmåter for å bestemme løsningsmiddeltilgjengelige regioner og områder for datamaskiner beskrevet av Pacios (1994) Comput. Chem. 18(4): 377–386.

II. Detaljert beskrivelse

20

[0067] Komplementet spiller en viktig rolle i kroppens forsvar og sammen med andre deler av immunsystemet beskytter det individet mot patogener som invaderer kroppen. Men hvis det ikke aktiveres eller kontrolleres riktig, kan komplementet også skade vertens vev. Feil aktivering av komplementet er involvert i patogenesen av forskjellige sykdommer, som kan kalles komplementforbundne sykdommer, for eksempel immunkomplekssykdommer eller autoimmunsykdommer og forskjellige inflammasjonstilstander, blant annet komplementformidlede inflammatoriske vevsforandringer. Patologien ved komplementforbundne sykdommer er variert og kan innebære komplementaktivering i lengre eller kortere tid, aktivering av hele kaskaden, bare én av kaskadene (f.eks. den klassiske eller alternative prosessen), bare noen deler av kaskaden osv. Ved noen sykdommer gir de biologiske aktivitetene til fragmenter av komplementet vevsskader og sykdom. Derfor har komplementhemmere stort terapeutisk potensiale. Selektive hemmere av den alternative prosessen ville vært spesielt nyttige fordi utskillingen av patogener og andre organismer fra blodet gjennom den klassiske prosessen ville vært intakt.

- [0068]** Faktor D-antagonistene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan brukes til å forebygge og behandle komplementforbundne øyelidelser (alle øyesykdommer der patologien involverer komplementet, inkludert den klassiske og den alternative prosessen, og spesielt den alternative prosessen til komplementet), som for eksempel makuladegenerasjonssykdommer, som alle stadier av aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD), inkludert tørr og våt (ikke-eksudativ og eksudativ) form, koroidal neovaskularisering (CNV), uveitt, diabetisk og annen iskemirelatert retinopati, endoftalmitt og andre intraokulære neovaskulære sykdommer som diabetisk makulødem, patologisk myopi, von Hippel-Lindaus sykdom, øyehistoplasmose, sentral netthinneveneokklusjon (CRVO), hornhinneneovaskularisering og netthinneneovaskularisering. En foretrukket gruppe av komplementforbundne øyelidelser er aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD), inkludert ikke-eksudativ (våt) og eksudativ (tørr eller atrofisk) AMD, koroidal neovaskularisering (CNV), diabetisk retinopati (DR) og endoftalmitt.
- [0069]** AMD er aldersrelatert degenerering av makula og den vanligste årsaken til varig synssvekkelse hos individer over 60 år. Det er to typer AMD, den ikke-eksudative (tørre) og den eksudative (våte) AMD. Den tørre eller ikke-eksudative formen innebærer atrofiske og hypertrofiske forandringer i netthinnepigmentepitelet (RPE) under den sentrale netthinnen (makula) og avleiringer (druser) på RPE. Pasienter med ikke-eksudativ AMD kan utvikle den våte eller eksudative formen for AMD der unormale blodårer som kalles koroidale neovaskulære membraner (CNVM) utvikler seg under netthinnen, lekker væske og blod og etter hvert danner et blindende skiveformet arr under netthinnen.
- Ikke-eksudativ AMD, som vanligvis er en forløper for eksudativ AMD, er den vanligste. Den ikke-eksudative AMD viser seg ulikt: harde druser, bløte druser, geografisk RPE-atrofi og pigmentklumper kan være til stede. Tidlig under AMD avleires komponenter av komplementet, hovedbestanddelen av drusene, på RPE.
- [0070]** Den foreliggende oppfinnelsen dreier seg spesielt om å behandle høyrisiko-AMD, inkludert AMD kategori 3 og kategori 4. AMD kategori 3 er karakterisert ved at det ikke er framskreden AMD i begge øynene, ved at minst ett høye har synsskarphet på 20/32 eller bedre og med minst én stor druse (f.eks. 125 µm), mange (målt ut fra drusearealet) mellomstore druser, eller geografisk atrofi (GA) som ikke involverer senteret av makula, eller enhver kombinasjon av disse. AMD av kategori 3 (som fortsatt betraktes som «tørr» AMD) har høy risiko for overgang til koroidal neovaskularisering (CNV).

[0071] Høyrisiko-AMD av kategori 4 (klassifisert som «våt» AMD) er karakterisert ved synsskarphet på 20/32 eller bedre og ingen framskreden AMD (GA som involverer senteret av makula eller koroidale neovaskulariseringstrekk) i indeksøyet.

- 5 Ledsagerøyet er karakterisert ved framskreden AMD eller synsskarphet under 20/32 som kan tilskrives AMD-makulopati. Vanligvis utvikler ubehandlet høyrisiko-AMD seg raskt til koroidal neovaskularisering (CNV) med 10–30 ganger så høy hastighet som progresjonshastigheten for AMD av kategori 1 eller 2 (ikke høy risiko).

- 10 **[0072]** Faktor D-antagonister er spesielt nyttige til å hindre progresjonen av AMD (spesielt av kategori 3 eller 4) til CNV, og/eller forebygge utviklingen/progresjonen av AMD eller CNV i et friskt eller mindre påvirket ledsagerøye. I denne sammenhengen brukes betegnelsen «forebygging» i sin videste forstand slik at det inkluderer full eller delvis blokkering og sinking av
- 15 progresjonen til sykdommen samt forsinket utbrudd av den mer alvorlige formen av sykdommen. Pasienter med høy risiko for å utvikle høyrisiko-AMD (kategori 4) eller CNV har spesielt stor fordel av dette aspektet av oppfinnelsen.

- [0073]** Det er kjent at polymorfisme i komplementfaktor H (CFH) er forbundet
- 20 med risiko for at et individ skal utvikle AMD og/eller CNV. Mutasjoner i CFH kan aktivere komplementet, som i sin tur kan føre til AMD/CNV. Det er nylig rapportert at polymorfisme i komplementfaktor H (CHF) står for 50 % av den påvisbare risikoen for AMD (Klein m.fl., Science 308:385–9 (2005)). Man har funnet ut at en vanlig haplotype i CFH (HF1/CFH) disponerer individer for aldersrelatert
- 25 makuladegenerasjon (Hageman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102(2):7227–7232 (2005)). AMD er skilt ut som et autosomt-dominant trekk, og lokus for sykdommen kan kartlegges til kromosom 1q25-q31 mellom markørene D1S466 og D1S413, med høyeste lodetall på rundt 3,20 (Klein m.fl., Arch Ophthalmol. 116(8):1082–9 (1998), Majewski m.fl., Am. J. Hum. Genet. 73(3):540–50 (2003),
- 30 Seddon m.fl., Am. J. Hum. Genet. 73(4):780–90 (2003), Weeks m.fl., Am. J. Ophthalmol. 132(5):682–92 (2001); Iyengar m.fl., Am. J. Hum. Genet. 74(1):20–39 (2004)); kromosom 2q3/2q32 mellom markørene D12S1391 og D2S1384, med høyeste lodetall på 2,32/2,03 (Seddon m.fl., *ovenfor*); 3p13, mellom markørene D12S1300 og D12S1763, med høyeste lodetall på 2,19 (Majewski m.fl., *ovenfor*;
- 35 Schick m.fl., Am. J. Hum. Genet. 72(6):1412–24 (2003)); 6q14 mellom markørene D6S1056 og DS249 med høyeste lodetall på 3,59/3,17 (Kniazeva m.fl., Am. J. Ophthalmol. 130(2):197–202 (2000)); 9q33, på markøren D9S934, med

høyeste lodetall på 2,06 (Mejwski m.fl., *ovenfor*); 10q26 på markøren D10S1230, med høyeste lodetall på 3,06 (Majewski m.fl., *ovenfor*; Iyengar m.fl., *ovenfor*; Kenealy m.fl., Mol. Vis. 10:57–61 (2004); 17q25 på markøren D17S928, høyeste lodetall 3,16 (Weeks m.fl., *ovenfor*) og 22q12 på markøren D22S1045, høyeste lodetall 2,0 (Seddon m.fl., *ovenfor*). Altså er genetisk utsortering en viktig del av oppgaven med å identifisere pasienter som er spesielt gode kandidater for forebyggende behandling, inkludert forebygging av progresjonen av sykdommen til en mer alvorlig form, som fra AMD til CNV.

10 **1. Antistoffer mot faktor D**

[0074] Oppfinnelsen her inkluderer produksjon og bruk av antistoffer mot faktor D. Eksempler på framgangsmåter for å lage antistoffer beskrives nærmere i avsnittene nedenfor.

15

[0075] Antistoffer mot faktor D velges ved hjelp av et faktor D-antigen fra en pattedyrart. Det foretrekkes at antigenet er human faktor D. Men faktor D fra andre arter som f.eks. murin faktor D kan også brukes som målantigen. Faktor D-antigenene fra forskjellige pattedyrarter kan isoleres fra naturlige kilder. I andre utførelsesformer produseres antigenet rekombinant eller lages ved andre, kjente syntetiske framgangsmåter.

20

[0076] Det valgte antistoffet vil normalt ha sterk nok bindingsaffinitet for faktor D-antigenet. For eksempel kan antistoffet binde human faktor D med en K_d på ikke over omtrent 5 nM, fortrinnsvis ikke over omtrent 2 nM og mer foretrukket ikke over omtrent 500 pM. Antistoffaffinitet kan bestemmes med en analyse basert på overflateplasmonresonans (f.eks. BIAcore-analysen som beskrives i eksemplene), enzymbundet immunabsorbentanalyse (ELISA) og konkurranseanalyser (f.eks. RIA), for eksempel.

30

[0077] Også andre biologiske aktivitetsanalyser kan brukes på antistoffet, f.eks. for å evaluere effektiviteten som legemiddel. Slike analyser er kjente i faget og avhenger av målantigenet og hva antistoffet skal brukes til. Eksempler er HUVEC hemmeanalyse (som beskrives i eksemplene nedenfor), svulstcellehemmeanalyse (som beskrives i WO 89/06692, for eksempel); antistoffavhengig cellegiftighetsanalyse (ADCC) og komplement formidlet

35

cellegiftighetsanalyse (CDC) (US Patent 5,500,362) og *in vitro*- og *in vivo*-analyser som beskrives nedenfor for å identifisere faktor D-antagonister.

5 **[0078]** For å sortere ut antistoffer som binder en bestemt epitop på det aktuelle antigenet kan det utføres en rutinemessig kryssblokkeringsanalyse i likhet med den som beskrives i *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow og David Lane (1988). Alternativt kan det utføres epitopkartlegging, *f.eks.* som beskrevet i Champe m.fl. (1985) *J. Biol. Chem.* 270:1388-1394, for å bestemme om antistoffet binder en interessant epitop.

10

15 **[0079]** I en foretrukket utførelsesform velges antistoffene mot faktor D med en unik tilnærming til bakteriofagvisning. Tilnærmingen innebærer å lage syntetiske antistoffbakteriofagbibliotek som bygger på enkelte rammemaler, utforme tilstrekkelig variasjon i de variable domenene, vise polypeptider med de varierte variable domenene, velge kandidatantistoffer med høy affinitet for faktor D-antigenmålet og isolere de valgte antistoffene.

20 **[0080]** Nærmere opplysninger om bakteriofagmetodene kan fås for eksempel i WO03/102157 publisert den 11. desember 2003.

20

25 **[0081]** I ett aspekt kan antistoffbibliotekene lages ved å mutere løsningsmiddeltilgjengelige og/eller sterkt varierte posisjoner i minst én CDR i det variable domenet til et antistoff. Noen av CDR-ene eller alle kan muteres med framgangsmåtene som tilveiebringes her. I noen utførelsesformer kan det være å foretrekke å lage varierte antistoffbibliotek ved å mutere posisjoner i CDRH1, CDRH2 og CDRH3 for å lage et enkelt bibliotek eller ved å mutere posisjoner i CDRL3 og CDRH3 for å lage et enkelt bibliotek eller ved å mutere posisjoner i CDRL3 og CDRH1, CDRH2 og CDRH3 for å lage et enkelt bibliotek.

30 **[0082]** Et bibliotek av variable antistoffdomener kan for eksempel lages ved å ha mutasjoner i de løsningsmiddeltilgjengelige og/eller sterkt varierte posisjonene i CDRH1, CDRH2 og CDRH3. Et annet bibliotek kan lages ved å ha mutasjoner i CDRL1, CDRL2 og CDRL3. Disse bibliotekene kan også brukes sammen for å lage bindere med ønsket affinitet. Etter én eller flere runder med valg av tungkjedebibliotek for binding til et målantigen kan for eksempel et lett kjedebibliotek byttes inn i populasjonen av tunge bindere i flere valgrunder for å øke affiniteten til binderne.

35

[0083] Det foretrekkes å lage et bibliotek ved å bytte ut opprinnelige aminosyrer med variantamino-syrer i CDRH3-regionen av den variable regionen i sekvensen til den tunge kjeden. Det lagde biblioteket kan inneholde flere
5 antistoffsekvenser der sekvensvariasjonen hovedsakelig er i CDRH3-regionen av sekvensen til den tunge kjeden.

[0084] I ett aspekt lages biblioteket i sammenheng med 4D5-sekvensen til det humaniserte antistoffet, eller sekvensen til rammeamino-syrer i den humaniserte 4D5-sekvensen. Det foretrekkes å lage biblioteket ved å bytte ut
10 minst rest 95–100a i den tunge kjeden med aminosyrer som *DVK*-kodonsettet koder for, idet *DVK*-kodonsettet brukes til å kode for et sett av variantamino-syrer for alle disse posisjonene. Et eksempel på et oligonukleotidsett som kan brukes til å lage disse utskiftingene omfatter
15 sekvensen (*DVK*)₇. I noen utførelsesformer lages det et bibliotek ved å bytte ut rest 95–100a med aminosyrer som kodes for av både *DVK*- og *NNK*-kodonsettet. Et eksempel på et oligonukleotidsett som kan brukes til å lage disse utskiftingene omfatter sekvensen (*DVK*)₆(*NNK*). I en annen utførelsesform lages det et bibliotek ved å bytte ut minst rest 95–100a med
20 aminosyrer som kodes for av både *DVK*- og *NNK*-kodonsettet. Et eksempel på et oligonukleotidsett som kan brukes til å lage disse utskiftingene omfatter sekvensen (*DVK*)₅(*NNK*). Et annet eksempel på et oligonukleotidsett som kan brukes til å lage disse substitusjonene omfatter sekvensen (*NNK*)₆. Andre eksempler på egnede oligonukleotidsekvenser kan bestemmes av en fagperson
25 etter kriteriene som beskrives her.

[0085] I en annen utførelsesform brukes forskjellige CDRH3-utforminger til å isolere bindere med høy affinitet og bindere for forskjellig epitoper. Utvalget av lengder for CDRH3 som lages i dette biblioteket er 11 til 13 aminosyrer, men det
30 kan også lages andre lengder enn dette. H3-variasjonen kan utvides ved å bruke kodonsettene *NNK*, *DVK* og *NVK* og mer begrenset variasjon i N- og/eller C-enden.

[0086] Det kan også lages variasjon i CDRH1 og CDRH2. Utformingen av CDR-H1- og H2-variasjonen følger strategien som har som mål å imitere naturlige
35 antistoffer som beskrevet med modifisering som fokuserer variasjonen nærmere den naturlige variasjonen enn tidligere utforminger.

- [0087]** For variasjon i CDRH3 kan det bygges mange bibliotek med forskjellig H3-lengde som så kombineres for å velge bindere til målantigener. De mange bibliotekene kan slås sammen og sorteres ved hjelp av framgangsmåter med utvalg på fast underlag og sortering i løsning som beskrevet før og nedenfor i dette dokumentet. Det kan brukes mange sorteringsstrategier. For eksempel involverer én variasjon å sortere på mål bundet til et fast stoff og så sortere på en merking som kan finnes på fusjonspolypeptidet (f.eks. anti-gD-merking) og deretter en annen sortering på mål bundet til det faste stoffet. Alternativt kan bibliotekene sorteres først på mål bundet til en fast flate, så sorteres de eluerte binderne ved binding i løsningsfase med synkende konsentrasjon av målantigen. Ved å bruke kombinasjoner av forskjellige sorteringsmetoder kan utvelgelsen av bare høyt uttrykte sekvenser reduseres til et minimum, og det gjør det mulig å velge flere forskjellige kloner med høy affinitet.
- [0088]** Bindere med høy affinitet for målet faktor D-antigen kan isoleres fra bibliotekene. Hvis variasjonen i H1/H2-regionen begrenses, reduseres degenerasjonen omtrent 10^4 - til 10^5 -dobbelt og hvis det tillates mer H3-variasjon gir det bindere med høyere affinitet. Ved å bruke bibliotek med forskjellige typer variasjon i CDRH3 (f.eks. ved hjelp av DVK eller HVT) kan det isoleres bindere som kan bindes til forskjellige epitoper i et målantigen.
- [0089]** I en annen utførelsesform lages det ett eller flere bibliotek med variasjon i CDRH1-, CDRH2- og CDRH3-regionene. I denne utførelsesformen lages det variasjon i CDRH3 ved hjelp av H3-regioner av forskjellig lengde og de primære kodonsettene *XYZ* og *NNK* eller *NNS*. Det kan lages bibliotek ved hjelp av individuelle oligonukleotider som slås sammen, eller oligonukleotidene kan selv slås sammen til en undergruppe av bibliotek. Bibliotekene i denne utførelsesformen kan sorteres mot mål bundet til fast stoff. Kloner som isoleres fra mange sorteringer kan sorteres ut på spesifisitet og affinitet ved hjelp av ELISA-analyser. Når det gjelder spesifisiteten kan klonene velges ut mot de ønskede målantigenene og andre antigener som ikke er mål. Disse binderne til mål-NRP1-antigenet kan så sorteres ut på affinitet i en ELISA-analyse med bindingskonkurranse i løsning eller flekkkonkurranseanalyse. Bindere med høy affinitet kan isoleres fra biblioteket ved hjelp av kodonsettene *XYZ* som framstilles som beskrevet ovenfor. Disse binderne er enkle å produsere som antistoffer eller antigenbindende fragmenter med høyt utbytte i cellekultur.

[0090] I noen utførelsesformer kan det være ønskelig å lage bibliotek med større variasjon i lengden av CDRH3-regionen. For eksempel kan det være ønskelig å lage bibliotek med CDRH3-regioner som varierer mellom 7 og 19 aminosyrer.

- 5 **[0091]** Bindere med høy affinitet som isoleres fra bibliotekene i disse utførelsesformene er enkle å produsere i bakterie- og eukaryotcellekulturer med høyt utbytte. Vektorene kan utformes slik at det er lett å fjerne sekvenser som gD-merking, viruskappeproteinsekvenser, og/eller legge til konstant region-sekvenser for produksjon av antistoff i full lengde eller antigenbindende
10 fragmenter med høyt utbytte.

- [0092]** Et bibliotek med mutasjoner i CDRH3 kan kombineres med et bibliotek som inneholder variantversjoner av andre CDR, for eksempel CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1 og/eller CDRH2. For eksempel kombineres et CDRH3-bibliotek i
15 én utførelsesform med et CDRL3-bibliotek lagd i sammenheng med den humaniserte 4D5-antistoffsekvensen med variantaminozyrer i posisjon 28, 29, 30, 31 og/eller 32 ved hjelp av forhåndsbestemte kodonsett. I en annen utførelsesform kan et bibliotek med mutasjoner i CDRH3, kombineres med et bibliotek som omfatter de variable tungkjededomenene CDRH1 og/eller CDRH2
20 med varianter. I én utførelsesform lages CDRH1-biblioteket med den humaniserte 4D5-antistoffsekvensen med variantaminozyrer i posisjon 28, 30, 31, 32 og 33. Det kan lages et CDRH2-bibliotek med sekvensen til det humaniserte antistoffet 4D5 med variantaminozyrer i posisjon 50, 52, 53, 54, 56 og 58 ved hjelp av de forhåndsbestemte kodonsettene.

25

- [0093]** Antistoffet mot faktor D som dannes fra bakteriofagbibliotek, kan modifiseres videre for å lage antistoffmutanter med bedre fysiske, kjemiske og/eller biologiske egenskaper enn opphavsantistoffet. Hvis analysen som brukes er en analyse av biologisk aktivitet, har antistoffmutanten fortrinnsvis
30 en biologisk aktivitet i den valgte analysen som er minst omtrent 10 ganger så høy, fortrinnsvis minst omtrent 20 ganger så høy, mer foretrukket minst omtrent 50 ganger så høy og noen ganger minst omtrent 100 ganger eller 200 ganger så høy som den biologiske aktiviteten til opphavsantistoffet etter den analysen. For eksempel har et mutantantistoff mot faktor D fortrinnsvis en
35 bindingsaffinitet for NRP som er minst omtrent 10 ganger så sterk, fortrinnsvis minst omtrent 20 ganger så sterk, mer foretrukket minst omtrent 50 ganger så sterk og noen ganger minst omtrent 100 ganger eller 200 ganger så sterk som

bindingsaffiniteten til opphavsantistoffet mot faktor D, for eksempel hvilke som helst av antistoffene på figur 5, spesielt antistoff 20D12.

[0094] For å lage antistoffmutanten innføres én eller flere aminosyreforandringer (f.eks. bytte ut aminosyrer) i én eller flere av de hypervariable regionene av opphavsantistoffet. Alternativt eller i tillegg kan det innføres én eller flere forandringer (f.eks. utskiftninger) i rammeregionrester i opphavsantistoffet hvis de gir forbedringer i bindingsaffiniteten til antistoffmutanten for antigenet fra den andre pattedyrarten. Eksempler på rammeregionrester å modifisere inkluderer slike som direkte binder antigen ikke-kovalent (Amit m.fl. (1986) Science 233:747–753), interagerer med/påvirker konformasjonen av en CDR (Chothia m.fl. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917) og/eller deltar i V_L - V_H -grensesnittet (EP 239 400B1). I visse utførelsesformer fører modifisering av en eller flere slike rammeregionrester til at bindingsaffiniteten til antistoffet for antigenet fra den andre pattedyrarten øker. For eksempel kan det forandres fra omtrent én til omtrent fem rammerester i denne utførelsesformen av oppfinnelsen. Noen ganger kan dette være tilstrekkelig for å gi en antistoffmutant som egner seg til bruk i prekliniske forsøk, også hvis ingen av restene i de hypervariable regionene er forandret. Men normalt vil antistoffmutanten omfatte en eller flere ytterligere forandringer i hypervariable regioner.

20

[0095] Restene i hypervariable regioner som forandres kan forandres tilfeldig, spesielt hvis den opprinnelige bindingsaffiniteten til opphavsantistoffet er slik at det er enkelt å sortere ut antistoffmutanter som produseres tilfeldig.

[0096] En nyttig framgangsmåte for å lage slike antistoffmutanter kalles «mutagenese med alaninskanning» (Cunningham og Wells (1989) Science 244:1081–1085). Her byttes en eller flere av restene i hypervariable regioner ut med alanin- eller polyalaninrest(er) for å påvirke interaksjonen mellom aminosyrene og antigenet fra den andre pattedyrarten. Så blir de(n) resten(e) fra hypervariable regioner som viser funksjonell følsomhet for bytte av aminosyrerester raffinert å innføre flere eller andre mutasjoner i eller for utskiftingsstedene. Selv om posisjonen der det innføres en aminosyresekvensvariasjon er forhåndsbestemt, trenger ikke typen mutasjon i seg selv å være det. Ala-mutantene som lages på denne måten sorteres ut på biologisk aktivitet som beskrevet i dette dokumentet.

35

[0097] Normalt vil man begynne med å bytte konservativt, for eksempel som vist nedenfor under overskriften «foretrukne utskiftninger». Hvis slike endringer

gir forandringer i den biologiske aktiviteten (f.eks. bindingsaffinitet), innføres mer omfattende endringer som kalles «eksempelendring» i tabellen nedenfor, eller som beskrevet nærmere nedenfor i forbindelse med aminosyreklasser, og produktene sorteres ut. Foretrukne utskiftninger er framstilt i tabellen nedenfor.

Opprinnelig rest	Eksempler på utskiftninger	Foretrukne utskiftninger
Ala (A)	val, leu, ile	val
Arg (R)	lys, gin, asn	lys
Asn (N)	gln, his, lys, arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro, ala	ala
His (H)	asn, gln, lys, arg	arg
Ile (I)	leu, val, met, ala, phe, norleucin	leu
Leu (L)	norleucin, ile, val, met, ala, phe	ile
Lys (K)	arg, gln, asn	arg
Met (M)	leu, phe, ile	leu
Phe (F)	leu, val, ile, ala, tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	try, phe	tyr
Tyr (Y)	trp, phe, thr, ser	phe
Val (V)	ile, leu, met, phe, ala, norleucin	leu

5

[0098] Enda mer vesentlige modifikasjoner i de biologiske egenskapene til antistoffene oppnås ved å velge utskiftninger som har vesentlig forskjellig virkning i å opprettholde (a) strukturen til polypeptidryggraden i området for utskiftningen, for eksempel som en blad- eller spiralkonformasjon, (b) ladningen eller

hydrofobien til molekylet i målposisjonen, eller (c) omfanget til sidegrenen. De naturlige aminosyrene er delt i grupper ut fra de vanlige sidegreinegenskapene:

- (1) hydrofobe: norleucin, met, ala, val, leu, ile,
- (2) nøytrale hydrofile: cys, ser, thr, asn, gin,
- 5 (3) sure: asp, glu,
- (4) basiske: his, lys, ar,
- (5) aminosyrer som påvirker kjedeorienteringen: gly, pro, og
- (6) aromatiske: trp, tyr, phe.

- 10 **[0099]** Ikke-konservative utskiftninger vill innebære å bytte ut et medlem av en av disse klassene med et medlem av en annen klasse.

[0100] I en annen utførelsesform blir posisjonene som velges for modifisering affinitetsmodnet ved hjelp av bakteriofagvisning (se ovenfor).

15

[0101] Nukleinsyremolekyler som koder for aminosyresekvensmutanter framstilles ved en rekke kjente framgangsmåter. Disse framgangsmåtene inkluderer, men er ikke innskrenket til, oligonukleotidformidlet (eller posisjonsrettet) mutagenese, PCR-mutagenese og kassettmutagenese av en tidligere framstilt mutert eller ikke-mutert versjon av opphavsantistoffet. Den foretrukne framgangsmåten for å lage mutanter er posisjonsrettet mutagenese (se f.eks., Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488).

20

[0102] I visse utførelsesformer vil antistoffmutanten bare ha en enkelt aminosyre skiftet ut i den hypervariable regionen. I andre utførelsesformer vil to eller flere av aminosyrene i den hypervariable regionen til opphavsantistoffet være skiftet ut, f.eks. fra omtrent to til omtrent ti utskiftninger i den hypervariable regionen.

25

[0103] Vanligvis vil antistoffmutanten med forbedrede biologiske egenskaper ha en aminosyresekvens som er minst 75 % sekvensidentisk eller liknende aminosyresekvensen til enten det tunge eller lette variable domenet til det artsavhengige antistoffet, fortrinnsvis minst 80 %, mer foretrukket minst 85 %, mer foretrukket minst 90 % og mest foretrukket minst 95 %. Identisk eller liknende denne sekvensen defineres her som prosentandelen av aminosyrerester i kandidatsekvensen som er identisk med (dvs. samme rest) eller likner (dvs. aminosyrerest fra samme gruppe inndelt etter felles sidegreinegenskaper, se ovenfor) restene i opphavsantistoffet etter at sekvensene er sammenstilt og det

30

35

er innført åpninger hvis det er nødvendig for å oppnå høyest mulig prosentvis sekvensidentitet. Det skal ikke oppfattes slik at noen av forlengelsene, delesjonene eller insersjonene i N-enden, C-enden eller midt i antistoffsekvensen utenfor det variable domenet påvirker sekvensidentiteten eller likhetsgraden.

5

[0104] Etter at antistoffmutanten er produsert, bestemmes den biologiske aktiviteten til molekylet i forhold til opphavsantistoffet. Som nevnt kan dette innebære å bestemme bindingsaffiniteten og/eller andre biologiske aktiviteter hos antistoffet. I en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen lages det til et panel av antistoffmutanter som sorteres ut på bindingsaffinitet til antigenet, som NRP1 eller et fragment av NRP1. Én eller flere av antistoffmutantene som velges i denne første utsorteringen gjennomgår eventuelt én eller flere andre analyser på biologisk aktivitet for å bekrefte at antistoffmutant(ene) med økt bindingsaffinitet faktisk kan brukes, f.eks. til prekliniske studier.

15

[0105] Antistoffmutanten som velges ut på denne måten kan modifiseres videre, som oftest på grunnlag av hva antistoffet skal brukes til. Slik modifisering kan innebære å endre aminosyresekvensen ytterligere, å fusjonere den med ett eller flere heterologe polypeptider og/eller kovalente modifikasjoner lik de som beskrives nedenfor. Eksempler på endringer i aminosyresekvensen er utdypet ovenfor. For eksempel kan alle cysteinrester som ikke er involvert i å opprettholde den korrekte konformasjonen til antistoffmutanten også skiftes ut, vanligvis med serin, for å forbedre oksidasjonsstabiliteten til molekylet og hindre feilaktig fornetting. På den annen siden kan det tilføyes cysteinbindinger til antistoffet for å forbedre stabiliteten (spesielt hvis antistoffet er et antistofffragment, for eksempel et Fv-fragment). En annen type aminosyremutant har et endret glykosyleringsmønster. Dette kan oppnås ved å fjerne én eller flere karbohydratgrupper i antistoffet, og/eller legge til ett eller flere glykosylerings seter som ikke finnes i antistoffet. Glykosyleringen av antistoffer er vanligvis enten N-koblet eller O-koblet. N-koblet betyr at karbohydratgruppen er festet til sidekjeden til en asparaginrest. Tripeptidsekvensene asparagin-X-serin og asparagin-X-treonin, der X er enhver aminosyre unntatt prolin, er gjenkjenningssekvensene for den enzymatiske bindingen av karbohydratgruppen til asparaginsidekjeden. Hvis den ene eller begge av disse tripeptidsekvensene finnes i et polypeptid, danner de et mulig glykosylerings sete. O-koblet glykosylering betyr at én av sukkerartene N-acetylgalaktosamin, galaktose eller xylose festes til en hydroksyaminosyre, vanligvis serin eller treonin, men 5-hydroksyprolin og 5-hydroksylysin kan også brukes. Det

35

er praktisk å tilføye glykosylerings seter til antistoffet ved å forandre aminosyresekvensen slik at den inneholder én eller flere av de ovennevnte tripeptidsekvensene (for N-koblede glykosylerings seter). Forandringen kan også gjøres ved å legge til eller skifte ut med en eller flere serin- eller treoninrester i

5 sekvensen til det opprinnelige antistoffet (for O-koblede glykosylerings seter).

[0106] Antistoffene mot faktor D ifølge oppfinnelsen kan produseres rekombinant med metoder og materialer som det er lett å anskaffe.

10 **[0107]** For rekombinant produksjon av et antistoff mot faktor D isoleres nukleinsyren som koder for det og settes inn i en replikerbar vektor for videre kloning (amplifisering av DNA-et) eller uttrykking. DNA som koder for antistoffet er lett å isolere og sekvensere med konvensjonelle prosedyrer (f.eks. ved hjelp av oligonukleotidprober som kan bindes spesifikt til DNA som koder for den

15 tunge og lette kjeden til antistoffet). Mange vektorer er tilgjengelig. Vektorkomponentene inkluderer vanligvis, men er ikke innskrenket til, en eller flere av følgende: signalsekvens, replikeringsorigo, markørgener, forøkerelement, promotor og transkriberingssluttsekvens.

20 **(i) Signalsekvenskomponent**

[0108] Antistoffet ifølge denne oppfinnelsen kan produseres rekombinant ikke bare direkte, men som et polypeptid fusjonert med et heterologt polypeptid, som fortrinnsvis er en signalsekvens eller et annet polypeptid med en spesifikk

25 spaltingsposisjon ved N-enden av det modne proteinet eller polypeptidet. Den valgte heterologe signalsekvensen er fortrinnsvis en som gjenkjennes og bearbeides (dvs. spaltes med en signalpeptidase) av vertscellen. For prokaryote vertsceller som ikke gjenkjenner eller bearbeider den naturlige antistoffsignalsekvensen erstattes signalsekvensen med en prokaryot signalsekvens som for eksempel er valgt fra

30 gruppen alkalisk fosfatase, penicillinase, lpp eller varmestabile entrotoksin II-ledere. For gjærceleutskilling kan den naturlige signalsekvensen erstattes f.eks. med gjærintvertaselederen, α -faktorleder (inkludert α -faktor fra *Saccharomyces* og *Kluyveromyces*) eller sur fosfataseleder, glukaoamylaselederen fra *C. albicans*, eller signalet som beskrives i WO 90/13646. For uttrykking i pattedyrceller er det

35 tilgjengelig både pattedyrsignalsekvenser og virussekresjonsledere, for eksempel herpes simplex gD-signalet. DNA-et for en slik forløperregion bindes sammen til DNA som koder for antistoffet i leserammen.

(ii) Replikeringsorigokomponenten

[0109] Både uttrykings- og kloningsvektorer inneholder en nukleinsyresekvens som gjør vektoren i stand til å replikere i en eller flere valgte vertsceller. I kloningsvektorer er dette generelt en sekvens som gjør det mulig for vektoren å replikere uavhengig av vertens kromosomale DNA, og den inneholder replikeringsorigoer eller autonomt replikerende sekvenser. Slike sekvenser er velkjente fra flere bakterier, gjærarter og virus. Replikeringsorigoen fra plasmidet pBR322 egner seg for de fleste Gram-negative bakteriene, 2 μ -plasmidorigoen egner seg for gjær og forskjellige virusorigoer (SV40, polyom, adenovirus, VSV eller BPV) kan brukes som kloningsvektorer i pattedyrceller. Generelt er det ikke behov for replikeringsorigo til pattedyruttrykingsvektorer (SV40-origoet kan vanligvis bare brukes fordi det inneholder den tidlige promotoren).

(iii) Seleksjonsgenkomponenten

[0110] Uttrykings- og kloningsvektorer kan inneholde et seleksjonsgen, også kalt en selekterbar markør. Typiske seleksjonsgener koder for proteiner som (a) gir resistens mot antibiotika eller andre gifter, *f.eks.* ampicillin, neomycin, metotreksat eller tetrasyklin, (b) komplementerer auksotrofe mangler, eller (c) tilveiebringer kritiske næringsstoffer som ikke fås fra komplekse medier, *f.eks.* genet som koder for D-alaninrasemase for basiller.

[0111] Ett eksempel på et seleksjonsskjema går ut på å bruke et legemiddel for å stoppe veksten til en vertscelle. De cellene som er vellykket omdannet med et heterologt gen, produserer et protein som gir legemiddelresistens og overlever dermed seleksjonsregimet. Eksempler på slik dominant seleksjon er å bruke legemidlene neomycin, mykofenolsyre og hydromycin.

[0112] Et annet eksempel på egnede selekterbare markører for pattedyrceller er slike som gjør det mulig å identifisere celler som er kompetente til å ta opp nukleinsyren til antistoffet, for eksempel DHFR, tymidinkinase, metallotionein-I og -II, fortrinnsvis metallotioneingener fra primater, adenosindeaminase, ornitindekarboksylase osv.

[0113] For eksempel identifiseres celler som er omdannet med DHFR-seleksjonsgenet først ved å dyrke alle transformantene i et dyrkingsmedium som inneholder metotreksat (Mtx), en konkurranseantagonist mot DHFR. En passende vertscelle når man bruker naturlig DHFR, er eggstokkceller fra kinesisk dverghamster (CHO) som har mangelfull DHFR-aktivitet.

[0114] Alternativt kan vertsceller (spesielt naturlige vertsceller som inneholder endogent DHFR) transformert eller samtransformert med DNA-sekvenser som koder for antistoff, naturlig DHFR-protein og en annen selekterbar markør som aminoglykosid-3'-fosfotransferase (APH) velges ved å dyrke cellene i medium som inneholder et seleksjonsmiddel for den selekterbare markøren, som et aminoglykosidisk antibiotikum, f.eks. kanamycin, neomycin eller G418. Se U.S. Patent No. 4,965,199.

[0115] Et passende seleksjonsgen til bruk i gjærceller er *trp1*-genet som finnes i gjærplasmidet YRp7 (Stinchcomb m.fl. (1979) Nature 282:39). Dette *trp1*-genet utgjør en seleksjonsmarkør for en mutantstamme av gjær som ikke har evnen til å vokse i tryptofan, for eksempel ATCC-nr. 44076 eller PEP4-1. Jones (1977) Genetics 85:12. Da gir nærværet av *trp1*-lesjonen i genomet til gjærcelleverten et effektivt miljø for å detektere transformering ved vekst i fravær av tryptofan. Tilsvarende har *Leu2*-manglende gjærstammer (ATCC 20 622 eller 38 626) tilsvarende plasmider som har *Leu2*-genet.

[0116] I tillegg kan vektorer som stammer fra det 1,6 µm sirkulære plasmidet pKD1 brukes til å transformere *Kluyveromyces*-gjærarter. Alternativt finnes det et uttrykkingsystem for storskalaproduksjon av rekombinant kalvekymosin som er rapportert for *K. lactis*. Van den Berg (1990) Bio/Technology 8:135. Det er også bekjentgjort stabile flerkopiuttrykkingsvektorer for utskilling av modent rekombinant humant serumalbumin med industrielle stammer av *Kluyveromyces*. Fleer m.fl. (1991) Bio/Technology 9:968–975.

(iv) Promotorkomponent

[0117] Uttrykkings- og kloningsvektorer inneholder vanligvis en promotor som vertsorganismen kjenner igjen og som er operativt forbundet med nukleinsyren i antistoffet. Promotorer som egner seg til bruk med prokaryote verter er *phoA*-promotoren, β-laktamase- og laktosepromotorsystemene, alkalisk fosfatase, et

tryptofanpromotorsystem (trp) og hybridpromotorer som tac-promotoren. Men også andre kjente bakteriepromotorer egner seg. Promotorer til bruk i bakteriesystemer vil også inneholde en Shine-Dalgarno-sekvens (S.D.) operativt forbundet med DNA-et som koder for antistoffet.

5

[0118] Det er kjent promotorsekvenser for eukaryoter. Så å si alle eukaryotgener har en AT-rik region som befinner seg omtrent 25 til 30 baser oppstrøms for posisjonen der transkriberingen starter. En annen sekvens som finnes 70 til 80 baser oppstrøms for transkriberingsstarten for mange gener er en CNCAAT-region der N kan være ethvert nukleotid. I 3'-enden av de fleste eukaryotgener er det en AATAAA-sekvens som kan være signalet for å legge poly-A-halen til 3'-enden av kodingssekvensen. Alle disse sekvensene kan gjerne settes inn i eukaryote uttrykingsvektorer.

15 **[0119]** Eksempler på egnede promotorsekvenser til bruk med gjærceller er promotorer for 3-fosfoglyseratkinase eller andre glykolytiske enzymer, som enolase, glyseraldehyd-3-fosfatdehydrogenase, heksokinase, pyruvatdekarboksylase, fosfofruktokinase, glukose-6-fosfatisomerase, 3-fosfoglyseratmutase, pyruvatkinase, triosefosfatisomerase, fosfoglukoseisomerase og glukokinase.

20

[0120] Andre gjærpromotorer, som er utløsbare promotorer med den ekstra fordel at transkriberingen styres av vekstforholdene, er promotorregionene for alkoholdehydrogenase 2, isocytokrom C, syrefosfatase, nedbrytende enzymer forbundet med nitrogenstoffsiftet, metallotioneine, glyseraldehyd-3-fosfatdehydrogenase og enzymer som er ansvarlige for maltose- og galaktoseutnyttelsen. Egnede vektorer og promotorer til bruk i gjæruttrykkingen beskrives nærmere i EP 73,657. Forøkere fra gjær kan også med fordel brukes sammen med promotorer fra gjær.

30 **[0121]** Transkriberingen av antistoffet fra vektorer i pattedyrvertscellene styres for eksempel av promotorer fra genome til virus som polyomvirus, hønsekoppevirus, adenovirus (som adenovirus 2), bovint papillomvirus, fuglesarkomvirus, cytomegalovirus, et retrovirus, hepatitt B-virus og fortrinnsvis simiant virus 40 (SV40), fra heterologe pattedyrpromotorer, f.eks. 35 aktinpromotoren eller en immunoglobulinpromotor, fra varmesjokkpromotorer, så lenge disse promotorene er forenlige med celledsystemene til verten.

[0122] De tidlige og sene promotorene til SV40-viruset fås best som et restriksjonsfragment som også inneholder replikeringsorigoen til SV40-viruset. Den umiddelbare tidlige promotoren til det humane cytomegaloviruset fås best som et HindIII E-restriksjonsfragment. Det er bekjentgjort et system for å
 5 uttrykke DNA i pattedyrverter med bovint papillomvirus som vektor i U.S. Patent No. 4,419,446. En modifikasjon av dette systemet er beskrevet i U.S. Patent No. 4,601,978. Se også Reyes m.fl. (1982) Nature 297:598-601 om uttrykking av humant cDNA for β -interferon i museceller under styring av en tymidinkinasepromotor fra herpes simplex-virus. Alternativt kan den lange
 10 enderepetisjonen til rous-sarkomvirus brukes som promotor.

(v) Forøkerementkomponent

[0123] Transkriberingen av et DNA som koder for antistoffet ifølge denne
 15 oppfinnelsen med høyere eukaryoter vil ofte øke ved å sette inn en forøkersekvens i vektoren. I dag er det kjent mange forøkersekvenser fra pattedyrgener (globin, elastase, albumin, α -fetoprotein og insulin). Men vanligvis vil man bruke en forøker fra et eukaryotcellevirus. Eksempler er SV40-forøkeren på den sene siden av replikeringsorigo (bp 100–270), den tidlige forøkeren til promotoren for
 20 cytomegalovirus, polyomforøkeren på den sene siden av replikeringsorigo, og adenovirusforøkere. Se også Yaniv (1982) Nature 297:17–18 om å forøke elementer for å aktivere eukaryote promotorer. Forøkeren kan spleises inn i vektoren i en posisjon 5' eller 3' i forhold til sekvensen som koder for antistoffet, men det foretrekkes at den befinner seg i en posisjon 5' fra promotoren.

25

(vi) Transkriberingssluttkomponenten

[0124] Uttrykkingsvektorer som brukes i eukaryote vertsceller (gjær, sopp, insekter, planter, dyr, mennesker eller kjerneceller fra andre flercellede organismer)
 30 vil også inneholde sekvenser som trengs for å avslutte transkriberingen og stabilisere mRNA. Slike sekvenser er vanlig tilgjengelige fra den utranslaterte 5'-regionen og av og til 3'-regionen av eukaryot eller viralt DNA eller cDNA. Disse regionene inneholder nukleotidsegmenter som transkriberes som polyadenylerte fragmenter i den utranslaterte delen av mRNA-et som koder for antistoffet. Én
 35 nyttig transkriberingssluttkomponent er polyadenyleringsregionen av det bovine veksthormonet. Se WO94/11026 og uttrykkingsvektoren som bekjentgjøres der.

(vii) Utvalg og transformering av vertsceller

[0125] Egnede vertsceller for å klonere eller uttrykke DNA-et i vektorene i dette dokumentet er prokaryotene, gjærcellene eller de høyere eukaryotene som beskrives ovenfor. Egnede prokaryoter til dette formålet er eubakterier, som gram-negative eller gram-positive organismer, for eksempel, enterobacteriaceae, som f.eks. *Escherichia*, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwunia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, f.eks., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, f.eks., *Serratia marcescans* og *Shigella*, samt *Bacillus*, som *B. subtilis* og *B. licheniformis* (f.eks. *B. licheniformis* 41P bekjentgjort i DD 266,710 publisert den 12. april 1989), *Pseudomonas* som *P. aeruginosa*, og *Streptomyces*. En foretrukket kloningsvert for *E. coli* er *E. coli* 294 (ATCC 31,446), men andre stammer som *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537) og *E. coli* W3110 (ATCC 27,325) egner seg også. Disse eksemplene er illustrerende og ikke innskrenkende.

15

[0126] I tillegg til prokaryoter er eukaryote mikrober som filamentøse sopp- eller gjærarter egnede klonings- eller uttrykingsverter for antistoffkodende vektorer. *Saccharomyces cerevisiae*, eller vanlig ølgjær er den vanligst brukte blant de lavere eukaryote vertsmikroorganismene. Men flere andre slekter, arter og stammer er lett tilgjengelige og nyttige til oppfinnelsens formål, som *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces*-verter som, f.eks., *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12 424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24, 178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilae* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans* og *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* som *Schwanniomyces occidentalis*; og filamentøse sopparter som f.eks. *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* og *Aspergillus*-verter som *A. nidulans* og *A. niger*.

[0127] Egnede vertsceller for uttrykking av glykosylerte antistoffer stammer fra flercellede organismer. Eksempler på celler som ikke stammer fra virveldyr er planteceller og insektceller. Det er identifisert flere bakulovirusstammer og varianter og tilsvarende permissive insektvertsceller fra slike verter som *Spodoptera frugiperda* (larve), *Aedes aegypti* (mygg), *Aedes albopictus* (mygg), *Drosophila melanogaster* (bananflue) og *Bombyx mori*. Flere virusstammer for transfektering er offentlig tilgjengelige, f.eks. L-1-varianten av *Autographa californica* NPV og Bm-5-stammen av *Bombyx mori* NPV, og slike virus kan brukes som viruset her ifølge den foreliggende oppfinnelsen, spesielt for

35

transfektering av *Spodoptera frugiperda*-celler. Plantecellekulturer av bomull, mais, potet, soyabønner, petunia, tomat og tobakk kan også brukes som verter.

[0128] Men interessen har vært større for virveldyrceller, og forplantning av virveldyrceller i kultur (vevskultur) har blitt en rutineprosedyre. Eksempler på nyttige pattedyrvertscellelinjer er apenyrelinjen CV1 transformert med SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), den humane fosternyrelinjen (293 eller 293-cells subklonet for dyrking i suspensjonskultur, Graham m.fl. (1977) J. Gen Virol. 36:59) nyreceller fra nyfødte hamstere (BHK, ATCC CCL 10), eggstokkceller fra kinesisk dverghamster/-DHFR (CHO, Urlaub m.fl. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216), murine sertoliceller (TM4, Mather (1980) Biol. Reprod. 23:243-251), apenyreceller (CV1 ATCC CCL 70), nyreceller fra grønne marekatter (VERO-76, ATCC CRL-1587), humane livmorhalskreftceller (HELA, ATCC CCL 2), hundenyreceller (MDCK, ATCC CCL 34), brunrotteleverceller (BRL 3A, ATCC CRL 1442), humane lungeceller (W138, ATCC CCL 75), humane leverceller (Hep G2, HB 8065), musejurkrefte svulst (MMT 060562, ATCC CCL51), TRI-celler (Mather m.fl. (1982) Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68), MRC 5-celler, FS4-celler, og en human hepatomlinje (Hep G2).

[0129] Vertsceller transfekteres med uttrykings- eller kloningsvektorene som beskrives ovenfor for antistoffproduksjonen og dyrkes i konvensjonelt næringsmedium modifisert etter behov for å aktivere promotorer, velge transformanter eller amplifisere genene som koder for de ønskede sekvensene.

(viii) Dyrke vertscellene

[0130] Vertscellene som brukes til å produsere antistoffet ifølge denne oppfinnelsen kan dyrkes i forskjellige medier. Medium som fås i handelen egner seg for dyrkingen av vertscellene, for eksempel Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) og Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma). Dessuten kan alt medium som beskrives i Ham m.fl. (1979) Meth. Enz. 58:44, Barnes m.fl. (1980) Anal. Biochem. 102:255, U.S. Pat. Nr. 4,767,704, 4,657,866, 4,927,762, 4,560,655 eller 5,122,469, WO 90/03430, WO 87/00195 eller U.S. Patent Re. 30,985 brukes som dyrkingsmedium for vertscellene. Ethvert av disse mediene kan kompletteres etter behov med hormoner og/eller andre vekstfaktorer (som insulin, transferrin eller epidermisvekstfaktor), salter (som natriumklorid, kalsium, magnesium og fosfat), buffere (som HEPES), nukleotider (som

adenosin og tymidin), antibiotika (som legemidlet GENTAMYCIN™), sporstoffer (definert som uorganiske forbindelser som vanligvis foreligger i sluttkonsentrasjoner i mikromolarområdet), og glukose eller en tilsvarende energikilde. Eventuelle andre nødvendige supplementer kan også tas med i

5 passende konsentrasjoner som vil være kjent for fagpersoner. Dyrkingsforholdene, for eksempel temperaturen, pH eller liknende tilsvarer det som har vært brukt tidligere for vertscellen som er valgt for uttrykking, og vil være åpenbare for en vanlig kvalifisert fagperson.

10 **(ix) Rensing av antistoff**

[0131] Hvis det brukes rekombinante metoder kan antistoffet produseres intracellulært, i det periplasmiske rommet, eller skilles direkte ut i mediet. Hvis antistoffet produseres intracellulært, fjernes partikkelavfallet, enten vertsceller

15 eller lyserte fragmenter, som et første trinn, for eksempel ved sentrifugering eller ultrafiltrering. Carter m.fl. (1992) Bio/Technology 10:163-167 beskriver en framgangsmåte for å isolere antistoffer som skilles ut i det periplasmiske rommet til *E. coli*. Kort fortalt tines cellepasta i nærvær av natriumacetat (pH 3,5), EDTA og fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF) i løpet av rundt 30 minutter.

20 Celleavfallet kan fjernes ved sentrifugering. Hvis antistoffet skilles ut i mediet, blir vanligvis supernatanter fra slike uttrykkingssystemer først konsentrert med et proteinkonsentreringsfilter som fås i handelen, for eksempel en Amicon eller Millipore Pellicon ultrafiltreringsenhet. En proteasehemmer som PMSF kan tas med i ethvert av de foregående trinnene for å hemme proteolysen, og det kan

25 tas med antibiotika for å hindre vekst av fremmede organismer.

[0132] Antistoffsammensetningen som framstilles av cellene kan renses for eksempel ved kromatografi på hydroksylapatitt, gelelektroforese, dialyse og affinitetskromatografi, og affinitetskromatografi er den foretrukne

30 rensemetoden. Hvor egnet protein A er som affinitetsligand kommer an på arten og isotypen til eventuelle immunoglobulin Fc-domener som finnes i antistoffet. Protein A kan brukes til å rense antistoffer som bygger på humane tunge $\gamma 1$ -, $\gamma 2$ - eller $\gamma 4$ -kjeder (Lindmark m.fl. (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13). Protein G anbefales for alle murine isotyper og for humant $\gamma 3$ (Guss m.fl. (1986) EMBO

35 J. 5:15671575). Matriksen som affinitetsliganden er festet til er oftest agarose, men det kan også fås andre matrikser. Mekanisk stabile matrikser som porøst glass med kontrollert porestørrelse eller poly(styrendivinyll)benzen gir raskere

væskestrøm og kortere behandlingstid enn agarose. Hvis antistoffet omfatter et C_H3-domene, kan Bakerbond ABX™-masse (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) brukes til rensing. Andre metoder for proteinrensing som fraksjonering på ionebytterkolonne, etanolfelling, HPLC med omvendte faser, kromatografi på silika, kromatografi på heparin, SEPHAROSE™-kromatografi på en anion- eller kationbyttermasse (som på en polyasparaginsyrekolonne), kromatofokusering, SDS-PAGE og ammoniumsulfatfelling er også tilgjengelig og kommer an på hvilket antistoff som skal utvinnes.

- 10 **[0133]** Etter eventuelle innledende rensetrinn kan blandingen som omfatter det interessante antistoffet og forurensninger gjennomgå kromatografi med hydrofobe interaksjoner ved lav pH med pH mellom rundt 2,5–4,5 i elueringsbufferen, fortrinnsvis utført ved lav saltkonsentrasjon (f.eks., fra rundt 0–0,25 M salt).

15 **2. Utsorteringsanalyser og dyremodeller for å identifisere faktor D-antagonister**

[0134] Faktor D-antagonister kan evalueres i forskjellige cellebaserte analyser og dyremodeller av komplementforbundne sykdommer.

20

[0135] For eksempel kan det utvikles rekombinante (transgene) dyremodeller ved å innføre den kodende delen av de interessante genene i genomet til de interessante dyrene, med standard metoder for å utvikle transgene dyr. Dyr som kan fungere som mål for transgen manipulering er, uten at det skal innskrenke, mus, rotter, kaniner, marsvin, sauer, geiter, griser og ikke-menneskelige primater, f.eks. bavianer, sjimpanser og andre aper. Kjente metoder for å innføre et transgen i disse dyrene er mikroinjeksjon i prokjerner (Hoppe og Wanger, U.S. Patent No. 4,873,191); retrovirusformidlet genoverføring til kimbaner (f.eks., Van der Putten m.fl., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6148–615 [1985]), målrettet genmodifisering i embryonale stamceller (Thompson m.fl., Cell 56, 313–321 [1989]), elektroporering av fostre (Lo, Mol. Cell. Biol. 3, 1803–1814 [1983]); spermieformidlet genoverføring (Lavitrano m.fl., Cell 57, 717–73 [1989]). Gjennomgang finnes for eksempel i U.S. Patent No. 4,736,866.

- 35 **[0136]** For den foreliggende oppfinnelsens formål er transgene dyr slike dyr som har transgenet bare i noen av cellene sine («mosaikkdyr»). Transgenet kan innebygges enten som et enkelt transgen eller i konkatamerer, f.eks.

dobbelte transgener hode mot hode eller hode mot hale. Selektiv innføring av et transgen i en bestemt celletype kan også gjøres f.eks. ved å følge metoden til Lasko m.fl., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 623–636 (1992).

- 5 **[0137]** Uttrykkingen av transgenet i transgene dyr kan overvåkes med standardmetoder. For eksempel kan det brukes Southern blot-analyse eller PCR-amplifisering til å bekrefte innbyggingen av transgenet. Så kan graden av mRNA-uttrykking analyseres med framgangsmåter som hybridisering på stedet, northern blot-analyse, PCR eller immuncytokjemi.
- 10
- 15 **[0138]** Dyrene kan undersøkes videre for å finne tegn på immunsykdompatologi, for eksempel ved histologiske undersøkelser for å finne infiltrering av immunceller i bestemte vev. Det kan også utføres blokkeringsforsøk der de transgene dyrene behandles med en faktor D-antagonistkandidat for å bestemme utstrekningen av
- 20 **[0139]** Alternativt kan det utvikles «knock out»-dyr med genet som koder for faktor D defekt eller forandret på grunn av homolog rekombinering mellom det endogene genet som koder for faktor D-polypeptidet og forandret genomisk DNA som koder for det samme polypeptidet innført i en celle på fosterstadiet til dyret. For eksempel kan cDNA som koder for faktor D brukes til å klonere genomisk DNA
- 25 som koder for faktor D i samsvar med etablerte metoder. En del av et genomiske DNA som koder for faktor D kan fjernes og erstattes med et annet gen, for eksempel genet som koder for en valgbar markør som kan brukes til å overvåke innbyggingen. Vanligvis tas det med flere kilobaser av uforandret flankerende DNA (både i 5'- og 3'-enden) i vektoren [se f.eks. Thomas og Capecchi, Cell, 51:503
- 30 (1987) der homologe rekombinasjonsvektorer beskrives]. Vektoren føres inn i en embryonal stamcellelinje (f.eks. ved elektroporering) og celler som rekombinerer det innførte DNA homologt med det endogene DNA, blir valgt [se f.eks. Li m.fl., Cell, 69:915 (1992)]. Så blir det utvalgte cellene sprøytet inn i en blastocyst i et dyr (f.eks. mus eller rotte) for å lage klumpende kimærer [se f.eks. Bradley, i
- 35 Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, red. (IRL, Oxford, 1987), s. 113–152]. Så kan et kimært foster implanteres i et passende hunnlig fosterdyr med falsk drektighet og fosteret bæres fram som et

- «knock out»-dyr. Avkom som har det homologt rekombinerte DNA i kimcellene kan identifiseres ved standardmetoder og brukes til å avle fram dyr som bare har det homologt rekombinerte DNA i cellene sine. Knockout-dyr kan karakteriseres for eksempel ved evnene sine til å forsvare seg mot visse patologiske tilstander og ved
- 5 utvikling av patologiske tilstander fordi de mangler faktor D-polypeptidet.

[0140] Altså kan den biologiske aktiviteten til potensielle faktor D-antagonister studeres videre i knockout-mus med deaktivert murin faktor D:

- 10 **[0141]** En dyremodell av aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD) består av mus med nullmutasjon i Ccl-2- eller Ccr-2-genet. Disse musene utvikler kardinaltrekkene ved AMD, inkludert opphoping av lipofuscin i og druser under det pigmenterte netthinneepitelet (RPE), fotoreseptoratrofi og koroidal neovaskularisering (CNV). Disse trekkene utvikler seg etter 6 måneders
- 15 levetid. Kandidater til faktor D-antagonister kan testes på drusedannelse, fotoreseptoratrofi og koroidal neovaskularisering.

3. Farmasøytiske sammensetninger

- 20 **[0142]** Faktor D-antagonistene ifølge den foreliggende oppfinnelsen som inkluderer antistoff mot faktor D og andre molekyler som identifiseres ved utsorteringsanalysene som bekjentgjøres ovenfor, kan gis for å behandle komplementforbundne øyelidelser i form av farmasøytiske sammensetninger.
- 25 **[0143]** Terapeutiske formuleringer av faktor D-antagonister ifølge oppfinnelsen framstilles for lagring ved å blande det aktive molekylet med ønsket renhetsgrad med eventuelle farmasøytisk aksepterbare bærere, hjelpestoffer eller stabilisatorer (Remington's Pharmaceutical Sciences 16. utgave, Osol, A., red. [1980]), i form av frysetørkede formuleringer eller vannløsninger. Aksepterbare bærere, hjelpestoffer
- 30 eller stabilisatorer er ikke giftige for mottakere i de brukte dosene og konsentrasjonene og inkluderer buffere som fosfat, sitrat og andre organiske syrer; antioksidanter, inkludert askorbinsyre og metionin; konserveringsmidler (som oktaedekyldimetylbenzylammoniumklorid; heksametoniumklorid; benzalkoniumklorid, benzetoniumklorid; fenol, butyl- eller benzylalkohol;
- 35 alkylparabener som metyl- eller propylparaben; katekol; resorcinol; sykloheksanol; 3-pentanol; og m-kresol); lette (færre enn rundt 10 aminosyrer) polypeptider; proteiner, som serumalbumin, gelatin eller immunoglobuliner; hydrofile polymerer

som polyvinylpyrrolidon; aminosyrer som glycin, glutamin, asparagin, histidin, arginin eller lysin; monosakkarider, disakkarider og andre karbohydrater inkludert glukose, mannose eller dekstriner; kelatdannere som EDTA; sakkarider som sukrose, mannitol, trehalose eller sorbitol; saltdannende motioner som natrium;
 5 metallkomplekser (f.eks. Zn/protein-komplekser); og/eller ikke-ioniske surfaktanter som TWEEN™, PLURONICS™ eller polyetylenglykol (PEG).

[0144] Lipofeksjoner eller liposomer kan også brukes til å levere polypeptidet, antistoffet eller et antistofffragment til celler. Hvis det brukes
 10 antistofffragmenter, foretrekkes det det minste fragmentet som bindes spesifikt til bindingsdomenet til målproteinet. For eksempel kan det utformes peptidmolekyler på grunnlag av sekvensene til de variable regionene av et antistoff som beholder evnen til å binde målproteinsekvensen. Slike peptider kan framstilles kjemisk og/eller produseres ved rekombinant DNA-teknologi (se
 15 f.eks. Marasco m.fl., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889–7893 [1993]).

[0145] De aktive molekylerne kan også innesluttet i mikrokapsler som for eksempel framstilles ved konserveringsmetoder eller ved interfasepolymerisering, for eksempel hydroksymetylcellulose- eller gelatinmikrokapsler og
 20 poly(metylmetakrylat)-mikrokapsler i kolloidale legemiddelleveringssystemer (for eksempel liposomer, albuminmikrosfærer, mikroemulsjoner, nanopartikler og nanokapsler) eller i makroemulsjoner. Slike metoder bekjentgjøres i Remington's Pharmaceutical Sciences 16. utgave, Osol, A., red. (1980).

25 **[0146]** Formuleringer som skal gis in vivo må være sterile. Dette oppnås enkelt ved filtrering gjennom sterile filtreringsmembraner.

[0147] Det kan framstilles preparater med vedvarende frigjøring. Passende eksempler på depotpreparater er halvgjennomtrengelige matrikser av faste
 30 hydrofobe polymerer som inneholder antistoffet og er i form av formgitte artikler, f.eks. filmer eller mikrokapsler. Eksempler på depotmatrikser er polyester, hydrogeler (for eksempel poly(2-hydroksyetylmetakrylat) eller poly(vinylalkohol)), polylaktider (U.S. Pat. No. 3,773,919), kopolymerer av L-glutaminsyre og γ -etyl-L-glutamat, ikke-nedbrytbare kopolymerer av etylen-vinylacetat, nedbrytbare
 35 kopolymerer av melkesyre-glykolsyre som LUPRON DEPOT™ (injiserbare mikrokuler som består av melkesyre-glykolsyre-kopolymer og leuprolidacetat) og poly-D-(-)-3-hydroksysmørsyre. Noen polymerer som etylen-vinylacetat og melkesyre-glykolsyre

gjør det mulig å frigjøre molekyler i over 100 dager, men visse hydrogeler frigjør proteiner i kortere tid. Hvis innkapslede antistoffer befinner seg lenge i kroppen, kan de denatureres eller klumpe seg sammen fordi de utsettes for fuktighet ved 37 °C, som gir tap av biologisk aktivitet og mulige endringer i immunogenisiteten. Det kan lages rasjonelle strategier for stabilisering som kommer an på den aktuelle mekanismen. Hvis man oppdager for eksempel at sammenklumpingsmekanismen er at det dannes S-S-bindinger mellom molekylene gjennom tio-disulfidutveksling, kan det oppnås stabilisering ved å modifisere sulfhydrylrestene, frysetørke fra sure løsninger, kontrollere fuktinnholdet, bruke passende tilsetninger og utvikle spesifikke polymermatrikssammensetninger.

[0148] Forbindelsene ifølge oppfinnelsen for forebygging eller behandling av en øyesykdom gis vanligvis ved okulær, intraokulær og/eller intravitreal injeksjon. Andre administrasjonsmåter kan også brukes, inkludert men ikke innskrenket til, topisk, parenteral, subkutanøs, intraperitoneal, intrapulmonær, intranasal og intralesjonal administrering. Parenterale infusjoner inkluderer intramuskulær, intravenøs, intraarteriell, intraperitoneal eller subkutan administrering.

[0149] Formuleringer for okulær, intraokulær eller intravitreal administrering kan framstilles ved kjente framgangsmåter og med kjente bestanddeler. Et hovedvilkår for effektiv behandling er tilstrekkelig gjennomtrenging av øyet. I motsetning til sykdommer foran i øyet der legemidler kan påføres topisk, krever netthinnesykdommer mer stedsspesifikk tilnærming. Øyedråper og salver trenger sjelden gjennom til det bakre øyet, og blod/øye-barrieren hindrer at systemisk administrerte legemidler trenger inn i øyevevet. Derfor er den foretrukne framgangsmåten for legemiddelframføring ved behandling av netthinnesykdommer som AMD og CNV direkte intravitreal injeksjon. Intravitreale injeksjoner gjentas vanligvis med visse mellomrom som kommer an på pasientens tilstand og egenskapene og halveringstiden til legemidlet som føres fram. Ved intraokulær (f.eks. intravitreal) penetrering foretrekkes det vanligvis molekyler med mindre dimensjoner.

[0150] Effektiviteten ved behandlingen av de komplementforbundne øyelidelsene som AMD eller CNV kan måles med forskjellige verdier som er vanlig brukt ved evaluering av intraokulære sykdommer. For eksempel kan man vurdere synstapet. Synstap kan evalueres ved, men ikke innskrenkes til, f.eks. måle gjennomsnittlig forandring av beste korrigerte visus (BCVA) fra grunnlinje til et ønsket tidspunkt

(f.eks. hvis BCVA bygger på synsskarphetskartet fra ETDRS-studien (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study) og vurdering ved en testavstand på 4 meter), måle andelen av pasientene som taper færre enn 15 bokstaver i visus på et ønsket tidspunkt sammenliknet med grunnlinjen, måle andelen av pasientene som vinner 15 eller flere bokstaver i visus på et ønsket tidspunkt sammenliknet med grunnlinjen, måle andelen av pasientene som har Snellen-visus tilvarende 20/2000 eller lavere på et ønsket tidspunkt, bruke spørreskjemaet om synsfunksjoner fra NEI, måle størrelsen på CNV ved et ønsket tidspunkt, f.eks. ved fluoresceinangiografi osv. Det kan gjøres øyeevaluering, f.eks. inkludert, men ikke innskrenket til, f.eks. å utføre øyeundersøkelser, måle trykket inne i øyet, måle synsskarpheten, måle det intraokulære trykket, vurdere synsskarpheten, måle trykk med spaltelampe, vurdere intraokulær inflammasjon osv.

[0151] Eksemplene nedenfor tilbys bare for å illustrere og skal ikke oppfattes som om de innskrenker gyldighetsområdet for den foreliggende oppfinnelsen på noen måte.

Eksempler

[0152] Reagenser som fås i handelen og omtales i eksemplene ble brukt i samsvar med produsentens instruksjoner hvis det ikke er angitt noe annet. Kilden for cellene som identifiseres i eksemplene nedenfor og gjennom hele spesifikasjonen ved ATCC-tilvekstnummer er fra American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

Eksempel 1

Framstilling og testing av antistoff mot faktor D

Framgangsmåter:

Forberedelse av glasslegemet og Bruchs membran for proteinanalyse

[0153] Humane kadaverøyne med og uten AMD ble tint og det bakre segmentet tatt ut sammen med glasslegemet, netthinnen og RPE. Glasslegemet ble samlet opp i mikrorør, frosset på tørris og oppbevart ved -70 °C inntil det skulle behandles videre. Bruchs membran og koroidlaget ble

løsnet fra den bakre halvkulen (Crabb, J.W. m.fl. Proc Natl Acad Sci U S A., 99:14682–7 (2002)) og det ble isolert enten 4 eller 6 mm trepanerte prøver fra makula og de sentrale omgivelsene for senere analyse. Se oversiktstabellen (tabell 2) om Bruchs membran-preparatene, alder, kjønn, AMD-stadium, dissekeringsmerknader og mengdene som er brukt til proteomanalyse. Én trepanert prøve med diameter 4 mm ble brukt til å analysere konsentrasjonen av komplementfaktor D-protein. Prøven ble ultralydbehandlet i 10 minutter i analysefortynningsmiddel (PBS/0,5 % BSA/0,5 % Tween-20) og den løselige og den uløselige fraksjonen separert ved sentrifugering i 10 minutter ved 5000 rpm. Den løselige fraksjonen ble brukt til ELISA-analyser.

Produksjon av monoklonale antistoffer mot human faktor D

[0154] Det ble dannet monoklonale antistoffer mot human faktor D ved å injisere 2 µg faktor D (Comptech, Taylor, TX, USA) i monofosforyllipid A/trehalosedikorynomykolat-hjelpestoff (Corixa, Hamilton, MT, USA) i tredeputene til Balb/c-mus, 11 ganger. Lymfeknuter fra knehasene til mus ble fusjonert med P3X63Ag.U.1 myelomceller. Hybridomceller ble utsortert mot murin faktor D på bindingsaffiniteten. Cellelinjer som produserte antistoff ble klonet ved begrensende fortynning.

Hemolyseanalyser

[0155] For å bestemme aktivitet i den alternative prosessen ble kaninetytrocytter (Er, Colorado Serum) vasket 3 ganger i GVB og resuspendert til 2×10^9 /ml. Hemmere (50 µl) og 20 µl Er-suspensjon ble blandet 1:1 med GVB/0,1 M EGTA/0,1 M $MgCl_2$. Komplementaktivering ble startet ved å tilsette Glq-utarmet humant serum (Quidel, 30 µl fortynnet 1:3 i GVB). Etter 30 minutters inkubering ved romtemperatur ble det tilsatt 200 µl GVB/10 mM EDTA for å stoppe reaksjonen og prøvene ble sentrifugert i 5 minutter ved 500 G. Hemolysen ble bestemt i 200 µl supernatant ved å måle absorbansen ved 412 nm. Dataene ble uttrykt som % av hemolysen som ble utløst i fravær av hemmeren. For å bestemme virkningen av antistoffet mot Faktor D på den klassiske prosessen i komplementet ble det fulgt en liknende prosedyre bortsett fra at Er ble byttet ut med IgM-belagte saueerytrocytter (E-IgM, CompTech) og analysen ble utført i faktor B-fattig humant serum i GVB++.

ELISA av human faktor D

[0156] Kaprint polyklonalt antistoff (pAb) mot faktor D fra det humane komplementet (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) ble fortynnet til 1 µg/ml i fosfatbufret saltløsning (PBS) og belagt på ELISA-plater (384-brønners, sterktbindende plater, Greiner Bio One gjennom VWR International, Bridgepoint, New Jersey, USA) gjennom en inkubering over natten ved 4 °C. Etter 3 gangers vasking med vaskebuffer (PBS/0,05 % Tween-20), ble platene blokkert med PBS/0,5 % bovint serumalbumin (BSA) i 1 til 2 timer. Denne og alle andre inkuberinger ble utført ved romtemperatur på dreierister. Human glasslegemevæske og prøver av Bruchs membran-lysate ble fortynnet med analysefortynningsmiddel (PBS/0,5 % BSA/0,5 % Tween-20). Med den samme bufferen ble det framstilt seriefortynninger av faktor D (Complement Technology, Inc., Tyler, Texas, USA) som standardkurve (15,6 pg/ml–1000 pg/ml). Det ble tint frosne kontrollprøver som var forhåndsfortynnet for å kvantifisere i det høye, midtre og lave området av standardkurven. Etter blokkeringsstrinnet ble platene vasket og prøvene, standardene og kontrollene ble tilsatt og inkubert i 2 timer. Platene ble vasket og biotinylerte monoklonale antistoffer mot human faktor D, 9G7.1.16, ble fortynnet til 62,5 ng/ml og tilsatt til platene for 1 til 2 timers inkubering. Streptavidin-pepperrotperoksidase (SA-HRP) (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) ble fortynnet 1/10 000 i analysefortynningsmiddel og tilsatt på de vaskede platene. Etter 30 minutters inkubering og et avsluttende vasketrinn ble det tilsatt tetrametylbenzidin (TMB) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA) og fargen ble framkalt i 5 til 7 minutter. Til slutt ble reaksjonen stoppet ved å tilsette 1 M fosforsyre. Den optiske tettheten ble målt med en mikroplateleser (450 nm, 650 nm referanse), og prøvekonsentrasjonene ble beregnet ut fra 4-parameters tilpasninger til standardkurvene. De minste målbare konsentrasjonene av faktor D i menneskelige glasslegemer og lysatprøver av Bruchs membran var henholdsvis 780 pg/ml (1/50 minste fortynning) og 156 pg/ml (1/10 minste fortynning).

Immunhistokjemi

[0157] Prøver av Bruchs membran ble frosset i OCT-forbindelse og 7 µm seksjoner ble kuttet på en kuldemikrotom. Immunfarging. Snittene ble fiksert i acetone i 5 minutter etter kuttingen og oppbevart ved –80 °C til det var klart for

fargingen. Frosne objektglass ble skylt i PBS 2 ganger og 2 ganger med Tris-bufret saltløsning som inneholdt 0,1 % Tween (TBST). Endogent avidin og biotin ble blokkert med vektoravidin-biotin-blokkeringssett (SP-2001) ved romtemperatur etter produsentens instruksjoner. Snittene ble skylt i TBST, 2 bytter, 5 minutter

5 hver og endogene immunoglobuliner ble blokkert med 10 % hesteserum i 3 % BSA/PBS i 30 minutter ved romtemperatur. Snittene ble inkubert med antistoff mot human faktor D (9G7.1.16) fortynnet til 10 µg/ml i 10 % hesteserum i 60 minutter ved romtemperatur. Naive mus IgG2a ved 10 µg/ml (Pharmingen) ble brukt som negativ kontroll. Etter skylling i TBST, 2 bytter, 5 minutter hver,

10 ble snittene inkubert med biotinyllert ekvint antimurint antistoff (Vector) fortynnet til 2,5 µg/ml (1:200) i hesteserum i 30 minutter. Snittene ble skylt i TBST, 2 bytter, 5 minutter hver og inkubert med Vectastain ABC-AP Elite Reagent i 30 minutter ved romtemperatur, skylt i TBST (2 bytter, 5 minutter hver) og inkubert i nyframstilt Vector Red-løsning. Vector Red ble framstilt som

15 følger: For 200 mM Tris HCl fortynnes 1 M Tris HCl 1:5 i dH₂O (1 del Tris HCl og 4 deler dH₂O). Bland 1 dråpe levamisol i hver 5 ml 200 mM løsning av nyframstilt Tris HCl. Bland 2 dråper av reagens 1, 2 og 3 fra Vector Red-settet individuelt i hver 5 ml av 200 mM Tris HCl-levamisol-løsningen. Må brukes innen 5–10 minutter etter tilsetningen av reagens 3 fra Vector Red-settet.

20 Snittene ble skylt i H₂O og motfarget med Mayers hematoksylin ved å dyppe dem i hematoksylin 10–15 ganger (20–30 sekunder), skylt med vann og blåfarge og skylt godt i rennende vann i 5 minutter for å vaske vekk blåfargereagensen. Snittene ble montert med Crystal Mount-løsning og satt til tørking over natten. De tørkede Crystal Mount-dekte objektglassene ble dyppet

25 i xylener og forsynt med Permamount preparatmedium og dekkglass.

Klone den tunge og lette kjeden av 20D12

[0158] Totalt RNA ble trukket ut av hybridomceller som produserte det murine

30 monoklonale 20D12 mot human faktor D, ved hjelp av RNeasy Mini Kit (Qiagen, Tyskland). Det variable lette (VL) og det variable tunge (VH) domenet ble forsterket med RT-PCR og følgende degenererte primere:

Lett kjede (LC) forover:

5'GATCGATATCGTRATGACHCARTCTCA3' (SEQ ID NO: 4)

35 Lett kjede bakover:

5'TTTDAKYTCCAGCTTGGTACC3' (SEQ ID NO: 5)

Tung kjede (HC) forover: 5'GATCCGTACGCTCAGGTYCARYTGCA¹RCARTCTGG3'
(SEQ ID NO: 6)

Tung kjede bakover:
5'ACAGTGGGCCCTTGGTGGAGGCTGMRGAGACDGTGASHRDRGT3' (SEQ ID NO: 7)

5

[0159] Foroverprimerne var spesifikke for aminosyresekvensen i N-enden av VL- og VH-regionen. Bakoverprimerne for LC og HC var utformet for å hybridisere til en region henholdsvis i det konstante lette (CL) og konstante tunge domenet 1 (CH1), som er bevart i høy grad fra art til art.

10

[0160] Amplifisert VL ble klonet inn i en pRK pattedyrcelleuttrykkingsvektor (Shields m.fl., J Biol Chem 2000; 276: 6591–604), som inneholdt det humane konstante kappa-domenet. Amplifisert VH ble satt inn i en pRK pattedyrcelleuttrykkingsvektor som kodet for det konstante humane IgG1-domenet i sin fulle lengde. 20D12 ble altså omformatert til en murin-human IgG1-kimære.

15

[0161] Den skriftlige spesifikasjonen ovenfor anses å være tilstrekkelig til at en fagperson kan praktisere oppfinnelsen. Den foreliggende oppfinnelsen skal ikke innskrenkes i gyldighet av det inngitte segmentet, siden den inngitte utførelsesformen er ment å skulle være en enkelt illustrasjon av visse aspekter av oppfinnelsen.

20

[0162] Inngivelsen av stoffet i dette dokumentet innebærer ikke en innrømmelse av at den skriftlige beskrivelsen her er utilstrekkelig til å gjøre det mulig å praktisere noe aspekt av oppfinnelsen, inkludert den beste måten å gjøre det på, og det skal heller ikke oppfattes slik at det innskrenker gyldighetsområdet for patentkravene til de spesifikke illustrasjonene som det representerer.

25

Patentkrav

1. Antagoniserende antistoff mot faktor D eller et antigenbindende fragment av det til bruk i en framgangsmåte for å forebygge eller behandle en komplementforbundet øyelidelse hos et menneske, idet antistoffet eller det
5 antigenbindende fragmentet er:
 - (i) antistoff 20D12, som har sekvenser for lett og tung kjede som vist i SEQ ID NO 1 og 2 eller et antigenbindende fragment av dette, eller
 - (ii) et antistoff eller antigenbindende fragment som konkurrerer i en flerblokkeringsanalyse med antistoffet i (i) om binding til epitopen som bindes av
10 antistoffet i (i) og som bindes til det aktive setet til faktor D og/eller bindes til en epitop som inkluderer aminosyrerester fra det aktive setet til faktor D.
2. Det antagoniserende antistoffet mot faktor D eller antigenbindende fragmentet av det til bruk ifølge krav 1 som er en variant av antistoffet eller det
15 antigenbindende fragmentet i (i) som har minst 90 % sekvensidentitet med sekvensen til det variable domenet dets.
3. Det antagoniserende antistoffet mot faktor D eller antigenbindende fragmentet av det til bruk ifølge krav 1 eller krav 2 som omfatter CDR-sekvensene til den tunge og lette kjeden (som definert ifølge Kabat) til antistoffet i (i).
- 20 4. Det antagoniserende antistoffet mot faktor D eller antigenbindende fragmentet av det til bruk ifølge noen av de foregående kravene, som er et humant, humanisert eller kimært antistoff eller antigenbindende fragment av det.
5. Det antagoniserende antigenbindende fragmentet av antistoffet mot faktor D til bruk ifølge noen av de foregående kravene, som velges fra gruppen som består av
25 Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, (scFv)₂, lineære antistoffer, enkjedede antistoffmolekyler, miniantistoffer, diaantistoffer og flerspesifikke antistoffer lagd av antistofffragmenter.
6. Det antagoniserende antigenbindende fragmentet av antistoffet mot faktor D til bruk ifølge krav 5, som er et Fab-, Fab'-, F(ab')₂-, scFv- eller (scFv)₂-fragment.
7. Det antagoniserende antistoffet mot faktor D eller antigenbindende
30 fragmentet til bruk ifølge noen av de foregående kravene, som binder den humane faktor D med K_d-verdi ikke over 5 nM.
8. Det antagoniserende antistoffet mot faktor D eller antigenbindende fragmentet til bruk ifølge noen av de foregående kravene, der den komplementforbundne øyelidelsen er valgt fra gruppen som består av aldersrelatert makuladegenerasjon
35 (AMD), koroidal neovaskularisering (CNV), uveitt, diabetiske og andre iskemirelaterte retinopatier, diabetisk makulaødem, patologisk myopi, von Hippel-

Lindaus sykdom, øyehistoplasmose, sentral netthinneveneokklusjon (CRVO), hornhinneneovaskularisering og netthinneneovaskularisering.

9. Det antagoniserende antistoffet mot faktor D eller antigenbindende fragmentet til bruk ifølge krav 8, der den komplementforbundne øyelidelsen er tørr AMD.

5 **10.** Det antagoniserende antistoffet mot faktor D eller antigenbindende fragmentet til bruk ifølge krav 8, der den komplementforbundne øyelidelsen er våt AMD.

11. Bruk av et antagoniserende antistoff mot faktor D eller et antigenbindende fragment av det som definert i ett av kravene 1 til 7 til å framstille et legemiddel for behandling av en komplementforbundet øyelidelse.

10 **12.** Bruk ifølge krav 11 der den komplementforbundne øyelidelsen er som definert i ett av kravene 8 til 10.

SEKVENSLISTE

<110> GENENTECH, INC.

HASS, PHILLIP

JIANPING, YIN

KATSCHKE, KENNETH JR.

STEFFEK, MICAH

WIESMANN, CHRIS

VAN LOOKEREN CAMPAGNE, MENNO

<120> FOREBYGGING OG BEHANDLING AV
KOMPLEMENTFORBUNDNE ØYELIDELSER

<130> GNE-0244 PCT

<140> Ikke tilordnet ennå

< 141> Hermed

<150> 60/939,791 <151> 2007-05-23

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

< 211> 233

< 212> PRT

< 213> Mus musculus

<400> 1

2

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

<210> 2

< 211> 464

< 212> PRT

< 213> Mus musculus

<400> 2

3

Met₁ Gly Trp Ser Cys₅ Ile Ile Leu Phe Leu₁₀ Val Ala Thr Ala Thr Gly₁₅
 Ala Tyr Ala Gln₂₀ Val Gln Leu Gln₂₅ Ser Gly Ala Glu Leu₃₀ Val Lys
 Pro Gly Ala₃₅ Ser Val Lys Leu Ser₄₀ Cys Lys Ala Ser Gly₄₅ Tyr Thr Phe
 Thr Ser₅₀ Tyr Tyr Met Tyr Trp₅₅ Val Lys Glu Arg Pro₆₀ Gly Gln Gly Leu
 Glu₆₅ Trp Ile Gly Glu Ile₇₀ Asn Pro Thr Asn Gly₇₅ Gly Thr Asn Phe Asn₈₀
 Glu Lys Phe Lys Ser₈₅ Lys Ala Thr Leu Thr₉₀ Val Asp Thr Ser Ser₉₅ Asn
 Thr Ala Tyr Met₁₀₀ Gln Leu Ser Ser Leu₁₀₅ Thr Ser Glu Asp Ser₁₁₀ Ala Val
 Tyr Tyr Cys₁₁₅ Ala Arg Glu Gly Gly₁₂₀ Phe Ala Tyr Trp Gly₁₂₅ Gln Gly Thr
 Leu Val₁₃₀ Thr Val Ser Ala Ala₁₃₅ Ser Thr Lys Gly Pro₁₄₀ Ser Val Phe Pro
 Leu₁₄₅ Ala Pro Ser Ser Lys₁₅₀ Ser Thr Ser Gly Gly₁₅₅ Thr Ala Ala Leu Gly₁₆₀
 Cys Leu Val Lys Asp₁₆₅ Tyr Phe Pro Glu Pro₁₇₀ Val Thr Val Ser Trp₁₇₅ Asn
 Ser Gly Ala₁₈₀ Thr Ser Gly Val His₁₈₅ Thr Phe Pro Ala Val₁₉₀ Leu Gln
 Ser Ser Gly₁₉₅ Leu Tyr Ser Leu Ser₂₀₀ Val Val Thr Val₂₀₅ Pro Ser Ser
 Ser Leu₂₁₀ Gly Thr Gln Thr Tyr₂₁₅ Ile Cys Asn Val Asn₂₂₀ His Lys Pro Ser
 Asn Thr Lys Val Asp Lys₂₃₀ Lys Val Glu Pro Lys₂₃₅ Ser Cys Asp Lys Thr₂₄₀
 His Thr Cys Pro Pro₂₄₅ Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly₂₅₅ Pro Ser
 Val Phe Leu Phe₂₆₀ Pro Pro Lys Pro Lys₂₆₅ Asp Thr Leu Met Ile₂₇₀ Ser Arg
 Thr Pro Glu₂₇₅ Val Thr Cys Val Val₂₈₀ Val Asp Val Ser His₂₈₅ Glu Asp Pro
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

4

290 295 300
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 305 310 315 320
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 325 330 335
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 340 345 350
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 355 360 365
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 370 375 380
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 3

< 211> 259

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 3

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

5

Pro Gly Thr Leu Cys Asp Val Ala Gly Trp Gly Val Val Thr His Ala
 145 150 155 160
 Gly Arg Arg Pro Asp Val Leu His Gln Leu Arg Val Ser Ile Met Asn
 165 170 175
 Arg Thr Thr Cys Asn Leu Arg Thr Tyr His Asp Gly Val Val Thr Ile
 180 185 190
 Asn Met Met Cys Ala Glu Ser Asn Arg Arg Asp Thr Cys Arg Gly Asp
 195 200 205
 Ser Gly Ser Pro Leu Val Cys Gly Asp Ala Val Glu Gly Val Val Thr
 210 215 220
 Trp Gly Ser Arg Val Cys Gly Asn Gly Lys Lys Pro Gly Val Tyr Thr
 225 230 235 240
 Arg Val Ser Ser Tyr Arg Met Trp Ile Glu Asn Ile Thr Asn Gly Asn
 245 250 255
 Met Thr Ser

<210> 4

< 211> 27

< 212> DNA

< 213> Kunstig sekvens

<220>

< 223> Beskrivelse av den kunstige sekvensen: Syntetisk primer

<400> 4

gatcgatatc gtratgachc artctca 27

<210> 5

< 211> 21

< 212> DNA

< 213> Kunstig sekvens

<220>

< 223> Beskrivelse av den kunstige sekvensen: syntetisk primer

<400> 5

tttdakytcc agcttggtac c 21

<210> 6

< 211> 35

< 212> DNA

< 213> Kunstig sekvens

<220>

< 223> Beskrivelse av den kunstige sekvensen: Syntetisk primer

<400> 6

gatccgtacg ctcaggyca rytgcarcar tctgg 35

<210> 7

< 211> 43

< 212> DNA

< 213> Kunstig sekvens

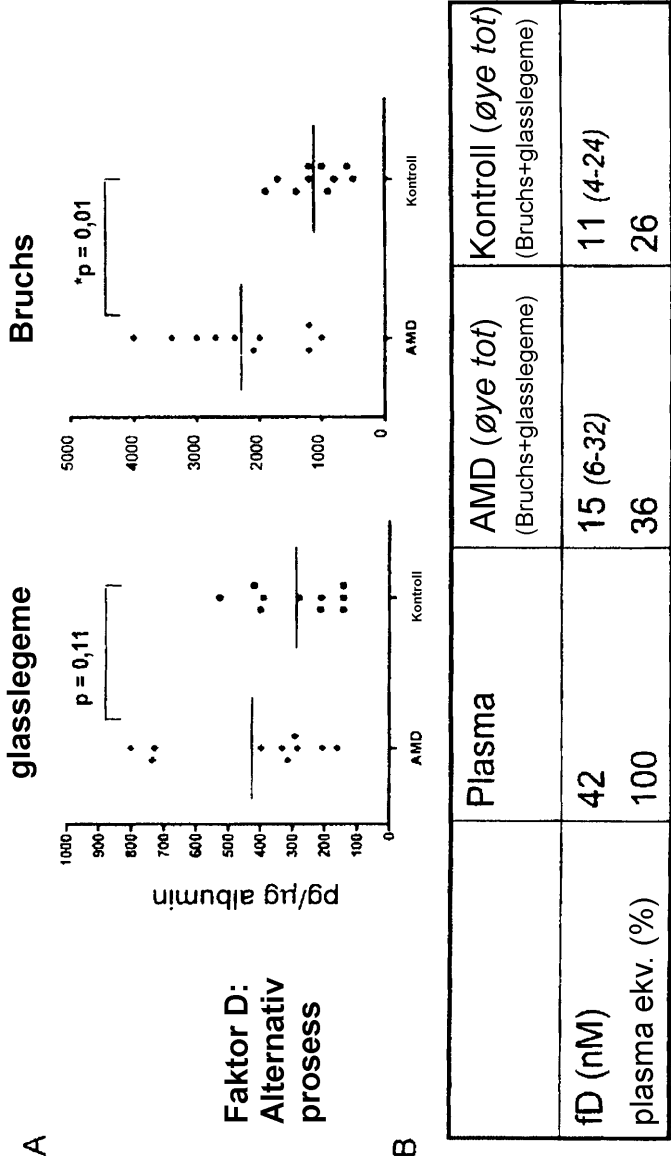
<220>

< 223> Beskrivelse av den kunstige sekvensen: syntetisk primer

<400> 7

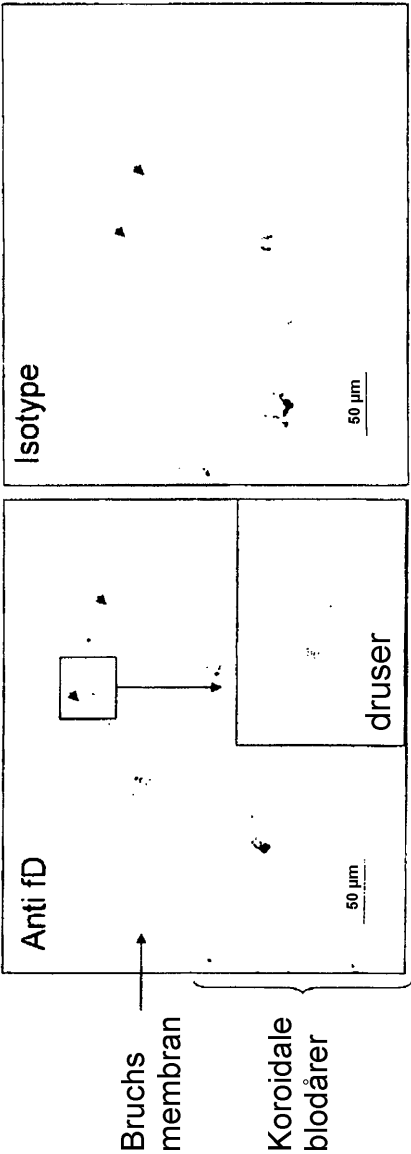
acagtgggcc cttggtggag gctgmrgaga cdgtgashrd rgt 43

Økt uttrykking av faktor D i Bruchs
membran fra øyne med AMD



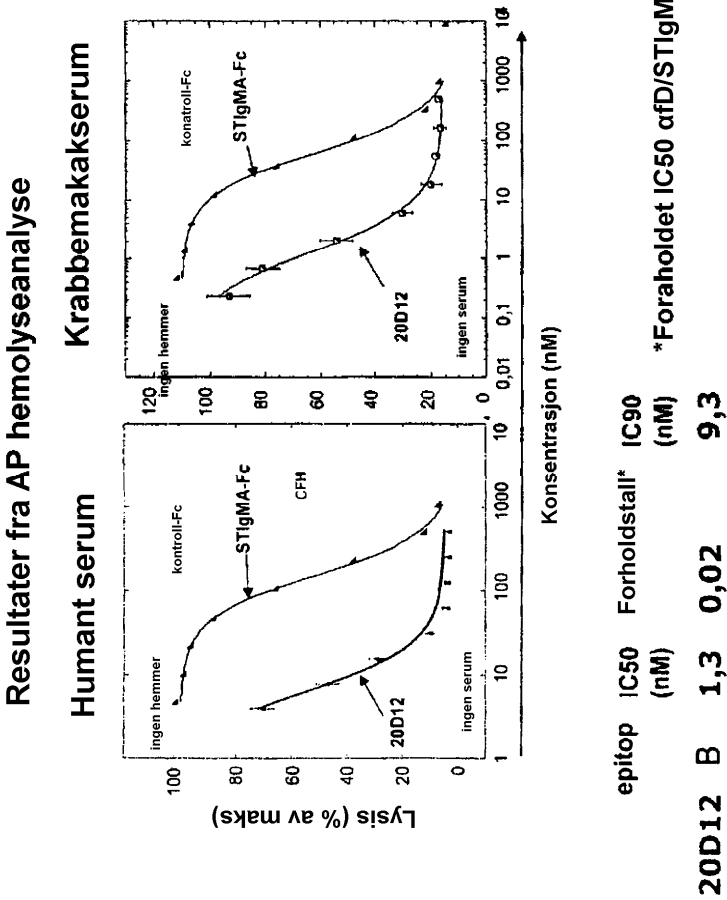
Figur 1

Faktor D finnes i druse, Bruchs membran
og koroidea hos en AMD-donor.



Figur 2

Karakterisering av antistoffklon 20D12 mot faktor D



Figur 3

Sekvens for antistoffet 20D12

Sekvens for lett kjede i 20D12:

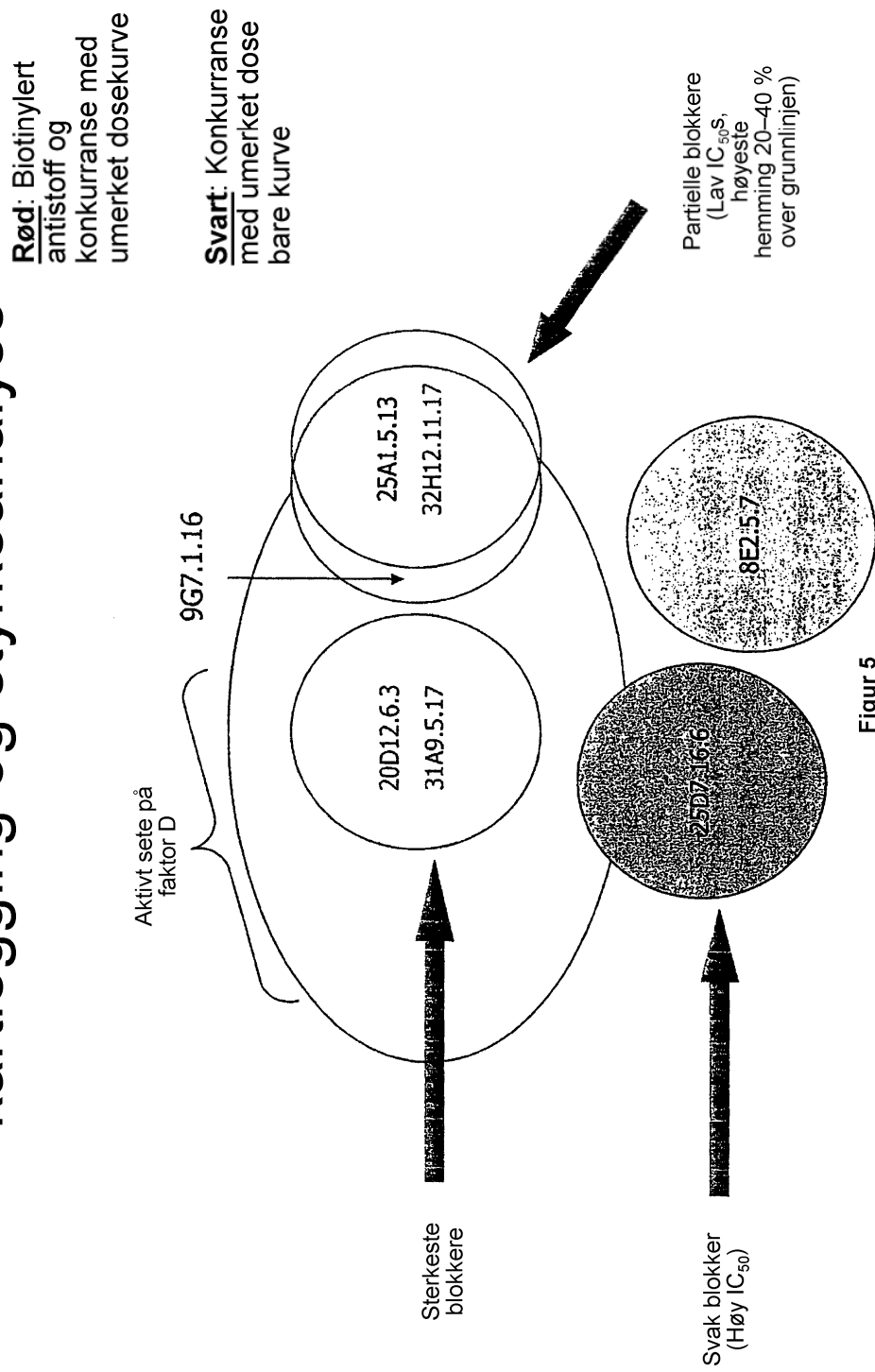
MGWSCIIILFLVATATGVHSDIVMTQSQKFMSTSVGDRSVTCKASQNVDTD
VAWFQKPGQSPRGLIYSASSRYSVGPDRFTGSGGTDFTLTISNVQSEDL
AEYFCQQYNNYPLTFGSGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVWCL
LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTILSKADY
EKHKYYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Sekvens for tung kjede i 20D12

MGWSCIIILFLVATATGAYAQVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSY
YMYWVKERPGQGLEWIGEGINPTNGGTNFKSKATLTVDTSSTNTAYMQ
LSSLTSEDSAVYYCAREGGFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VWTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTIPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHY
TQKLSLSLSPGK

Figur 4

Sammendrag av resultater fra epitop-kartlegging og styrkeanalyse

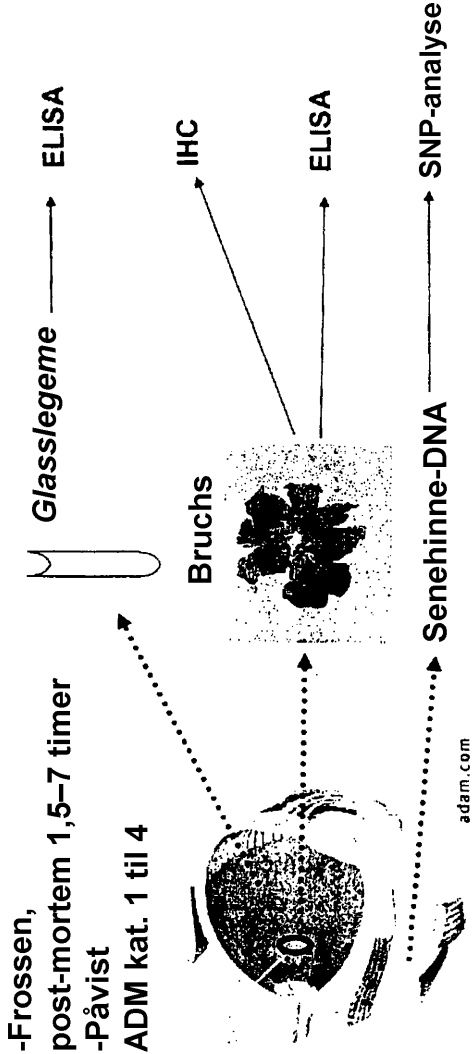


Figur 5

Figur 6Human komplementfaktor D (NP_038487.1)

```
1 MHSSVYFVAL VILGAAVCAA QPRGRILGGQ FAAA HARPYM
 41 ASVQVNGTHV CGGTLLDEQW VLSAAHCMDG VTDDDSVQVL
 81 LGAHLSAPE PYKRWYDVQS VVPHPGSRPD SLEDDLILFK
121 LSQNASLGPH VRPLPLQYED KEVEPGTLC D VAGWGVVTHA
161 GRRPDVLHQL RVSIMNRTTC NLR TYHDGVV TINMMCAESN
201 RRDTCRGDSG SPLVCGDAVE GVVTWGS RVC GNGKKPGVYT
 241 RVSSYRMWIE NITNGNMTS
```

Analyse av komplementkomponenter ved AMD



Tabell 1

Donorvev brukt i studiene

<u>Genentech-nr.</u>	<u>Alder</u>	<u>Kjønn</u>	<u>AMD-stadium</u>	<u>Dissekeringsmerknader</u>
1	78	F	3	Arr i fovea, få makuladruser FS
1A	78	F		Ingen tegn til druser
2	85	M	4	Geografisk atrofi GA
2A	85	F		Ingen tegn til druser
3	87	F	4	Fibrovaskulært arr i fovea FS
3A	87	F		Ingen tegn til druser
4	76	M	4	Geografisk atrofi GA
4A	74	M		To små druser
5	81	F	3+	Moderate makuladruser MD
5A	81	M		Ingen tegn til druser
6	84	F	3	Mange makuladruser MD
6A	86	M		Ingen tegn til druser
7	83	F	4	Fibrovaskulært arr i fovea FS
7A	83	M		Ingen tegn til druser
8	72	M	4	Arr i fovea, moderate makuladruser FS
8A	71	F		Ingen tegn til druser
9	81	F	4	Arr i fovea, moderate makuladruser FS
9A	83	M		Ingen tegn til druser
10	77	M	3	Mange makuladruser MD
10A	78	M		Ingen tegn til druser

- ☐ Geografisk atrofi
- ☐ Arr i fovea
- ☐ AMD 3. stadium

Tabell 2