



(12) Translation of
european patent specification

(11) NO/EP 2158315 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/09 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2016.07.18
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2016.03.23
(86)	European Application Nr.	08757278.0
(86)	European Filing Date	2008.06.25
(87)	The European Application's Publication Date	2010.03.03
(30)	Priority	2007.06.25, US, 937112 P 2008.03.12, US, 69056
(84)	Designated Contracting States:	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Proprietor	ESBATech, an Alcon Biomedical Research Unit LLC, Wagistrasse 21, 8952 Schlieren, CH-Sveits
(72)	Inventor	URECH, David, Schreinerweg 5, 8708 Männedorf, CH-Sveits BORRAS, Leonardo, Bundentalstrasse 1, 8952 Schlieren, CH-Sveits
(74)	Agent or Attorney	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Title	METHODS OF MODIFYING ANTIBODIES, AND MODIFIED ANTIBODIES WITH IMPROVED FUNCTIONAL PROPERTIES
(56)	References Cited:	WO-A-03/008451 WO-A-2005/005604 WO-A-2006/013468 WO-A-2007/070750 WO-A1-01/85797 WO-A2-2005/051998 EWERT S ET AL: "STRUCTURE-BASED IMPROVEMENT OF THE BIOPHYSICAL PROPERTIES OF IMMUNOGLOBULIN VH DOMAINS WITH A GENERALIZABLE APPROACH" BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, EASTON, PA.; US, vol. 42, no. 6, 18 February 2003 (2003-02-18), pages 1517-1528, XP008052212 ISSN: 0006-2960 HONEGGER A ET AL: "Yet Another Numbering Scheme for Immunoglobulin Variable Domains: An Automatic Modeling and Analysis Tool" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 309, no. 3, 8 June 2001 (2001-06-08), pages 657-670, XP004626893 ISSN: 0022-2836 CHOWDHURY P S ET AL: "Improved stability and yield of a Fv-toxin fusion protein by computer design and protein engineering of the Fv" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 281, no. 5, 4 September 1998 (1998-09-04), pages 917-928, XP004457437 ISSN: 0022-2836 JUNG S ET AL: "The Importance of Framework Residues H6, H7 and H10 in Antibody Heavy Chains: Experimental Evidence for a New Structural Subclassification of Antibody VH Domains" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 309, no. 3, 8 June 2001 (2001-06-

08), pages 701-716, XP004626896 ISSN: 0022-2836

WORN A ET AL: "Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 305, no. 5, 2 February 2001 (2001-02-02), pages 989-1010, XP004465987 ISSN: 0022-2836 cited in the application

FILPULA ET AL: "Antibody engineering and modification technologies" BIOMOLECULAR ENGINEERING, ELSEVIER, NEW YORK, NY, US, vol. 24, no. 2, 1 June 2007 (2007-06-01), pages 201-215, XP022081380 ISSN: 1389-0344

CARTER P J: "POTENT ANTIBODY THERAPEUTICS BY DESIGN" NATURE REVIEWS. IMMUNOLOGY, XX, XX, vol. 6, 7 April 2006 (2006-04-07), pages 343-357, XP007901440 ISSN: 1474-1733

ZAHND CHRISTIAN ET AL: "Directed in vitro evolution and crystallographic analysis of a peptide-binding single chain antibody fragment (scFv) with low picomolar affinity" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BIRMINGHAM, US, vol. 279, no. 18, 30 April 2004 (2004-04-30), pages 18870-18877, XP002406477 ISSN: 0021-9258

HOET RENE MICHAEL ET AL: "Generation of high-affinity human antibodies by combining donor-derived and synthetic complementarity-determining-region diversity" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 23, no. 3, 1 March 2005 (2005-03-01), pages 344-348, XP002421213 ISSN: 1087-0156

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

Patentkrav

1. Fremgangsmåte for å konstruere en immunobinder, der immunobinderen omfatter (i) en variabel region i tungkjeden, eller et fragment derav, der
 5 tungkjedens variable region omfatter V_H -strukturester og/eller (ii) en variabel region i lettkjeden, eller et fragment derav, der lettkjedens variable region omfatter V_L -strukturester, idet fremgangsmåten omfatter:

A) å velge én eller flere aminosyreposisjoner i V_H -strukturestene, V_L -strukturestene eller V_H - og V_L -strukturestene for mutasjon; og

10 B) å mutere den ene eller de flere aminosyreposisjonene valgt for mutasjon, a) hvori dersom den ene eller de flere aminosyreposisjonene i tungkjeden valgt for mutasjon er av en variabel region i tungkjeden av den humane VH3-familien, omfatter mutasjonen én eller flere substitusjoner valgt fra gruppen bestående av:

15 (i) glutamin (Q) ved aminosyreposisjon 1 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;

(ii) glutamin (Q) ved aminosyreposisjon 6 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;

20 (iii) treonin (T) eller alanin (A) ved aminosyreposisjon 7 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;

(iv) alanin (A), valin (V) eller fenylalanin (F) ved aminosyreposisjon 89 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 78 ved å bruke Kabat-nummereringssystem); og

25 (v) arginin (R), glutamin (Q), isoleucin (I), leucin (L), metionin (M) eller fenylalanin (F) ved aminosyreposisjon 103 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 89 ved å bruke Kabat-nummerering);

b) hvori dersom den ene eller de flere aminosyreposisjonene i tungkjeden valgt for mutasjon er av en variabel region i tungkjeden av den humane VH1a-familien, omfatter mutasjonen én eller flere substitusjoner valgt fra gruppen
 30 bestående av:

(i) glutaminsyre (E) ved aminosyreposisjon 1 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;

(ii) glutaminsyre (E) ved aminosyreposisjon 6 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;

35 (iii) leucin (L) ved aminosyreposisjon 12 ved å bruke AHo- nummereringssystem (aminosyreposisjon 11 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);

- (iv) metionin (M) ved aminosyreposisjon 13 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 12 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- 5 (v) glutaminsyre (E) eller glutamin (Q) ved aminosyreposisjon 14 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 13 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- (vi) leucin (L) ved aminosyreposisjon 19 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 18 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- 10 (vii) isoleucin (I) ved aminosyreposisjon 21 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 20 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- (viii) fenylalanin (F), serin (S), histidin (H) eller asparaginsyre (D) ved aminosyreposisjon 90 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 79 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- 15 (ix) asparaginsyre (D) eller glutamin (Q) ved aminosyreposisjon 92 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 81 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- (x) glysin (G), asparagin (N) eller treonin (T) ved aminosyreposisjon 95 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 82b ved å bruke Kabat-nummereringssystem); og
- 20 (xi) treonin (T), alanin (A), prolin (P) eller fenylalanin (F) ved aminosyreposisjon 98 ved å bruke AHo-nummerering (aminosyreposisjon 84 ved å bruke Kabat-nummerering);
- c) hvori dersom den ene eller de flere aminosyreposisjonene i tungkjeden valgt for mutasjon er av en variabel region i tungkjeden av den humane VH1b-familien, omfatter mutasjonen én eller flere substitusjoner valgt fra gruppen bestående av:
- 25 (i) glutaminsyre (E) ved aminosyreposisjon 1 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
- 30 (ii) treonin (T), prolin (P), valin (V) eller asparaginsyre (D) ved aminosyreposisjon 10 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 9 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- (iii) leucin (L) ved aminosyreposisjon 12 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 11 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- 35 (iv) valin (V), arginin (R), glutamin (Q) eller metionin (M) ved aminosyreposisjon 13 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 12 ved å bruke Kabat-nummereringssystem):

- (v) glutaminsyre (E), arginin (R) eller metionin (M) ved aminosyreposisjon 14 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 13 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- 5 (vi) arginin (R), treonin (T) eller asparagin (N) ved aminosyreposisjon 20 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 19 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- (vii) isoleucin (I), fenylalanin (F), eller leucin (L) ved aminosyreposisjon 21 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 20 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- 10 (viii) lysin (K) ved aminosyreposisjon 45 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 38 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- (ix) treonin (T), prolin (P), valin (V) eller arginin (R) ved aminosyreposisjon 47 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 40 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- 15 (x) lysin (K), histidin (H) eller glutaminsyre (E) ved aminosyreposisjon 50 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 43 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- (xi) isoleucin (I) ved aminosyreposisjon 55 ved å bruke AHo-nummerering (aminosyreposisjon 48 ved å bruke Kabat-nummerering);
- 20 (xii) lysin (K) ved aminosyreposisjon 77 ved å bruke AHo-nummerering (aminosyreposisjon 66 ved å bruke Kabat-nummerering);
- (xiii) alanin (A), leucin (L) eller isoleucin (I) ved aminosyreposisjon 78 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 67 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- 25 (xiv) glutaminsyre (E), treonin (T) eller alanin (A) ved aminosyreposisjon 82 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 71 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- (xv) treonin (T), serin (S) eller leucin (L) ved aminosyreposisjon 86 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 75 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- 30 (xvi) asparaginsyre (D), asparagin (N) eller glysin (G) ved aminosyreposisjon 87 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 76 ved å bruke Kabat-nummereringssystem); og
- (xvii) asparagin (N) eller serin (S) ved aminosyreposisjon 107 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 93 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- 35

d) hvori dersom den ene eller de flere aminosyreposisjonene i lettkjeden er valgt for mutasjon er av en variabel region i lettkjeden av den humane Vk1-familien, omfatter mutasjonen én eller flere substitusjoner valgt fra gruppen bestående av:

- 5 (i) glutaminsyre (E) eller isoleucin (I) ved aminosyreposisjon 1 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
 - (ii) valin (V) eller isoleucin (I) ved aminosyreposisjon 3 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
 - (iii) valin (V), leucin (L) eller isoleucin (I) ved aminosyreposisjon 4 ved å bruke
10 AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
 - (iv) glutamin (Q) ved aminosyreposisjon 24 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
 - (v) arginin (R) eller isoleucin (I) ved aminosyreposisjon 47 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 39 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
15
 - (vi) arginin (R), glutaminsyre (E) treonin (T), metionin (M) eller glutamin (Q) ved aminosyreposisjon 50 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 42 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
 - (vii) histidin (H), serin (S) eller fenylalanin (F) ved aminosyreposisjon 57 ved å
20 bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 49 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
 - (viii) fenylalanin (F) ved aminosyreposisjon 91 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 73 ved å bruke Kabat-nummereringssystem); og
 - 25 (ix) valin (V), serin (S), glysin (G) eller isoleucin (I) ved aminosyreposisjon 103 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 85 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- e) hvori dersom den ene eller de flere aminosyreposisjonene i lettkjeden valgt for mutasjon er av en variabel region i lettkjeden av den humane Vk3-familien, omfatter mutasjonen én eller flere substitusjoner valgt fra gruppen bestående av:
- 30 (i) treonin (T) ved aminosyreposisjon 2 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
 - (ii) treonin (T) ved aminosyreposisjon 3 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
35
 - (iii) isoleucin (I) ved aminosyreposisjon 10 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;

- (iv) tyrosin (Y) ved aminosyreposisjon 12 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
- (v) serin (S) ved aminosyreposisjon 18 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
- 5 (vi) alanin (A) ved aminosyreposisjon 20 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
- (vii) metionin (M) ved aminosyreposisjon 56 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 48 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- 10 (viii) valin (V) eller treonin (T) ved aminosyreposisjon 74 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 58 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- (ix) asparagin (N) ved aminosyreposisjon 94 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 76 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- 15 (x) tyrosin (Y) eller serin (S) ved aminosyreposisjon 101 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 83 ved å bruke Kabat-nummereringssystem); og
- (xi) leucin (L) eller alanin (A) ved aminosyreposisjon 103 ved å bruke AHo-nummerering (aminosyreposisjon 85 ved å bruke Kabat-nummerering);
- 20 f) hvori dersom den ene eller de flere aminosyreposisjonene i lettkjeden valgt for mutasjon er av en variabel region i lettkjeden av den humane V λ 1-familien, omfatter mutasjonen én eller flere substitusjoner valgt fra gruppen bestående av:
- 25 (i) leucin (L), serin (S) eller glutaminsyre (E) ved aminosyreposisjon 1 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
- (ii) alanin (A), prolin (P), isoleucin (I) eller tyrosin (Y) ved aminosyreposisjon 2 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
- (iii) valin (V) eller metionin (M) ved aminosyreposisjon 4 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
- 30 (iv) glutaminsyre (E) ved aminosyreposisjon 7 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
- (v) alanin (A) ved aminosyreposisjon 11 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
- 35 (vi) treonin (T) eller serin (S) ved aminosyreposisjon 14 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;

- (vii) histidin (H) ved aminosyreposisjon 46 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 38 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- 5 (viii) treonin (T), serin (S), asparagin (N), glutamin (Q) eller prolin (P) ved aminosyreposisjon 53 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 45 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- (ix) arginin (R) eller glutamin (Q) ved aminosyreposisjon 82 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 66 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- 10 (x) glysin (G), treonin (T) eller asparaginsyre (D) ved aminosyreposisjon 92 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 74 ved å bruke Kabat-nummereringssystem); og
- (xi) valin (V), treonin (T), histidin (H) eller glutaminsyre (E) ved aminosyreposisjon 103 ved å bruke AHo-nummerering (aminosyreposisjon 85
- 15 ved å bruke Kabat-nummerering).

2. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori mutasjonen ytterligere omfatter én eller flere tungkjedesubstitusjoner valgt fra gruppen bestående av:

- (i) serin (S) ved aminosyreposisjon 12 ved å bruke AHo eller Kabat;
- 20 (ii) serin (S) ved aminosyreposisjon 103 ved å bruke AHo-nummerering (aminosyreposisjon 85 ved å bruke Kabat-nummerering); og
- (iii) serin (S) eller treonin (T) ved aminosyreposisjon 144 ved å bruke AHo-nummerering (aminosyreposisjon 103 ved å bruke Kabat-nummerering).

25 3. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori mutasjonen ytterligere omfatter følgende tungkjedesubstitusjoner:

- (i) serin (S) ved aminosyreposisjon 12 ved å bruke AHo eller Kabat;
- (ii) serin (S) ved aminosyreposisjon 103 ved å bruke AHo-nummerering (aminosyreposisjon 85 ved å bruke Kabat-nummerering); og
- 30 (iii) serin (S) eller treonin (T) ved aminosyreposisjon 144 ved å bruke AHo-nummerering (aminosyreposisjon 103 ved å bruke Kabat-nummerering).

4. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1-3, hvori immunobinderen er et scFv-antistoff, et fullengdes immunoglobulin, et Fab-fragment, en Dab eller et Nanolegeme.

35

5. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori dersom den ene eller de flere aminosyreposisjonene i tungkjeden valgt for mutasjon er av en variabel region i tungkjeden av VH3-familien, omfatter mutasjonen én eller flere substitusjoner valgt fra gruppen bestående av:

- 5 (i) glutamin (Q) ved aminosyreposisjon 1 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
- (ii) glutamin (Q) ved aminosyreposisjon 6 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
- 10 (iii) treonin (T) ved aminosyreposisjon 7 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
- (iv) valin (V) ved aminosyreposisjon 89 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 78 ved å bruke Kabat-nummereringssystem); og
- (v) leucin (L) ved aminosyreposisjon 103 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 89 ved å bruke Kabat-nummerering).

15

6. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori dersom den ene eller de flere aminosyreposisjonene i tungkjeden valgt for mutasjon er av en variabel region i tungkjeden av VH1a-familien, omfatter mutasjonen én eller flere substitusjoner valgt fra gruppen bestående av:

- 20 (i) glutaminsyre (E) ved aminosyreposisjon 1 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
- (ii) glutaminsyre (E) ved aminosyreposisjon 6 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
- 25 (iii) leucin (L) ved aminosyreposisjon 12 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 11 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- (iv) metionin (M) ved aminosyreposisjon 13 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 12 ved å bruke Kabat-nummereringssystem):
- 30 (v) glutaminsyre (E) ved aminosyreposisjon 14 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 13 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- (vi) leucin (L) ved aminosyreposisjon 19 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 18 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- 35 (vii) isoleucin (I) ved aminosyreposisjon 21 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 20 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);

(viii) fenylalanin (F), serin (S), histidin (H) eller asparaginsyre (D) ved aminosyreposisjon 90 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 79 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);

5 (ix) asparaginsyre (D) ved aminosyreposisjon 92 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 81 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);

(x) glysin (G) ved aminosyreposisjon 95 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 82b ved å bruke Kabat-nummereringssystem); og

10 (xi) fenylalanin (F) ved aminosyreposisjon 98 ved å bruke AHo-nummerering (aminosyreposisjon 84 ved å bruke Kabat-nummerering);

7. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori dersom den ene eller de flere aminosyreposisjonene i tungkjeden er valgt for mutasjon er av en variabel region i tungkjeden av den humane VH1b-familien, omfatter mutasjonen én eller flere substitusjoner valgt fra gruppen bestående av:

15 (i) glutaminsyre (E) ved aminosyreposisjon 1 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;

20 (ii) treonin (T), ved aminosyreposisjon 10 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 9 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);

(iii) leucin (L) ved aminosyreposisjon 12 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 11 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);

(iv) valin (V), ved aminosyreposisjon 13 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 12 ved å bruke Kabat-nummereringssystem):

25 (v) arginin (R) ved aminosyreposisjon 14 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 13 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);

(vi) asparagin (N) ved aminosyreposisjon 20 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 19 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);

30 (vii) leucin (L) ved aminosyreposisjon 21 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 20 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);

(viii) lysin (K) ved aminosyreposisjon 45 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 38 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);

35 (ix) arginin (R) ved aminosyreposisjon 47 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 40 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);

- (x) lysin (K) ved aminosyreposisjon 50 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 43 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- (xi) isoleucin (I) ved aminosyreposisjon 55 ved å bruke AHo-nummerering (aminosyreposisjon 48 ved å bruke Kabat-nummerering);
- 5 (xii) lysin (K) ved aminosyreposisjon 77 ved å bruke AHo-nummerering (aminosyreposisjon 66 ved å bruke Kabat-nummerering);
- (xiii) alanin (A) ved aminosyreposisjon 78 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 67 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- 10 (xiv) glutaminsyre (E) ved aminosyreposisjon 82 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 71 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- (xv) treonin (T) ved aminosyreposisjon 86 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 75 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
- 15 (xvi) asparagin (N) ved aminosyreposisjon 87 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 76 ved å bruke Kabat-nummereringssystem); og
- (xvii) asparagin (N) ved aminosyreposisjon 107 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 93 ved å bruke Kabat-nummereringssystem).
- 20

8. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori dersom den ene eller de flere aminosyreposisjonene i lettkjeden valgt for mutasjon er av en variabel region i
- 25 lettkjeden av Vk1-familien, omfatter mutasjonen én eller flere substitusjoner valgt fra gruppen bestående av:
- (i) glutaminsyre (E) ved aminosyreposisjon 1 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
- (ii) valin (V) ved aminosyreposisjon 3 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
- 30 (iii) leucin (L) ved aminosyreposisjon 4 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
- (iv) glutamin (Q) ved aminosyreposisjon 24 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
- 35 (v) arginin (R) ved aminosyreposisjon 47 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 39 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);

(vi) arginin (R), glutaminsyre (E) treonin (T), metionin (M) eller glutamin (Q) ved aminosyreposisjon 50 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 42 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);

5 (vii) serin (S) ved aminosyreposisjon 57 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 49 ved å bruke Kabat-nummereringssystem); og

(viii) fenylalanin (F) ved aminosyreposisjon 91 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 73 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);

10 (ix) valin (V) ved aminosyreposisjon 103 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 85 ved å bruke Kabat-nummereringssystem).

9. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori dersom den ene eller de flere aminosyreposisjonene i lettkjeden er valgt for mutasjon er av en variabel region i lettkjeden av Vk3-familien, omfatter mutasjonen én eller flere substitusjoner valgt fra gruppen bestående av:

15 (i) treonin (T) ved aminosyreposisjon 2 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;

(ii) treonin (T) ved aminosyreposisjon 3 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;

20 (iii) isoleucin (I) ved aminosyreposisjon 10 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;

(iv) tyrosin (Y) ved aminosyreposisjon 12 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;

25 (v) serin (S) ved aminosyreposisjon 18 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;

(vi) alanin (A) ved aminosyreposisjon 20 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;

30 (vii) metionin (M) ved aminosyreposisjon 56 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 48 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);

(viii) treonin (T) ved aminosyreposisjon 74 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 58 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);

35 (ix) asparagin (N) ved aminosyreposisjon 94 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 76 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);

(x) serin (S) ved aminosyreposisjon 101 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 83 ved å bruke Kabat-nummereringssystem); og
 (xi) alanin (A) ved aminosyreposisjon 103 ved å bruke AHo-nummerering (aminosyreposisjon 85 ved å bruke Kabat-nummerering).

5

10. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori dersom den ene eller de flere aminosyreposisjonene i lettkjeden valgt for mutasjon er av en variabel region i lettkjeden av V λ 1-familien, omfatter mutasjonen én eller flere substitusjoner valgt fra gruppen bestående av:

- 10 (i) leucin (L) ved aminosyreposisjon 1 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
 (ii) prolin (P) ved aminosyreposisjon 2 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
 (iii) valin (V) ved aminosyreposisjon 4 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
 15 (iv) serin (S) ved aminosyreposisjon 7 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
 (v) alanin (A) ved aminosyreposisjon 11 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
 20 (vi) treonin (T) ved aminosyreposisjon 14 ved å bruke AHo- eller Kabat-nummereringssystem;
 (vii) histidin (H) ved aminosyreposisjon 46 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 38 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
 25 (viii) treonin (T), serin (S), asparagin (N), glutamin (Q) eller prolin (P) ved aminosyreposisjon 53 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 45 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
 (ix) arginin (R) ved aminosyreposisjon 82 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 66 ved å bruke Kabat-nummereringssystem);
 30 (x) treonin (T) ved aminosyreposisjon 92 ved å bruke AHo-nummereringssystem (aminosyreposisjon 74 ved å bruke Kabat-nummereringssystem); og
 (xi) valin (V) ved aminosyreposisjon 103 ved å bruke AHo-nummerering (aminosyreposisjon 85 ved å bruke Kabat-nummerering).

35

11. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 5-10, hvori mutasjonen ytterligere omfatter én eller flere tungkjedesubstitusjoner valgt fra gruppen bestående av:

- (i) serin (S) ved aminosyreposisjon 12 ved å bruke AHo eller Kabat;
- (ii) serin (S) ved aminosyreposisjon 103 ved å bruke AHo-nummerering (aminosyreposisjon 85 ved å bruke Kabat-nummerering); og
- (iii) serin (S) eller treonin (T) ved aminosyreposisjon 144 ved å bruke AHo-nummerering (aminosyreposisjon 103 ved å bruke Kabat-nummerering).

12. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 5-10, hvori mutasjonen ytterligere omfatter følgende tungkjedesubstitusjoner:

- (i) serin (S) ved aminosyreposisjon 12 ved å bruke AHo eller Kabat;
- (ii) serin (S) ved aminosyreposisjon 103 ved å bruke AHo-nummerering (aminosyreposisjon 85 ved å bruke Kabat-nummerering); og
- (iii) serin (S) eller treonin (T) ved aminosyreposisjon 144 ved å bruke AHo-nummerering (aminosyreposisjon 103 ved å bruke Kabat-nummerering).

13. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 8-12, hvori immunobinderen er et scFv-antistoff, et fullengdes immunoglobulin, et Fab-fragment, en Dab eller et Nanolegeme.

14. Fremgangsmåte for å konstruere en immunobinder, der immunobinderen omfatter tungkjede CDR1-, CDR2- og CDR3-sekvenser, der fremgangsmåten omfatter å sette inn tungkjede CDR1-, CDR2- og CDR3-sekvensene i et tungkjedestrukturskjelett, der tungkjedestrukturskjelettet omfatter en aminosyresekvens som vist i figur 9 (SEQ ID NO:1), figur 10 (SEQ ID NO:2), figur 11 (SEQ ID NO:3), SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO:8, eller SEQ ID NO:9, under forutsetning av at aminosyresekvensen ikke er kimlinjens konsensussekvens.

15. Fremgangsmåten ifølge krav 14, hvori tungkjedestrukturskjelettet omfatter en aminosyresekvens som vist i figur 9 (SEQ ID NO: 1).

16. Fremgangsmåten ifølge krav 14, hvori tungkjedestrukturskjelettet omfatter en aminosyresekvens som vist i figur 10 (SEQ ID NO:2).

17. Fremgangsmåten ifølge krav 14, hvori tungkjedestrukturskjelettet omfatter en aminosyresekvens som vist i figur 11 (SEQ ID NO:3).

18. Fremgangsmåte for å konstruere en immunobinder, der immunbinderen omfatter lettkjede CDR1-, CDR2- og CDR3-sekvenser, der fremgangsmåten omfatter å sette inn lettkjede CDR1-, CDR2- og CDR3-sekvensene i et lettkjedestrukturskjelett, der lettkjedestrukturskjelettet omfatter en aminosyresekvens som vist i figur 12 (SEQ ID NO:4), figur 13 (SEQ ID NO:5), figur 14 (SEQ ID NO:6), SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, eller SEQ ID NO: 12, under forutsetning av at aminosyresekvensen ikke er kimlinjens konsensussekvens.

19. Fremgangsmåten ifølge krav 18, hvori lettkjedestrukturskjelettet omfatter en aminosyresekvens som vist i figur 12 (SEQ ID NO:4).

20. Fremgangsmåten ifølge krav 18, hvori lettkjedestrukturskjelettet omfatter en aminosyresekvens som vist i figur 13 (SEQ ID NO:5).

21. Fremgangsmåten ifølge krav 18, hvori lettkjedestrukturskjelettet omfatter en aminosyresekvens som vist i figur 14 (SEQ ID NO:6).

22. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 18-21, hvori immunbinderen er et scFv-antistoff.

23. Isolert tungkjedestrukturskjelett omfattende en aminosyresekvens som vist i figur 9 (SEQ ID NO: 1), figur 10 (SEQ ID NO:2) eller figur 11 (SEQ ID NO:3) under forutsetning av at aminosyresekvensen ikke er kimlinjens konsensussekvens.

24. Isolert lettkjedestrukturskjelett omfattende en aminosyresekvens som vist i figur 12 (SEQ ID NO:4), figur 13 (SEQ ID NO:5) eller figur 14 (SEQ ID NO:6) under forutsetning av at aminosyresekvensen ikke er kimlinjens konsensussekvens.