



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2167128 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2013.03.04
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2012.10.24
(86)	Europeisk søknadsnr	08784834.7
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.07.17
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.03.31
(30)	Prioritet	2007.07.17, EP, 07013964
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	Merck Patent GmbH, Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt, Tyskland
(72)	Oppfinner	GOODMAN, Simon, Hahlgartenstrasse 29, 64347 Griesheim, Tyskland HAHN, Diane, Im Berggarten 2, 64342 Seeheim-Jugenheim, Tyskland MITJANS, Francesc, Pujadas 78, 42a, E-08700 Igualada, Spania ADAN, Jaume, Pujol, 28, E-08310 Mataro, Spania LO, Kin-Ming, 6 Carol Lane, Lexington, MA 02420, USA
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Modifiserte anti-alfa V-integrin-hybridantistoffer
(56)	Anførte publikasjoner	EP-A- 1 362 868 US-A- 5 985 278 WO-A-2004/056308 WO-A-2005/016969 WO-A-2007/076950 LACAL JUAN-CARLOS ET AL: "Targeted search for anticancer drugs--CNIO cancer conference. 16-18 March, Madrid, Spain." IDRUGS : THE INVESTIGATIONAL DRUGS JOURNAL MAY 2003, vol. 6, no. 5, May 2003 (2003-05), pages 437-441, XP002506406 ISSN: 1369-7056 RADER C ET AL: "A PHAGE DISPLAY APPROACH FOR RAPID ANTIBODY HUMANIZATION: DESIGNED COMBINATORIAL V GENE LIBRARIES" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC.; US, vol. 95, 21 July 1998 (1998-07-21), pages 8910-8915, XP000941357 ISSN: 0027-8424

Beskrivelse

OPPFINNELSENS OMRÅDE

[0001] Oppfinnelsen gjelder modifiserte antistoffer som spesifikt bindes til integrinreseptorer, særlig alfa V-integrinreseptorsubenheten. Antistoffene omfatter de antigenbindende setene (CDR) fra et kjent anti-integrin-antistoff fra mus, så vel som hybride variable lett kjedesequenser, muterte variable tungkjedesequenser (Fr) og modifiserte konstante tungkjedesequenser. De nye antistoffene har forbedrede immunogene egenskaper og ekspresjonsegenskaper og utløser utmerkede anti-angiogene aktiviteter så vel som anti-tumoraktiviteter i mennesker i monoterapi, men også, og fremfor alt i kombinasjon med andre angiogenese- og tumorinhiberende midler, som cilengitide, cetuximab og kjemoterapeutiske midler.

OPPFINNELSENS BAKGRUNN

[0002] Behandling av kreft er fortsatt et hovedproblem i helsepleien. En foreslått strategi for behandling av kreft er inhibering av angiogenese, og derved inhibering av dannelse og utvikling av blodkar som forsyner tumoren med vekstrelevante stoffer. En andre strategi er direkte inhibering av spesifikke reseptorer på overflaten av tumorceller, for eksempel inhibering av Her2 med Herceptin® eller inhibering av EGFR med cetuximab (Erbix®).

[0003] Inhibitorer av integriner anses som potensielt anvendbare anti-tumormidler, siden integriner uttrykkes på tumor-neovaskulatur og formidler angiogenese. I tillegg uttrykkes integriner på visse tumorceller og kan direkte fremme tumorvekst og -overlevelse.

[0004] Integriner har ingen enzymatisk aktivitet, men integriner som er i stand til å binde sine ligander (ligandkompetente integriner) aktiveres ved binding til proteiner i ECM. Integriner utløser på den ene side intracellulære kinasekaskader for modulering av cellevekst og -overlevelse, og assosierer på den annen side med cytoskjelettet for styring av feste av celler og celleforflytning. $\alpha\beta 5$ -integrin binder spesifikt vitronektin, mens $\alpha\beta 3$ også binder andre makromolekyler i den provisoriske ECM. $\alpha\beta 3$ ble først bemerket i kreft som en progresjonsavhengig markør for malignt melanom. Proteinene fremmet melanomvekst *in vivo* og overlevelse *in vitro*. $\alpha\beta 3$ -blokkere reverserte disse virkningene. Senere ble $\alpha\beta 3$ funnet i andre tumorer, deriblant glioblastom, nyrekarsinomer, ovariekarsinomer og andre. $\alpha\beta 3$ var også i stor grad overuttrykt i EC i mange ondartede svulster. *In vitro* overuttrykte angiogene modeller aktivert med tumoravledede vekstfaktorer $\alpha\beta 3$ og krevde $\alpha\beta 3$ på den voksende vaskulaturen, mens blokkering av $\alpha\beta 3$ og $\alpha\beta 5$ kunne undertrykke den angiogene fenotypen. $\alpha\beta 5$ ble også vist å understøtte den neovaskulatur som induseres av noen tumoravledede vekstfaktorer. Inhibering av $\alpha\beta 4$ kan utløse apoptose av tumorceller.

[0005] Integrinreseptorene overuttrykkes på tumorinvasive blodkar, på melanomer og noen andre ondartede svulster og modulerer cellens respons på vekstfaktorer. Den vaskulære seksjonen er et lovende terapeutisk målvev, siden faste tumorer er avhengige av blodkar for oksygen, næring, detoksifisering og spredning av blodbårne metastaser, omstillingen til den angiogene fenotype markerer et adskilt trinn i induksjonen av ondartethet som er mottakelig for terapeutisk intervensjon, og vaskulaturen gjennomgår kontinuerlig endring, men endotelceller har likevel genomisk stabilitet sammenlignet med tumoren og vil mindre sannsynlig bli medikamentresistente grunnet mutasjon.

[0006] Et første anti-integrinmedikament er cilengitide, som anses å være et nyttig antitumormiddel (Eskens FA, et al. (2003) Eur J Cancer 39:917-26). Cilengitide er imidlertid et lite molekyl som må doseres hyppig. Strukturen av cilengitide, den utvalgte saltform er for eksempel beskrevet i EP0770622, WO 0015244 og PCT/US07/01446 og beskrives heri ved referanse.

[0007] Et andre anti-integrinmedikament er muse-mAb 17E6 (EMD 73034), som spesifikt inhiberer α v-integrinsubenheten på celler som bærer human integrinreseptor. IgG1-antistoffet fra mus beskrives for eksempel av Mitjans et al. (1995, J. Cell Sci. 108, 2825) og i patentskriftene US 5985278 og EP 719859. De fullstendige sekvensene til den variable tungkjede og lett kjede vises i SEKV. ID. NR. 25 og 26 (Figur 20A, B). Muse-17E6 ble frembrakt fra mus immunisert med rensset og Sepharose-immobilisert humant α v β 3. Lymfocytter fra milt fra immuniserte mus ble fusjonert med muse-mylomceller, og en av de resulterende hybridomene produserte det monoklonale antistoff 17E6 (EMD 73034). Muse-mAb 17E6 produseres av hybridomcellelinjen 272-17E6 og er deponert under aksesjonsbetegnelsen DSM ACC2160.

[0008] Muse-17E6 antagoniserer integrins interaksjon med den ekstracellulære matriks (ECM) og forstyrrer funksjonen av endotelceller og tumorceller. De primære virkningene av antistoffet omfatter forstyrrelse av endotelcelle (EC)-adhesjon og -bevegelse, induksjon av apoptose av cellene og undertrykkelse av aktivering av vekstfaktor-signalveier. Blokkering med dette antistoffet undertrykker direkte overlevelse av både de aktiverte endotelcellene og noen tumorceller.

[0009] Monoklonale antistoffer som 17E6 er generelt anvendbare for inhibering av ekstracellulære protein-protein-interaksjoner, for eksempel inhibering av ligand-reseptor-interaksjoner. Monoklonale antistoffer er imidlertid ofte vanskelige å uttrykke og utløser ofte en immunrespons, for eksempel en anti-idiotypisk respons, noe som begrenser deres effektivitet.

[0010] Disse resultatene og viktig kunnskap oppsamlet understøttet så langt behovet for utvikling av et modifisert muse-17E6-antistoff med forbedrede egenskaper, som spesifikt bindes til integriner, som kan uttrykkes effektivt og som er relativt ikke-immunogent i mennesker, som et terapeutisk middel ved kreft. Et slik modifisert

antistoff bør ha potensial til indirekte undertrykkelse av utviklingen av tumoren via tumorvaskulaturen, og direkte virkning på tumorcellene selv.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

[0011] Oppfinnelsen gjelder nye antistoffer med de biologiske egenskapene til det monoklonale museantistoff 17E6 (EMD 73034), men med forbedrede egenskaper, fremfor alt når det gjelder immunogenisitet i mennesker og tilfredsstillende ekspresjon i pattedyrs-ekspresjonssystemer i en skala for industriell produksjon og fremstilling.

[0012] Oppfinnelsen tilveiebringer noen få modifiserte antistoffer med modifiserte sekvenser som gjenkjenner den samme reseptorepitop som museantistoff 17E6, men som viser redusert immunogenisitet i mennesker og som kan uttrykkes bedre enn det tilsvarende ikke-modifiserte antistoff.

[0013] Det bør bemerkes at modifisering eller konstruksjon av et museavledet antistoff for å oppnå redusert immunogenisitet i mennesker som regel ledsages av et klart tap av ekspresjon og/eller bindingsaffinitet. Således fører kimerisering eller humanisering ifølge velkjente standardteknikker vanligvis til redusert ekspresjon, bindingsaffinitet osv., noe som bare delvis kan løses ved hjelp av spesifikke tilbakemutasjoner eller andre tiltak. Modifikasjoner i et angjeldende proteinmolekyl som samtidig gir redusert immunogenisitet, høy ekspresjon og tilfredsstillende bindingsaffinitet kan ikke forutsies. Således kan en reduksjon av antall T-cellepitoper for å fjerne eller redusere en immunrespons mot medikamentet i et menneske, som et primært problem å løse, føre til et ikke akseptabelt tap av ekspresjon, bindingsaffinitet eller begge deler, noe som vil føre til andre problemer som må løses.

[0014] Det er derfor et formål med den foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe modifiserte antistoffer med en definert målspesifisitet som gir redusert immunogenisitet, tilfredsstillende ekspresjon og god bindingsaffinitet. Disse egenskapene kan oppnås ved hjelp av overraskende modifikasjoner i det opprinnelige kildemolekyl, muse-mAb 17E6. I mange av eksperimentene er det fornuftig å sammenligne resultatene, ikke direkte med museantistoff 17E6, men med en kimær 17E6-versjon (som inneholder humane konstante områder). Vellykkede kimære antistoffer innen faget viser som regel tilstrekkelig bindingsaffinitet og tilstrekkelig ekspresjon, men utløser ofte en immunogen respons i et menneske.

[0015] I hovedsak tilveiebringer oppfinnelsen modifiserte, rekombinante anti-av-integrin-hybridantistoffer med redusert eller fjernet immunogenisitet i mennesker som omfatter:

- (i) et CDR-lettkjede- og -tungkjedeområde avledet fra det monoklonale anti α -integrin-antistoff 17E6 fra mus
- (ii) et lettkjede-rammeverkområde som er tatt fra det humaniserte monoklonale anti-EGFR-antistoff 425,

(iii) et tungkjede-rammeverkområde som er avledet fra det monoklonale anti α v-integrin-antistoff 17E6 fra mus, og

(iv) et konstant tungkjedeområde avledet fra humant IgG og et humant konstant lettkjedeområde.

5 **[0016]** Det humaniserte monoklonale antistoff 425 (matuzumab) er kjent, for eksempel fra EP 531 472, og er avledet fra det tilsvarende museantistoff 425 (muse-mAb 425, ATCC HB9629). Antistoffet ble frembrakt mot den humane karsinom-cellelinjen A431 og ble funnet å bindes til en polypeptidepitop på det ytre domene av human epidermal vekstfaktorreseptor (EGFR). Antistoffet ble funnet å inhibere
10 bindingen av epidermal vekstfaktor (EGF) til både lavaffinitets- og høyaffinitets-EGFR-seter. Matuzumab har vist høy aktivitet i kliniske utprøvnings- FR-sekvensene i lettkjeden til matuzumab er vist i SEKV.ID. NR. 12-15, som spesifisert nedenfor, og i kravene.

[0017] Det å kombinere modifiserte rammeverkområder (FR - framework region) fra
15 tungkjeden i anti-integrin-antistoff 17E6 fra mus med rammeverkområder fra et forskjellig, spesifikt humanisert anti-EGFR-antistoff, h425 (matuzumab), har frembrakt - i tillegg til annen modifisering - noen antistoffer med overlegne immunogene egenskaper som i tillegg uttrykkes i tilstrekkelig grad i standard pattedyrs-ekspresjonssystemer. Ved anvendelse av VL-området (FR) fra mAb h425 oppnås en overraskende
20 økning av ekspresjonsnivået, men som vist senere måtte ytterligere mutasjoner innføres for å forbedre andre egenskaper, fremfor alt bindingsaffiniteten.

[0018] En annen viktig modifikasjon er utbyttingen av en aminosyrerest i CDR2-området i tungkjeden i muse-17E6. Ved å erstatte en cysteinrest med en tyrosinrest kan overraskende nok proteinstabiliteten og ekspresjonsnivået klart forbedres, i det minste
25 sammenlignet med en kimær 17E6-versjon.

[0019] Ytterligere forbedringer av ekspresjon og stabilitet kan oppnås ved å erstatte det opprinnelige konstante område i muse-IgG2-tungkjeden med et humant IgG2 med modifisert humant IgG1-hengselområde. I en foretrukket utførelse kan dette IgG2 modifiseres videre ved å erstatte en argininrest i posisjon 297 med en glutaminrest
30 (N297Q). Denne modifikasjonen fjerner et N-glykosyleringssete og fjerner eller reduserer derfor ADCC- og CDC-aktiviteten til antistoffene som skal modifiseres. Uheldig nok øker immunogenisiteten ved dette tiltaket, tilsynelatende grunnet dannelse av en ny T-cellepitop. Overraskende nok kan lavere immunogenisitet gjenvinnes ved å erstatte fenylalanin med alanin i posisjon 296.

35 **[0020]** For å redusere antall T-cellepitoper i det opprinnelige tungkjede-rammeverkområde i muse-mAb17E6 har en rekke mutasjoner blitt utført. I detalj er mutasjoner i en, flere eller alle følgende posisjoner i museantistoffet: A9, E13, M20, K38, R40, A72, S76, Q82, G85, T87, S91 og S113 nødvendige for å redusere immunogenisiteten.

[0021] Et foretrukket modifisert antistoff ifølge oppfinnelsen som viser de beste verdiene for forbedrede egenskaper betegnes i det påfølgende "DI-17E6" eller synonymt "DI-17E6g2h(N297Q)" eller EMD 525797", og har følgende sekvens:

(i) variable og konstante lettkjedesequenser (SEKV.ID. NR. 3, Figur 1 C):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSNYLAWYQQKPGKAPKLLIYYTSKIH
GVPSRFGSGSGTDYFTFTISSLQPEDYATYYCQQGNTFPYTFGQGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5 og

(ii) variable og konstante tungkjedesequenser (SEKV.ID. NR. 4, Figur 1 D):

QVQLQQSGGELAKPGASVKVCSKASGYTFSSFWMHWRQAPGGLEWIGYINP
RSQYTEYNEIFRDKATMTTDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASFLGRGAMDY
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFNGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTV
EPKSSDKTHHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQAQSTFRVVSFLTQVHQLDNLGKEYKCKVS
NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK,

hvor de understrekede sekvensene representerer de variable områdene i CDR (i uthevet skrift). Lettkjedens konstante område er humant kappa. Tungkjedens konstante område er humant IgG2 med det modifiserte IgG1-hengselområdet

10 **EPKSSDKTHHTCPPCP** (SEKV.ID. NR. 40).

[0022] De tilsvarende DNA-sekvensene for DI-17E6 vises i Figurene 17-19.

[0023] Oppfinnelsen er også rettet mot modifiserte antistoffer som beskrevet ovenfor og nedenfor som er fusjonert direkte eller via et linker-molekyl til cytokiner, for eksempel IL-2, IL-12, TNFa, IFNa, IFNb, eller vekstfaktorer. Cytokiner fusjonert til
 15 antistoff kan også anvendes i tumorbehandling og/eller angiogeneserelaterte sykdommer, side cytotoksitet kan bidra til forhøyet cytotoxicitet. Antistoff-fusjonsproteiner, særlig immunocytokiner, er velkjente innen faget. Et foretrukket fusjonsprotein ifølge oppfinnelsen er DI-17E6-IL2, eller DI-17E6-(L)-IL2, hvori L er et linker-peptid.

20 [0024] Ifølge den foreliggende oppfinnelse ble det vist at de modifiserte antistoffene som beskrives kan anvendes i farmasøytiske sammensetninger for behandling av angiogeneserelaterte sykdommer og/eller tumorrelaterte sykdommer. Overraskende nok har antistoffene ifølge oppfinnelsen en direkte virkning på tumorvekst som ser ut til å være

uavhengig av den indirekte anti-tumorstyrkingen som skyldes blokkering av angiogenesen.

[0025] Det er også et formål med oppfinnelsen å tilveiebringe farmasøytiske sammensetninger og anvendelse av dem sammen med et andre terapeutisk middel, som fortrinnsvis er et kjemoterapeutisk middel, for eksempel cisplatin, doksorubicin osv., en av-integrin-inhibitor, for eksempel RGD-peptider, for eksempel cilengitide, eller tyrosinkinaseinhibitorer, fortrinnsvis anti-erbB1- eller -erbB2-antistoffer. Foretrukne eksempler er her cetuximab (monoklonalt antistoff c225, Erbitux®), matuzumab (humanisert monoklonalt antistoff 425) eller Herceptin® (humanisert antistoff 4D5).

[0026] Ifølge oppfinnelsen kan de modifiserte antistoffene i de farmasøytiske sammensetningene som beskrives heri forsterke virkningen av det andre terapeutiske middel, i mange tilfeller ved en synergistisk interaksjon.

[0027] Ifølge oppfinnelsen gir kombinasjonen av det foretrukne modifiserte antistoff DI-17E6 eller lignende varianter og anti-EGFR-antistoffer, fortrinnsvis cetuximab, en overraskende virkning, nemlig forsinkelse eller forhindring av gjenvekst av tumorvev etter avsluttet tilførsel av det modifiserte antistoff, fortrinnsvis DI-17E6.

[0028] Den farmasøytiske sammensetningen som omfatter et andre terapeutisk middel kan også anvendes som et sett av deler som i en første emballasje omfatter det modifiserte antistoff, fortrinnsvis DI-17E6, og i en andre emballasje et andre terapeutisk middel, for eksempel en angiogeneseinhibitor, et kjemoterapeutisk middel eller en tyrosinkinaseinhibitor, for eksempel et anti-EGFR- eller anti-Her2-antistoff.

[0029] I oppsummering gjelder oppfinnelsen følgende:

- Et modifisert rekombinant anti- α v-integrin-hybridantistoff som omfatter
 - (i) et CDR-lettkjede- og -tungkjede-området avledet fra det monoklonale anti- α v-integrin-antistoff 17E6 fra mus,
 - (ii) et lettkjede-rammeverkområde som er tatt fra det humaniserte monoklonale anti-EGFR-antistoff 425,
 - (iii) et tungkjede-rammeverkområde avledet fra det monoklonale anti- α v-integrin-antistoff 17E6 fra mus, og
 - (iv) et konstant tungkjedeområde avledet fra humant IgG og et humant konstant lettkjedeområde,

hvor CDR-lettkjedeområdene, som er avledet fra det monoklonale anti- α v-integrin-antistoff 17E6 fra mus, er:

CDR1: RASQDISNYLA (SEKV.ID. NR. 5)

CDR2: YTSKIHS (SEKV.ID. NR. 6)

CDR3: QQGNTFPYT (SEKV.ID. NR. 7),

og CDR-tungkjedeområdene er:

CDR1: SFWMW (SEKV.ID. NR. 8)

CDR2: YINPRSGYTEYNEIFRD (SEKV.ID. NR. 9)

CDR3: FLGRGAMDY (SEKV.ID. NR. 10),

og hvori lettkjede-rammeverkområdet som er avledet fra det humaniserte monoklonale anti-EGFR-antistoff 425 omfatter sekvensen

FR-1: DIQMTQS PSSLSASVGDRVTITC (SEKV.ID. NR. 12)

FR-2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEKV.ID. NR. 13)

FR-3: GVPSRFSGSGSGTDYTFTISLQPEDATYYC (SEKV.ID. NR. 14)

FR-4: FGQGTKVEIK (SEKV.ID. NR. 15),

og hvori tungkjede-rammeverkområdet (FR1-FR4) som er avledet fra museantistoff 17E6 er mutert i 1-15 aminosyreposisjoner for å redusere eller fjerne antall T-celle-epitoper og derved immunogenisiteten i mennesker.

[0030] Tungkjede-rammeverkområdet er mutert i alle følgende posisjoner i museantistoffet: A9, E13, M20, K38, R40, A72, S76, Q82, G85, T87, S91 og S113 og omfatter følgende mutasjoner:

A9G, E13K, M20V, K38R, R40A, A72T, S76T, Q82E, G85S, T87R, S91T og S113T.

- Et modifisert rekombinant anti- α v-integrin-hybridantistoff som omfatter

(i) lettkjede-CDR-områdene:

CDR1: RASQDISNYLA (SEKV.ID. NR. 5)

CDR2: YTSKIHS (SEKV.ID. NR. 6)

CDR3: QQGNTFPYT (SEKV.ID. NR. 7),

(ii) tungkjede-CDR-områdene:

CDR1: SFWMW (SEKV.ID. NR. 8)

CDR2: YINPRSGYTEYNEIFRD (SEKV.ID. NR. 9)

CDR3: FLGRGAMDY (SEKV.ID. NR. 10),

(iii) lettkjede-rammeverkområdene:

FR-1: DIQMTQS PSSLSASVGDRVTITC (SEKV.ID. NR. 12)

FR-2: WYQQKPGKAPKLLIY (SEKV.ID. NR. 13)

FR-3: GVPSRFSGSGSGTDYTFTISLQPEDATYYC (SEKV.ID. NR. 14)

FR-4: FGQGTKVEIK (SEKV.ID. NR. 15),

(iv) tungkjede-rammeverkområdene

FR1: QVQLQQSGAELAEPGASVKMSCKASGYTFS (SEKV.ID. NR. 16)

FR2: WVKQRPGQGLEWIG (SEKV.ID. NR. 17)

FR3: KATMTADTSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYYCAS (SEKV.ID. NR. 18)

FR4: WGQGTSTVTVSS (SEKV.ID. NR. 19),

hvor alle aminosyrerester i uthevet skrift og understreket er mutert som beskrevet ovenfor og som følger, for å redusere eller fjerne T-celleepitoper og derved immunogenisiteten i et menneske, og

- (v) et konstant tungkjedeområde avledet fra humant IgG og et humant konstant lettkjedeområde.

- Et modifisert antistoff som beskrevet, hvori tungkjede-rammeverkområdene er:

FR1: QVQLQQSGGELAKPGASVKVSCKASGYTFS (SEKV.ID. NR. 20)

FR2: WVRQAPGQGLEWIG (SEKV.ID. NR. 21)

FR3: KATMTTDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAS (SEKV.ID. NR. 22)

FR4: WGQGTTVTVSS (SEKV.ID. NR. 23).

- Et modifisert antistoff som beskrevet, hvori det konstante tungkjedeområde er avledet fra IgG2, hvori i en foretrukket utførelse det konstante IgG2-området omfatter et modifisert IgG1-hengselområde.
- Et modifisert antistoff som beskrevet, hvori det modifiserte IgG1-hengselområdet omfatter sekvensen EPKSSDKTHTCPPCP (SEKV.ID. NR 24).
- Et modifisert antistoff som beskrevet, hvori det konstante IgG2-området er modifisert ved å erstatte aminosyre N med Q i posisjon 297 (N297Q).
- Et modifisert antistoff som beskrevet, hvori aminosyrerest F i posisjon 296 er erstattet med A (F296A) for å fjerne en T-celleepitop som dannes ved modifikasjonen i posisjon 297.
- Et modifisert antistoff som beskrevet, hvori og det konstante lett kjedeområde er humant kappa.
- Et rekombinant anti- α v-integrin-hybridantistoff betegnet "DI-17E6", som i det vesentlige består av

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLA
WYQQKPGKAPKLLIYYT
SKIH
GVPSRFGSGSGTDYFTFTIS
SLQPEDVATYYCQ
QGNTPPYTFGQGTKVEIK
RTVA
PSVFI
PPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQES
VT
EQ
DSKDSTYLS
STLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPV
TKSFNRGEC

(i) variable og konstante lett kjedesekvenser (SEKV.ID. NR. 3):

og

(ii) variable og konstante tungkjedesekvenser (SEKV.ID. NR. 4):

QVQLQQSGGELAKPGASVKVSCKASGYTF
SSFWMHWVRQAPGQGLEWIGYINP
RSGYTEYNEIFRDKATMTTDTSTSTAYMEL
SSLRSEDVAVYYCASFLGRGAMDY
WGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE
STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSNFGTQTYTCNV
DKPSNTKVDKTV
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQAQ
STFRVVS
VLTVVHQDWLNGKEYKCKV
SNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPMLDS
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK,

hvor de understrekte sekvensområdene representerer de variable områdene, innbefattet CDR (uthevet skrift). Sekvensene i uthevet skrift i de konstante områdene representerer det modifiserte hengselområdet (**EPKSSDKTHTCPPCP**) og mutasjonene i posisjon 296 og 297.

- 5 • Et fusjonsprotein som omfatter et antistoff som beskrevet som er fusjonert, fortrinnsvis via C-enden, til et cytokin eller en vekstfaktor, fortrinnsvis et cytokin.
- Et DNA-molekyl som koder for et antistoff eller antistoff-fusjonsprotein som beskrevet.
- 10 • Et ekspresjonsplasmid som omfatter DNA-segmentene som er spesifisert i Figur 15 og som er betegnet pdHL10-DI-17E6g2h(N297Q).
- Et proteinekspresjonssystem som omfatter en pattedyrvertscelle som er transformert med ekspresjonsplasmidet, hvor en human vertscelle er utelukket.
- En farmasøytisk sammensetning som omfatter et antistoff eller et antistoff-fusjonsprotein som beskrevet ovenfor og nedenfor i en farmasøytisk effektiv
- 15 mengde, om ønskelig sammen med et farmasøytisk akseptabelt bærestoff, et fortynningsmiddel eller en eksipiens.
- En farmasøytisk sammensetning som omfatter et første og et andre farmasøytisk effektivt, terapeutisk middel, hvor det første middel er et antistoff eller
- 20 antistoff-fusjonsprotein som beskrevet og det andre middel er utvalgt fra gruppen som består av: et kjemoterapeutisk middel, en angiogeneseinhibitor og et anti-tumormiddel, om ønskelig sammen med et farmasøytisk akseptabelt bærestoff, et fortynningsmiddel eller en eksipiens.
- En tilsvarende farmasøytisk sammensetning, hvor anti-tumormiddelet er et
- 25 anti-tumorantistoff, fortrinnsvis et anti-EGFR (erbB1)- eller anti-Her2 (erbB2)-antistoff, for eksempel mAb c225 (cetuximab, Erbitux®) og mAb h425 (matuzumab).
- En tilsvarende farmasøytisk sammensetning, hvor angiogenese-inhibitoren er integrin-inhibitoren cilengitide. Erbitux® og mAb h425 (matuzumab).
- 30 • Anvendelsen av et modifisert antistoff eller antistoff-fusjonsprotein som beskrevet for fremstilling av et medikament for behandling av en angiogenese-relatert sykdom og/eller faste tumorer eller tumormetastaser.
- Anvendelsen av en farmasøytisk sammensetning som beskrevet for fremstilling av et medikament for behandling av tumorer, hvor det modifiserte antistoff
- 35 forsterker virkningen av det andre middel.
- Anvendelsen av en farmasøytisk sammensetning som beskrevet for fremstilling av et medikament for behandling av tumorer, hvor det andre middel er et anti-EGFR-antistoff og det modifiserte antistoff forhindrer eller forsinker gjenvekst av tumoren etter avsluttet tilførsel av det modifiserte antistoff.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

[0031] For å redusere potensialet for immunogenisitet i mennesket ble DI-17E6 (EMD 525797) fremstilt ved av-immunisering og genetisk modifisering av museantistoff 17E6 (EMD 73034).

5 **[0032]** Av-immunisering av et antistoff ifølge oppfinnelsen betyr å påvise humane T-celleepitoper og fjerne dem fra det opprinnelige museantistoff. Denne tilnærmingen er forskjellig fra "humaniserings"-tilnærmingen, som erstatter musesekvenser med humane konsensus-sekvenser. Den benyttede av-immuniseringsteknologi beskrives for eksempel i WO 98/52976, WO 00/34317 og WO 02/69232.

10 **[0033]** De variable områdene i lett kjeden (VL) og tung kjeden (VH) i muse-17E6 analyseres *in silico* for fjerning av mulige T-hjelpercellepitoper. Av-immuniserte VH- og VL-sekvenser utformes slik at aminosyrene i musesekvensen som er avgjørende for binding, for eksempel CDR, bevares.

15 **[0034]** For optimalisering av ekspresjonen ble rammeverkområdene i lett kjeden erstattet med rammeverkområder fra et humanisert 425-antistoff. Videre ble den uparrede cystein-60 i VH, som var sjelden i VH-sekvenser, omdannet til tyrosin (C60Y) for å forbedre proteinets stabilitet.

20 **[0035]** Et av trekkene ved EMD 525797 er å ikke utløse immunresponser. For å oppnå dette ble de konstante områdene i immunoglobulinet også modifisert som følger: For lett kjeden ble det genomiske humane konstante kappa-område benyttet. For tung kjeden ble de genomiske humane gamma-2 (72) konstante områdene benyttet, men hengsel-området med de fire cystein-disulfidbroene ble erstattet med et modifisert y1-hengsel-område for å minimalisere utbyttingen av disulfidbindinger og forbedre ekspresjonen. En mutasjon av Asn-297 i CH2-domenet til Gln (N297Q) ble innført for å fjerne N-

25 glykosyleringssignalet: den medfølgende deglykosyleringen fjerner effektorfunksjoner og forlenger halveringstiden i serum for antistoffet.

[0036] Endelig ble Phe-296 mutert til Ala, noe som fjernet mulige T-cellepitoper som ble dannet ved N297Q-mutasjonen.

30 **[0037]** Det foretrukne antistoff DI-17E6, erholdt ved fremgangsmåten som kort er beskrevet ovenfor (skjematisk struktur vises i Figur 16), har følgende egenskaper: DI-17E6 viser aktivitet og selektivitet på isolert reseptor-nivå og cellenivå (f. eks. reseptorbindings-, celledhesjons- og cellemigrasjons-undersøkelser). DI-17E6 viser tumorveksthinhiberende aktivitet *in vitro* og i dyremodeller (f. eks. nakne mus med eksperimentell tumor, SCID-mus/human hud-kimærer).

35 DI-17E6 viser anti-angiogen aktivitet i dyremodeller (f. eks. SCID-mus/human hud-kimærer, Matrigel-plugg i aper).

DI-17E6 inhiberer selektivt bindingen av ekstracellulær matriks (ECM)-proteiner til α v-integrinreseptorer og blokkerer av-integrin-formidlet celledhesjon, -festing og -migrasjon. Etter at løsning av celler er indusert skjer ytterligere to ting: cellulære

aktiveringsveier blokkeres og av-integrin internaliseres i vevskultur. Binding av fibrinogen til blodplatereseptoren GPIIb/IIIa og blodplateaggregering påvirkes ikke, og EMD utløser verken antistoffavhengig celletoksisitet (ADCC) eller komplement-avhengig cytotoxiskitet (CDC).

DI-17E6 viser en smal artsspesifisitet, og bare α v-integriner fra menneske og ape gjenkjennes. Veksten av et humant av-integrinmangelende melanom og en vaskulær vekstrespons ble inhibert av EMD 525797 i human hud transplantert til SCID-mus. Systemisk tilførsel av EMD525797 til friske aper blokkerte angiogenese utløst ved subkutan implantering av plugger som inneholdt angiogene vekstfaktorer som basisk fibroblastvekstfaktor (bFGF). EMD 525797 har også vist direkte anti-tumoraktivitet i xenotransplantat-modeller for α v β 3-integrinuttrykkende humane tumorer, deriblant noen melanomer. I kombinasjonsbehandlingsstudier gir EMD525797-aktiviteten god synergisme med kjemoterapeutiske midler og tillater anvendelse av lavere, mindre toksiske konsentrasjoner av standard kjemoterapeutiske midler mens de fortsatt forblir effektive i en klinisk-lignende setting. Disse eksperimentene kunne bare vise den mulige anti-tumoraktiviteten av EMD 525797, siden karendotel i mus ikke uttrykker mål- α v-integrinet og derfor ikke gjenkjennes av antistoffet.

[0038] Resultatene fra en 4 uker toksikologiundersøkelse viste ingen behandlingsrelaterte virkninger av DI-17E6 på kliniske observasjoner, kroppsvekt og fôrintak, ECG, kroppstemperatur, pustefrekvens, klinisk patologi (hematologi, serumkjemi), urinanalyse, organvekt, makroskopiske observasjoner og histopatologi.

[0039] Basert på disse resultatene ble dosene på 10, 33 og 100 mg EMD 525797/kg kroppsvekt/dag, tilført en gang i uken i 4 uker ved intravenøs infusjon (1 time), vurdert til å tåles godt og under betingelsene for undersøkelsen. Antistoffet er ikke oralt aktivt, men har med hell blitt tilført i.v. og i.p. i dyrestudier, hvor det har blitt vist å inhibere angiogenese og vekst av flere forskjellige eksperimentelle tumorer.

[0040] En bakteriell screening for undersøkelse av mutasjonspotensialet til EMD 525797 viste at EMD 525797 ikke er mutagent. Ingen farmakologiske advarsler vedrørende sikkerheten av EMD 525797 ble observert i toksisitetsundersøkelser med gjentatte doser i cynomolgus-aper.

[0041] EMD 525797 har en teoretisk molekylvekt på 145208 Da, som har blitt bekreftet eksperimentelt ved hjelp av MALDI-TOF-MS og LC-ESI-Q-TOF MS-analyse. Det isoelektriske punkt legger mellom 7,35 og 8,15 med en middelværdi på 7,75. Ekstinksjonskoeffisienten er 1,42.

[0042] EMD 525797 inhiberer adhesjon av humane endotelceller til vitronektin med en EC₅₀ på tilnærmet 10 nM. EMD 525797 blokkerer adhesjon av tumorceller formidlet av α v-integriner med en EC₅₀ i området 0,1 til 50 nM. VEGF-indusert migrasjon av humane endotelceller på vitronektin blokkeres også av EMD 525797 med

en EC50 rundt 50 nM. På tilsvarende måte blokkeres også proliferasjon og overlevelse av humane endotelceller utsådd på α v-integrin-ligander av EMD 525797.

[0043] EMD 525797 er rettet mot α v-integriner på endotel og forstyrrer kardannelsen. Det inhiberer særlig integrin α v3 og α v5 og blokkerer α v-integrinformidlet celle-
 5 adferd, deriblant festing og migrasjon. Alfa-v-integrin og vekstfaktorsignalveier interagerer, så binding av EMD 525797 kan også forstyrre differensiering, proliferasjon og overlevelse. I tillegg til den anti-angiogene virkningen fremmer EMD 525797 åpenbart også apoptose som en direkte anti-tumorigen virkning i målpresterende
 10 ondartede celler. EMD 525797 kan blokkere cellefesting, inducere løsning av celler, blokkere migrasjon, proliferasjon og overlevelse på α v-integrinligander.

[0044] DI-17E6 er det første av-immuniserte protein for hvilket immunogenisitetsdata i mennesker er tilgjengelig: I en tilsvarende klinisk utprøving ble anti-DI-17E6-anti-
 15 stoffer ikke påvist ved doser over 500 mg, som er en alminnelig, terapeutisk effektiv dose for antistoffer. Til sammenligning kunne anti-medikament-antistoffer påvises i dyreforsøk ved tilsvarende beregnede doser. Generelt anses immunadferden til
 20 DI-17E6 å være mer komplisert: Binding av 17E6 til α v vil fremme opptak i dendritt-celler. Binding av 17E6 til FcR ser ut til å være slått ut. Binding av 17E6 til integrin-reseptor vil trolig inhibere en naturlig immunsupprimerende mekanisme. Således er resultatene som er erholdt med de modifiserte antistoffene, fortrinnsvis DI-17E6, ikke i
 25 noen tilfeller forventede, og de er overraskende.

[0045] DI-17E6 har en bindingsaffinitet for α v β -integrinreseptoren, som tilsvarer den til kimært 17E6 som omfatter de samme konstante områdene som DI-17E6.

Overraskende nok binder ikke en mutasjon i antistoffet som allerede omfatter de variable rammeverkområdene i humanisert mAb 425, men fortsatt det opprinnelige
 25 VH-område i museantistoff 17E6, til integrinreseptoren.

[0046] DI-17E6 uttrykkes godt av NS0-celler og andre pattedyrcellelinjer. Interessant nok viser mutasjonen som viser ingen bindingsaffinitet til integrin, som beskrevet
 ovenfor, den samme fordelaktige ekspresjonsgraden. Disse og lignende resultater viser at det ikke er mulig å forutsi de tre ønskede egenskapene: redusert immunogenisitet,
 30 høyt ekspresjonsnivå og tilfredsstillende bindingsaffinitet.

[0047] *In vitro* og *in vivo* forstyrres trinn i angiogenesen av DI-17E6, og likeså veksten av melanomtumor. DI-17E6 kan forsterke aktiviteten av behandlingsformer basert på cytotoxiske medikamenter, noe som fører til mer anti-tumorigenitet *in vivo*.

[0048] DI-17E6 fører til depolymerisering av fokale adhesjoner som avhenger av
 35 α v β 3 og α v β 5. Disse signalkompleksene bygges opp etter integrin-ligering. De organiserer kommunikasjonen med veksts-, overlevels- og motilitets-signalveier, og ødeleggelse av dem kan utløse apoptose.

[0049] Således anvender DI-17E6 en kombinasjon av mekanokjemiske og biokjemiske virkninger til å påvirke endotel og øke belastningen på tumorceller.

[0050] DI-17E6 utøver sine biologiske aktiviteter *in vivo* via virkningene på minst to forskjellige celleavdelinger i tumoren: på tumorcellene selv og på de angiogent aktiverte tumorendotelcellene. Festing av tumorceller og endotelceller formidlet av $\alpha v\beta 3$ og $\alpha v\beta 5$ forstyrres av DI-17E6. I kultur migrerer EC over provisorisk ECM, og denne migrasjonen forstyrres av DI-17E6. De morfogene endringene som inngår i dannelsen av blodkar er kompliserte, men de kan modelleres *in vitro* i migrasjons-analyser av humane endotelceller, hvor DI-17E6 kan blokkere denne prosessen. Antistoffet blokkerer også angiogenese ved systemisk tilførsel *in vivo* til human hud-SCID-mus-kimærmodellen og i Matrigel-plugg-modellen i aper. Dette tyder på at DI-17E6 påvirker angiogent endotel. Indirekte bevis for anti-angiogenese gis nedenfor. Avhengig av hvorvidt VEGFA eller FGF2 står for induseringen er den utløste angiogenesen avhengig av $\alpha v\beta 5$ eller av $\alpha v\beta 3$. Siden DI-17E6 blokkerer begge αv -integriner kan antistoffet blokkere begge reaksjonsveier.

[0051] Selv om DI-17E6 antas å primært være rettet mot EC kan antistoffet også inhibere vekst og overlevelse av tumorcellene selv. Så langt har dette bare blitt vist for tumorer som uttrykker $\alpha v\beta 3$.

[0052] Veksten av tumorcellelinjer fra forskjellige tumorindikasjoner (melanom, ovarietumor, nyretumor, colontumor, brysttumor og lungetumor) påvirkes ved behandling med DI-17E6 *in vitro*. Aktiviteten av DI-17E6 når det gjelder induksjon av anti-proliferasjon varierer i de forskjellige cellelinjene, og dette kan skyldes både den genetiske bakgrunn i de forskjellige cellelinjene og nivået av αv -integrinekspressjon i disse cellelinjene.

[0053] DI-17E6 kan inhibere veksten av xenotransplanterte tumorer i mus. Antistoffet viser også synergistiske virkninger i kombinasjon med kjemoterapeutiske midler. Disse virkningene avhenger av tumoren det gjelder og andre betingelser (f. eks. *in vitro/in vivo*), men virkning har blitt observert i subkutane og ortotopiske lokaliseringer, for eksempel bukspyttkjertel (se Eksemplene)).

[0054] I faste tumorer overuttrykkes ofte ligand-kompetent $\alpha v\beta 3$ på den tumor-invasive vaskulatur, og også på noen humane tumorer, deriblant melanomer, nyrekarsinomer og hjernetumorer. Denne ekspressjonen ledsages av deponering av ligander for $\alpha v\beta 3$, for eksempel vitronektin, von Willebrand-faktor og fibrinogen, og av unormal syntese av slike proteiner. For eksempel uttrykkes vitronektin, som hovedsakelig produseres i lever, i noen tumorer. Hos friske, voksne personer foreligger vitronektin og fibrinogen i en blodbåret, inaktiv form, men ved aktivering (f. eks. i tumorpasienter) gjennomgår de en konformasjonsendring og deponeres i ECM i subendotelet. Følgelig uttrykkes målmolekyler for DI-17E6 både av tumorinvasive blodkar og av noen tumorer, som også uttrykker vitronektinreseptor.

[0055] Subkutan vekst av $\alpha v\beta 3$ -uttrykkende melanomceller undertrykkes av EMD 525797 i forskjellige doser. I en human hud/SCID-mus-kimær modell, hvor humane

melanomer som manglet alfa-v-integriner ble vaskularisert av humane EC, inhiberer EMD 525797 også tumorvekst, noe som viser forbindelsens anti-angiogene virkning. **[0056]** Videre blokkerte også DI-17E6 vekstfaktorindusert angiogenese i en tumorfri modell i aper hvor angiogenese induseres med den angiogene vekstfaktor bFGF. Basert på *in vivo*-undersøkelsene, og ut fra de eksperimentelle lavpunktene for plasma-

konsentrasjonen funnet i flere PF/PD-*in vivo*-undersøkelser, omfatter tilførsel av EMD 525797 i kliniske utprøvningsdoser som gir lavpunkter for plasmakonsentrasjonen i området fra 10 til 500 µg/ml. **[0057]** Tilført til musemodeller med xenotransplantert melanom (M21, MeWo eller CAKI-1) gir DI-17E6 tilført i lave doser (tilnærmet 30 mg/kg) en svak tumor-regresjonsvirkning, mens virkningen er vesentlig forsterket dersom høyere doser (500 µl/ml) tilføres.

[0058] Det bør bemerkes at de basale biologiske og terapeutiske egenskapene som er beskrevet ovenfor for DI-17E6 også gjelder for andre varianter av DI-17E6 som er beskrevet i den foreliggende patentsøknad.

Kombinasjonsbehandling

[0059] Endotelceller prolifererer og invaderer tumoromgivelsene som respons på løselige cytokiner og vekstfaktorer som utskilles av tumoren. Slike endotelceller er et egnet mål for behandling, noe som nylig ble validert i menneskelige kreftpasienter. Alfa-v-integrinene som uttrykkes de novo av slikt tumorinvasivt endotel understøtter deres overlevelse i det fremmede miljø som den ekstracellulære matriks som dannes representerer, og inhibering av disse integrinene kan ha en anti-angiogen virkning.

[0060] Følgelig gir behandling rettet mot alfa-v-beta-3- eller av-integriner en ideell bakgrunn for kombinasjon av antistoffet ifølge foreliggende oppfinnelse med kjemoterapeutiske midler, andre integrinhibitoren eller tumorreseptorblokkerende midler i farmasøytiske sammensetninger og sett av komponenter for anvendelse i kombinasjonsbehandling av kreft.

[0061] Det ble overraskende funnet at den direkte anti-tumorstoffvirkningen kan forsterkes ved å kombinere et modifisert antistoff ifølge oppfinnelsen, fortrinnsvis DI-17E6, med ytterligere anti-tumormidler, særlig tyrosinkinaseinhibitorer, fortrinnsvis anti-erbB1 (EGFR)- og anti-erbB2 (Her2)-antistoffer. Anti-tumorbehandling er rettet mot tumorvevet selv ved at den blokkerer tumorspesifikke reseptorer og derved forhindrer tumorvekst eller fremmer innskrumpning av tumoren.

[0062] Ifølge oppfinnelsen kunne det vises at noen kjemoterapeutiske midler i kombinasjon med et modifisert antistoff ifølge oppfinnelsen, fortrinnsvis DI-17E6, kun gir en additiv virkning, mens det i andre eksperimenter med andre kjemoterapeutiske midler (f. eks. dakarbazin, DTIC) kan observeres synergistiske virkninger. Videre avhenger

resultatene av systemet som anvendes, f. eks. hvorvidt det ble benyttet et *in vivo*- eller et *in vitro*-system.

[0063] Et viktig resultat fra kombinasjonseksperimentene er at kombinert bruk av fortrinnsvis DI-17E6 og cilengitide, et syklisk RGD-peptid og en integrininhibitor (syklo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) viser synergistiske virkninger på regresjon av tumorvekst, både *in vitro* og *in vivo*.

[0064] Lignende synergistiske virkninger på reduksjon av tumorvekst kan oppnås dersom DI-17E6 kombineres med cetuksimab (Erbix®). Erbitux (cetuksimab) er et mus/menneske-kimært monoklonalt antistoff (MAb) fra underklassen IgG1 som er rettet mot human epidermal vekstfaktorreseptor (EGFR). Forskjellige nyrecelle-karsinom (RCC)-cellelinjer uttrykker EGFR. Erbitux er et markedsført produkt og er godkjent for flere tumorindikasjoner.

[0065] For alle tilfeller av synergi kan det fra resultatene konkluderes at det modifiserte antistoff DI-17E6 forsterker anti-tumorstørrelsen av det andre middelet som anvendes i kombinasjonen.

[0066] Ifølge oppfinnelsen forårsaker DI-17E6, når det kombineres med cetuksimab, at en jevn reduksjon av tumorstørrelsen/tumorveksten kan observeres over et lengre tidsrom (tilnærmet 40 dager), selv dersom tilførselen av medikamenter stoppes. Dette er ikke tilfelle dersom cetuksimab tilføres som eneste medikament.

[0067] De modifiserte antistoffene ifølge oppfinnelsen kan tilføres til en pasient med behov for dette før, etter eller samtidig med det andre terapeutiske middelet.

[0068] Det kjemoterapeutiske middelet som anvendes i kombinasjon med hvilket som helst av de modifiserte antistoffene ifølge oppfinnelsen kan f. eks. være metotreksat, vinkristin, adriamycin, cisplatin, ikke-sukkerholdige kloretylnitrosoureaer, 5-fluoruracil, mitomycin C, bleomycin, doksorubicin, dakarbazin, taksol, fragylin, Meglamine GLA, valrubicin, carmustain, UFT (tegafur/uracil), ZD 9331, Taxotere/decetaksel, fluoruracil (5-FU), vinblastin og andre gode forbindelser fra denne klassen.

[0069] De terapeutiske sammensetningene eller DI17E6-sammensetningene ifølge oppfinnelsen, med eller uten et andre terapeutisk middel, kan også anvendes i kombinasjon med andre anti-kreftstrategier, og slike kombinasjonsbehandlinger er effektive når det gjelder inhibering og/eller fjerning av tumorvekst og -metastase. Fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse kan med fordel anvendes med andre behandlingsmodaliteter, deriblant, men ikke begrenset til, strålebehandling, kirurgisk behandling, genterapi og kjemoterapi.

[0070] Det ble overraskende funnet at den anti-angiogene virkningen kan forsterkes ved å kombinere et antistoff ifølge oppfinnelsen med behandling med andre angiogeneseinhibitorer. Anti-angiogen behandling er rettet mot tumorens vaskulatur og forhindrer tumorvekst ut over en viss størrelse, følgelig er i en andre foretrukket

utførelse det sekundære medikamentet en inhibitor av angiogenese som fortrinnsvis er utvalgt fra følgende liste:

Inhibitoren av angiogenese kan være, men er ikke begrenset til, f. eks. cilengitide, (EMD 121974), anti-VEGF-antistoff LM609, BMS-275291, dalteparin (Fragmin®), suramin, 2-metoksyøstradiol (2-ME), talidomid, CC-5013 (talidomidanalog), combretastatin A4-fosfat, LY317615 (proteinkinase C beta-inhibitor), AE-941 (Neovastat™, GW786034), anti-VEGF-antistoff (bevacizumab, Avastin™), ZD44, karboksyamidotriazol (CAI), celecoksib (Celebrex®).

[0071] Antistoffene ifølge oppfinnelsen kan inkorporeres i en farmasøytisk sammensetning som er egnet for tilførsel. Slike sammensetninger omfatter typisk antistoffets variable områder og et farmasøytisk akseptabelt bærestoff. Som anvendt heri er uttrykket ”farmasøytisk akseptabelt bærestoff” ment å omfatte hvilket som helst og alle løsemidler, dispersjonsmedier, belegg, antibakterielle og antifungale midler, isotonisierungsmedier og absorpsjonsforsinkende midler og lignende som er forenlige med farmasøytisk tilførsel. Anvendelsen av slike medier og midler for farmasøytisk aktive forbindelser er velkjent innen faget.

[0072] En farmasøytisk sammensetning ifølge oppfinnelsen er utformet til å være tilpasset dens påtenkte tilførselsvei. Eksempler på tilførselsveier omfatter parenteral, f. eks. intravenøs, intradermal, subkutan, oral(f. eks. inhalering), transdermal (topisk), transmukosal og rektal tilførsel. Løsninger eller suspensjoner som anvendes for parenteral, intradermal eller subkutan tilførsel kan omfatte følgende bestanddeler: et sterilt fortynningsmiddel, for eksempel vann for injeksjon, saltløsning, ikkeflyktige oljer, polyetylenglykoler, glyserol, propylenglykol eller andre syntetiske løsemidler, antibakterielle midler, for eksempel benzylalkohol eller metylparabener, antioksidanter, for eksempel askorbinsyre eller natriumbisulfitt, kelatdannere, for eksempel etylen-diamintetraeddiksyre, buffere, for eksempel acetater, citrater eller fosfater, og midler for justering av tonisiteten, for eksempel natriumklorid eller dekstrose. pH kan justeres med syrer eller baser, for eksempel saltsyre eller natriumhydroksid. Det parenterale preparatet kan fylles i ampuller, engangssprøyter eller flasker med flere doser fremstilt av glass eller plast.

[0073] Medikamenter som inneholder variable områder fra antistoffet ifølge oppfinnelsen kan ha en konsentrasjon fra 0,01 til 100 % (vekt/vekt), selv om mengden varierer ut fra doseringsformen av medikamentene.

[0074] Tilførselen skjer fortrinnsvis en gang annenhver uke eller en gang i måneden, men kan være mer eller mindre hyppig avhengig av den farmakokinetiske adferden av 17E6/425-101-proteinet i et gitt individ. Doseringen av DI-17E6 eller andre antistoffer som er beskrevet i denne patentsøknaden (f. eks. cetuximab) for en voksen person på tilnærmet 70 kg ligger i området fra tilnærmet 50 til 1000 milligram pr. dose, med et

foretrukket område fra tilnærmet 100 til 500 milligram pr. dose. Den mest foretrukne dosen er tilnærmet 400 milligram for en voksen person på 70 kg som behandles én gang i måneden.

[0075] Kjemoterapeutiske midler som er nevnt heri tilføres som regel i doser på mellom 10 mg/kg og 100 mg/kg.

[0076] I kombinasjonsbehandling med et andre terapeutisk middel som beskrevet kan det modifiserte antistoff ifølge oppfinnelsen gis samtidig med det andre middelet ved behandlingens begynnelse eller etter eller før tilførselen av det andre middelet.

KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE:

[0077]

Figur 1A: variable lettkjedesequenser i DI-17E6 (SEKV.ID. NR. 1)

Figur 1B: variable tungkjedesequenser i DI-17E6 (SEKV. ID. NR. 2)

Figur 1C: den fullstendige lettkjede-proteinsekvensen i DI-17E6,

variable områder er understreket, med CDR i uthevet skrift.

Figur 1D: den fullstendige tungkjede-proteinsekvensen i DI-17E6:

Variable områder er understreket, med CDR i uthevet skrift. Sequenser i uthevet skrift i konstante områder angir modifisert IgG1-hengselområde og modifikasjoner i posisjon 296 og 297.

Figur 2: anti-angiogen aktivitet av DI-17E6 i et Matrigel-plugg-eksperiment i aper:

påvisning av anti-antistoff i apeserum avhengig av medikamentkonsentrasjonen på forskjellige dager (enkeltdose).

Figur 3: anti-angiogen aktivitet av DI-17E6 (EMD 525797) i et Matrigel-plugg-eksperiment i aper: påvisning av anti-antistoff i apeserum for dosering av DI-17E6 (30 mg/kg) som funksjon av tiden (langtidseksperiment).

Figur 4: Virkninger av DI-17E6 på tumorvekst i SCID-mus/human hud-kimærmodellen med intradermalt M21-L-melanom (tilført 3 ganger i uken i en dose på 1 mg/dose i.p. i 4 uker, behandlingsstart en dag etter inokulering av tumorceller,

Figur 5: Virkninger av DI-17E6 på vekstfaktorindusert angiogenese i Matrige-pluggmodellen i aper. Inhibering av vekstfaktorindusert angiogenese med EMD 525797 i aper tilført en enkelt terapeutisk i.v.-tilførsel (10 eller 30 mg/kg). Behandlingen ble gitt på samme dag som Matrigel ble implantert. Ett dyr som inneholdt opp til 6 Matrigel-plugger ble anvendt pr. gruppe. Analyse av hemoglobinnhold (g hemoglobin/mg Matrigel-plugg) ble utført etter 6 dager, middelerdi $\pm$ SE er oppgitt.

Figur 6: Antiproliferativ virkning av DI-17E6 kombinert med paklitaksel *in vitro* vist i HUVE-celler.

Figur 7: Antiproliferativ, synergistisk virkning av DI-17E6 kombinert med cilengitide *in vitro* vist i den humane melanomcellelinjen M21. Øvre kurve: cilengitide alene, nedre kurve: DI-17E6 + cilengitide.

Figur 8: Antiproliferativ, synergistisk virkning av DI-17E6 kombinert med cilengitide *in vitro* vist i den humane nyrecellelinjen CAKI-2. Øvre kurve: cilengitide alene, nedre kurve: DI-17E6 + cilengitide.

Figur 9: Antiproliferativ, synergistisk virkning av DI-17E6 kombinert med cilengitide *in vitro* vist i den humane cellelinjen A498. Kurve med triangler DI-17E6 + cilengitide, kurve med firkanter: cilengitide alene.

Figur 10: *In vivo*-virkning av DI-17E6 (EMD 525797) på kjemoterapeutisk behandling i en ortotopisk tumormodell med xenotransplantert bukspyttkjertelkreft: Inhibering av NP18-b3 bukspyttkjerteltumor (10 mg tumorfragmenter ortopedisk sydd inn i bukspyttkjertelen i nakne mus) ved kombinasjon av suboptimale doser av EMD525797 og gemcitabin i forskjellige doser. Behandlingen begynte 6 dager etter kirurgisk innføring av tumorfragmenter. EMD 525797 ble tilført tre ganger i uken i.p. i en dose på 500 µg. Gemcitabin ble tilført tre ganger i uken i.p. i en dose på 50 µg/kg. Tumorvekten er vist etter 42 dager.

Figur 11: *In vivo*-virkning av DI-17E6 (EMD 525797) i kombinert behandling med cisplatin (cPT) modeller med xenotransplantert tumor ved anvendelse av humane M21-tumorceller transplantert inn i mus ved anvendelse av suboptimale doser av DI-17E6. Behandlingen med EMD 525797 begynte samme dag som tumorcellene ble injisert. Behandlingen med cPT startet på dag 11 etter injeksjonen av tumorceller. EMD 525797 ble tilført i.p. én gang i uken i en dose på 500 µg. cPT ble tilført i.p. én gang i uken i en dose på 10 mg/kg.

Figur 12: *In vivo*-virkning av DI-17E6 (EMD 525797) i kombinert behandling med darkabazin (DTIC) xenotransplantat-tumormodell med humane MeWo-tumorceller transplantert i mus ved anvendelse av suboptimale doser av DI-17E6. Behandlingen med EMD 525797 startet samme dag som tumorcellene ble injisert. Behandlingen med DTIC starte på dag 11 etter injeksjonen av tumorceller. EMD 525797 ble tilført i.p. én gang i uken i en dose på 500 µg. DTIC ble tilført i.p. én gang i uken i en dose på 50 mg/kg.

Figur 13: *In vivo*-virkning av DI-17E6 (EMD 525797) alene i xenotransplantat-tumormodeller ved anvendelse av humane CAKI-1-nyrekarsinomtumorceller transplantert i mus ved anvendelse av forskjellige doser (µg/ml serum) av DI-17E6. Y-aksen: tumorvolum (mm³), x-akse: dager.

Figur 14: *In vivo*-virkning av DI-17E6 (EMD 525797) i kombinert behandling med cetuximab (Erbix) i CAKI-1-nyrekarsinomtumorceller transplantert i mus ved anvendelse av DI-17E6 ved en konstant serumkonsentrasjon på 100 µg/ml og Erbitux i en dose på 4 mg/kg og 12 mg/kg kroppsvekt. Doseringsskjemaet er vist i Eksempel 13. Y-akse: tumorvolum (mm³), x-akse: dager.

Figur 15: Plasmidkart over DI-17E6-ekspresjonsplasmid pHL10-DI-17E6γ2h(N297Q).

Figur 16: Skjematisk struktur av mAb DI-17E6 (EMD 525797).

Figur 17 A: Fullstendig DNA-sekvens av DI-17E6 fra translasjonsinitieringskodonet til translasjonsstoppkodonet for den komplette lettkjeden (human kappa) som anvendt i ekspresjonsplasmidet pHL10-DI-17E6 (kodende sekvens med store bokstaver og ikke-kodende sekvens med små bokstaver, variabel og konstant sekvens farget grå, variabel sekvens i kursiv) (SEKV.ID. NR. 27)

Figur 17 B: DNA-sekvensen for den variable lettkjeden i DI-17E6 (SEKV.ID. NR. 29)

Figur 17 C: DNA-sekvensen for den konstante lettkjeden i DI-17E6 (SEKV.ID. NR. 31)

Figur 18 A: Den fullstendige DNA-sekvens av DI-17E6 fra translasjonsinitieringskodonet til translasjonsstoppkodonet for den komplette tungkjeden som anvendt i ekspresjonsplasmidet pHL10-DI-17E6 (kodende sekvens med store bokstaver og ikke-kodende sekvens med små bokstaver, variabel og konstant sekvens farget grå, variabel sekvens i kursiv, modifisert IgG1-hengsel i uthevet skrift) (SEKV.ID. NR. 33)

Figur 18 B: DNA-sekvensen for den variable tungkjeden i DI-17E6 (SEKV.ID. NR. 35)

Figur 18 C: DNA-sekvensen for den konstante tungkjeden i DI-17E6 (SEKV.ID. NR. 37)

Figur 18 D: DNA-sekvensen for det modifiserte IgG1-hengselet i tungkjeden i DI-17E5 (SEKV.ID. NR. 39)

Figur 19 A: Fullstendig tungkjede-DNA-sekvens for DI-17E6 (SEKV.ID. NR. 41)

Figur 19 B: Fullstendig lettkjede-DNA-sekvens for DI-17E6 (SEKV.ID. NR. 43)

Figur 20A: Proteinsekvensen til den variable lettkjeden i museantistoff 17E6. Sekvenser i uthevet skrift representerer CDR. (SEKV.ID. NR. 25).

Figur 20B: Proteinsekvensen til den variable tungkjeden i museantistoff 17E6.

Sekvenser i uthevet skrift representerer CDR. (SEKV.ID. NR. 25).

Figur 21A: Integrinbindings-ELISA av forskjellige versjoner av modifiserte antistoffer kryss (x) = 7E6 VH/425VL-g2h(N-Q)

stjerne (*) = mAb 425

trekant = DI 17E6 VH33/VL60.2-g2h(N-Q)

rombe = 17E6- g2h(N-Q)

Figur 21B: Integrinbindings-ELISA av forskjellige versjoner av modifiserte antistoffer. *fylte trekanter*: muse-17E6-g2h(N-Q)

trekanter: DI-17E6VL60.2CDR-425VL**FR4**/VH33(C60Y)-g2h(FN->AQ)

fylte firkanter: DI-17E6VL60.2CDR-425VL**FR3FR4**/VH33(C60Y)-g2h(FN->AQ)

fylte sirkler: DI-17E6-g2h (N-Q)(C60Y)

[0078] De påfølgende eksemplene beskriver oppfinnelsen i mer detalj. Selv om det anvendes spesifikke parametere, molekyler, fremgangsmåte-trinn osv. er imidlertid oppfinnelsen ikke begrenset til disse, dersom en fagperson enkelt kan konkludere fra disse resultatene at oppfinnelsen kan utføres med analoge midler og fremgangsmåter.

Eksempel 1:**Konstruksjon og ekspresjon av de modifiserte antistoffene ifølge oppfinnelsen:**

[0079] For å redusere immunogenisiteten i mennesker ble DI-17E6 (EMD 525797) fremstilt ved av-immunisering og genetisk modifisering av muse-17E6.

[0080] Utgangsantistoffet var det monoklonale museantistoff 17E6, som beskrevet tidligere. Dette antistoffet ble frembrakt fra mus immunisert med rensset humant $\alpha\beta 3$. Lymfocytter fra milten fra immuniserte mus ble fusjonert med musemyelomceller, og en av de resulterende hybridomklonene produserte det monoklonale antistoff 17E6 (se for eksempel EP0719859) Hybridomcellelinjen som produserte dette antistoffet ble deponert under DSM ACC2160.

[0081] I hovedsak ble de variable områdene i lettkjeden (VL) og tungkjeden (VH) i muse-17E6 analysert in silico ved den såkalte av-immuniseringsteknologien (WO 98/52976,

[0082] WO 00/34317 og WO 02/069232) for fjerning av mulige T-celleepitoper. Av-immuniserte VH- og VL-sekvenser ble utformet slik at de aminosyrer i musesekvensen som er avgjørende for binding, for eksempel CDR, ble bevart.

[0083] Anvendelse av denne teknologien alene førte til et antistoff som viser redusert eller fjernet immunogenisitet i et menneske, men som ikke viste tilstrekkelig bindingsaffinitet og tilfredsstillende ekspresjonsnivå i et pattedyrs-ekspresjonssystem. Følgelig har antistoffet blitt omformet videre ved modifisering av aminosyresekvensen i flere posisjoner for å gjenvinne bindingsaffinitet og ekspresjon. Det ble imidlertid klart at forbedring av ekspresjonsmønsteret ble affiniteten redusert og omvendt. En rekke antistoffversjoner måtte derfor konstrueres og analyseres for ekspresjon og bindingsaffinitet. Den nye versjonen viser ofte overraskende resultater, noe som ikke var forventet da molekylutformingen ble planlagt. Kombinering av sekvenser fra antistoffversjoner som viste god ekspresjon med sekvenser fra antistoffversjoner som viser god bindingsaffinitet fører ofte til nye antistoffversjoner med dårlig bindingsaffinitet og ekspresjon. Derfor var, som allerede påpekt, en prediksjon av hvilke spesifikke antistoffmutasjoner som gir god ekspresjon og bindingsaffinitet ikke mulig.

Variable områder i av-immunisert 17E6 (DI-17E6):

[0084] De variable områder i lettkjeden (VL) og tungkjeden (VH) i det monoklonale museantistoff 17E6 (SEKV.ID. NR. 25 OG 26) ble av-immunisert in silico ved hjelp av av-immuniseringsteknologien som er beskrevet ovenfor, som fjernet mulige T-hjelpercelleepitoper. Dette førte til en av-immunisert versjon av VL som betegnes VL60.2 og en av-immunisert versjon av VH betegnet VH33.

[0085] Av-immunisert 17E6-antistoff bestående av VL60.2 og VH33 fremstilt ved transfeksjon av pattedyrceller bevarte bindingsaffiniteten til $\alpha\beta 3$ -integrin, men ble dårlig uttrykt.

[0086] For optimalisering av ekspresjonen ble rammeverk-områdene i lettkjeden erstattet med rammeverkområder fra et humanisert 425-antistoff (Kettleborough et al., Protein Engineering 4:773, 1991). Videre ble den uparrede cystein-60 i VH33, som var sjelden i VH-sekvenser, omdannet til tyrosin (C60Y) for å gi proteinstabilitet.

[0087] DNA som kodet for den endelige, av-immuniserte VL (DI-17E6 VL, Fig. 1A) og VH (DI-17E6VH, Fig. 1A) ble syntetisert kjemisk ved anvendelse av kodoner som var optimalisert for ekspresjon i pattedyr.

Opphav og kilde for cellelinjen NS0-LD:

[0088] Musemyelom NS0 ble erholdt fra European Collection of Cell Cultures (ECACC nr. 85110503). Cellelinjen NS0-LD ble erholdt ved seleksjon av NS0-celler for vekst i et lipidfritt og serumfritt medium som består av SM1F6-medium (Invitrogen) tilsatt 1 mM natriumpyruvat (Invitrogen), 1 g/l glukose (Merck KGaA), 1 % ikke-essensielle aminosyrer (Invitrogen), 0,1 µm Tropolone (Sigma), 10 µm etanolamin (Sigma) og 2 mM glutamin (Invitrogen). Nedfrosne lagersuspensjoner av NS0-LD ble fremstilt i et nedfrysningsmedium bestående av 10 % (vol/vol) filtrert DMSO (Merck KGaA), 10 % av en 1 % suspensjon av metylcellulose i vann (Sigma), 40 % friskt dyrkningsmedium og 40 % kondisjonert medium fra NS0-LD-cellene.

[0089] Konstruksjon av ekspresjonsvektoren for DI-17E6γ2h(N297Q) En genomisk signalpeptidsekvens fra et immunglobulinlettkjede-gen fra mus ble anvendt for sekresjon av både tungkjeden og lettkjeden. Gensekvensen som koder for -2-aminosyreresten (hvor -1-aminosyren er den C-terminale aminosyreresten i signalpeptidet) i signalpeptidet ble mutagenisert fra en serinrest til en leucinrest (AGC til TTA), slik at DNA som koder for enden av signalpeptidet er CTTAAGC, hvor CTTAAT er et innført Af/II-sete (Lo et al., Protein Engineering 11:495, 1998). I tillegg ble Kozak-konsensussekvensen CCACCATGG innsatt for optimal ribosombinding for translasjonsinitiering ved ATG (Kozak, Cell 44:283, 1986). Dette ble oppnådd ved å mutere den første aminosyreresten etter initieringskodonet fra AAG til GAG for dannelsen av sekvensen TCTAGACCCACCATGGGAG, hvor Kozak-sekvensen er understreket og TCTAGA er et XbaI-sete. Følgelig inneholder signalpeptidet en substitusjon i den første aminosyreresten etter initieringskodonet og en annen substitusjon i aminosyreresten i -2-posisjon. Siden signalpeptidet avspaltes av signalpeptidaser inne i cellen og ikke forekommer i det utskilte proteinet, påvirker disse mutasjonene ikke aminosyre-sammensetningen til antistoffproduktet.

[0090] Det av-immuniserte VL-DNA ble syntetisert som et Af/III-BamHI-fragment, og det av-immuniserte VH-DNA ble syntetisert som et Af/III-HindIII-fragment. For VL førte ligering til den genomiske ledersekvens via Af/III-setet til et XbaI-BamHI-fragment som kodet for signalpeptid-VL. På tilsvarende måte førte ligering av VH-DNA til den genomiske ledersekvens via Af/III-setet til et XhoI-HindIII-fragment som

kodet for signalpeptid-VH, hvor XhoI erstattet *XbaI* ved linkerligering. De resulterende *XbaI-BamHI*- og *XhoI-HindIII*-fragmentene ble så innsatt i ekspresjonsvektoren pdHL10 (Fig. 15), som allerede inneholder transkripsjonsregulerende elementer og sekvenser for immunglobulin-konstant område (se nedenfor).

5

DNA-konstruksjoner som koder for det humane konstante område

[0091] For lett kjeden ble det humane konstante kappa-området anvendt. For tungkjeden ble de genomiske humane konstante gamma-2 ($\gamma 2$)-områdene anvendt med følgende modifikasjoner:

10

For det første ble hengselområdet, siden immunglobulin $\gamma 2$ -hengselområdet inneholder fire disulfidbindinger, noe som fører til økt utbytting av disulfidbindinger og proteinaggregering under rensing, erstattet ved genetisk modifisering ved anvendelse av et modifisert $\gamma 1$ -hengselområde som følger. Konstruksjonen av Fcy2h-DNA som koder for det modifiserte $\gamma 1$ -hengsel fulgt av CH2- og CH3-området fra $\gamma 2$ har allerede blitt beskrevet (Lo et al. Protein Engineering, Design & Selection, 18:1, 2005).

15

For å erstatte $\gamma 2$ -hengselområde-eksonet i det humane Ig $\gamma 2$ -gen med det modifiserte $\gamma 1$ -hengselområde-eksonet anvendte vi polymerase-kjedereaksjonen (CPR) for gjeninnføring av *PstI*-restriksjonssetet umiddelbart oppstrøms for hengsel-eksonet ved anvendelse av Fcy2h-DNA som templat. Forover-primeren har sekvensen 5'-ctgcagAGCCCAAATCTTC, hvor ctgcag er *PstI*-setet som opprinnelig forelå i enden av intronet (små bokstaver), hvor ag er spleise-akseptorsetet, og AGCCCAAATCTTC er 5'-enden av det modifiserte $\gamma 1$ -hengselområde-eksonet (store bokstaver). Revers-primeren har sekvensen

20

25

5'-cagctggggcctgtccctg, som hybridiserer til en sekvens i intronet mellom hengselområdet og CH2-eksoner. Det resulterende *PstI*-*PvuII*-PCR-produktet, som inneholdt det modifiserte $\gamma 1$ -hengselområde-eksonet, ble etter kloning og sekvensbekreftelse anvendt for å erstatte det tilsvarende fragmentet i Ig $\gamma 2$ -genet i ekspresjonsvektoren pdHL10 (se nedenfor).

30

For det andre ble en mutasjon av Asn-297 i CH2-domenet til Gln (N297Q) innført ved overlappende PCT for å fjerne glykosyleringssignalet, noe som opphever effektorfunksjoner og forlenger antistoffers halveringstid i serum. I tillegg ble Phe-296 mutert til Ala, som fjerner eventuelle mulige T-hjelpercelle-epitoper som dannes ved N297Q-mutasjonen. For det tredje ligger et

35

SmaI-restriksjonssete tilnærmet 280 bp oppstrøms for translasjonsstoppkodonet i villtype-DNA-sekvensen som koder for CH3-domenet. Dette *SmaI*-setet ble ødelagt ved innføring av en "taus" mutasjon (TCC til TCA). En annen taus mutasjon ble innført for dannelse av et nytt, unikt *SmaI*-sete 4 bp oppstrøms for

stoppkodonet (Lo et al. Protein Engineering 11:495, 1998) for å forenkle genetisk manipulering.

Konstruksjon av plasmid pdHL 10 (Figur 15)

[0092] Ekspresjonsvektoren pdHL10 er avledet fra pdHL7, som er beskrevet tidligere (Gillies et al. J. Immunol. 160:6195, 1998). Som i pdHL7 inneholder de to transkripsjonsenheterne for L- og H-kjeden i pdHL10 CMV-enhanceren/promoteren (Boshart et al., Cell 41:521-530, 1985). DNA for CMV-enhanceren/promoteren ble erholdt fra et AflIII-HindIII-fragment av det kommersielt tilgjengelige pcDNAI (Invitrogen Corp., San Diego, CA).

[0093] Den viktigste forskjellen mellom pdHL7 og pdHL10 er i transkripsjonsenheten for seleksjonsmarkøren dihydrofolatreduktase (DHFR). SV40-enhanceren for denne transkripsjonsenheten ble ødelagt i pdHL10 som følger: Det er to 72 bp repetisjoner i SV40-enhanceren/promoteren, og i hver enhet på 72 bp foreligger et SphI-restriksjonssete. Ligering av Sall-setet som ligger 5' for enhanceren til det distale SphI-setet via en oligonukleotid-linker-adaptor førte til delesjon av 120 bp fra de to repetisjonene på 72 bp. En slik promoter uten enhancer bør gi et mye lavere ekspresjonsnivå av DHFR-seleksjonsmarkøren. I teorien bør dette føre til færre stabilt transfekterte kloner som, for å overleve medikamentsелеksjonen, kan ha plasmidet integrert i et aktivt transkripsjonsområde i et kromosom, slik at det uttrykkes tilstrekkelig DHFR fra den enhancerløse promoter. Genene av interesse, som reguleres av fullt ut funksjonelle enhancere og promotere, bør uttrykkes i enda høyere nivå fra dette aktive transkripsjonsområdet. I tillegg ble orienteringen av denne svekkede transkripsjonsenheten reversert i pdHL10, slik at CMV-enhanceren for L-kjeden ikke kan utøve en direkte virkning på den distale SV40-promoter.

[0094] Konstruksjonen pdHL10-DI-17E6γ2h(N297Q) ble grundig kartlagt ved hjelp av kutting med restriksjonsendonukleaser (Figur 15): De kodende områdene for hele L- og H-kjeden ble fullstendig sekvensert. Konstruksjonens viktigste egenskaper er beskrevet i den påfølgende tabell:

Basepar (bp) nr.	Beskrivelse	Litteratur	Kilde for sekvensinformasjon
0002 (EcoRI) - 0665 (XbaI)	CMV-enhancer og -promoter	Boshart M et al. (1985), Cell 41, 521-530	Locus <i>HS51EE</i> , aksesjon <i>K03104</i> , sekvens bekreftet ved EMD Lexigen

Basepar (bp) nr.	Beskrivelse	Litteratur	Kilde for sekvensinformasjon
0665 (XbaI - 1112)	Genomisk ledersekvens for en immunoglobulin-L-kjede fra mus	Schaeble KF et al. (1999), Eur. J. Immunol. 29, 2082-2086	Locus <i>MMU321201</i> , aksesjon <i>AJ231201</i> , kodende sekvens bekreftet ved EMD Lexigen, men 6 nt variasjoner i intron ¹
1113-1434	Av-immunisert 17E6 VL	Gitt i Fig. 1A	Sekvens bekreftet ved EMD Lexigen
1435 (BamHI i 1442) - 1784	Intron mellom VL og CL	Kawasaki K (2001) Eur. J. Immunol. 1017-1028	<i>NG_000834</i> i Genbank, sekvens bekreftet ved EMD Lexigen
1785-2107	CL-kodende område og translasjonsstoppkodon	Kawasaki K (2001) Eur. J. Immunol. 1017-1028	<i>NG_000834</i> i Genbank, sekvens bekreftet ved EMD Lexigen
2108 - 2971 (SalI)	3'-ikketranslatert område og poly-adenyleringssignal fra det humane gen for immunglobulin kappa-kjede	Kawasaki K (2001) Eur. J. Immunol. 1017-1028	<i>NG_000834</i> i Genbank, sekvens bekreftet ved EMD Lexigen
2971 (SalI) - 3638 (XhoI)	CMV-enhancer og -promoter	Boshart M et al. (1985), Cell 41, 521-530	Locus <i>HS51EE</i> , aksesjon <i>K03104</i> , sekvens bekreftet ved EMD Lexigen
3638 (XhoI)-4091	Genomisk ledersekvens for en immunglobulin L-kjede fra mus	Schaeble KF et al. (1999), Eur. J. Immunol. 29, 2082-2086	Locus <i>MMU321201</i> , aksesjon <i>AJ231201</i> , kodende sekvens bekreftet ved EMD Lexigen, men 6 nt variasjoner i intron ²
4092 - 4446	Av-immunisert 17E6 VH	Gitt i Fig. 2	Sekvens bekreftet ved EMD Lexigen
4447 (HindIII i 4454) - 6264	Konstante områder fra immunglobulin 02-gen med modifisert $\square$ -hengsel	Krawinkel U. et al. (1982) EMBO J. 1 (4), 403-407	Locus <i>HUMIGCDI</i> , aksesjon <i>H00230 V00554</i> , kodende sekvens bekreftet ved EMD Lexigen, men 4 nt variasjoner i intron ³⁻⁵
6265 (Xho i 6266) - 6516	3'-ikketranslatert område og poly-adenyleringssignal fra SV40 sent område	Forsman ZH et al. (2004), J. Virol. 78, 9306-9316	Aksesjon <i>AF316141</i> , sekvens bekreftet ved EMD Lexigen

Basepar (bp) nr.	Beskrivelse	Litteratur	Kilde for sekvensinformasjon
6516 - 8809 (EcoRI)	Replikasjonsorigo og β -laktamasegen fra pBR322	Sutcliffe JG (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 3737-3741	Aksesjon <i>J01749</i> , sekvens delvis bekreftet (6516 til 7192) ved EMD Lexigen
8809 (EcoRI) - 9038	SV40-promoter	Ilyinskii PO et al, (1992) J. Virology 66, 6353-6360	<i>M99359.1</i> <i>GI:310698</i> i Genbank, sekvens bekreftet ved EMD Lexigen
9039 - 9602	DHFR cDNA	Simonsen CC og Levinson AD (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903	Sekvens bekreftet ved EMD Lexigen
9603 - 9687	3'-ikketranslatert område fra DHFR fusjonert til polyadenyleringssignalet fra SV40 tidlig område ved ligering av BglII klebrig ende til BclI klebrig ende	Strausberg RL (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903	Aksesjon <i>BC005796</i> , sekvens bekreftet ved EMD Lexigen
9688 - 9924	Polyadenyleringssignal fra SV40 tidlig område	Forsman ZH et al. (2004), J. Virol. 78, 9306-9316	Aksesjon <i>AF316141</i> , sekvens bekreftet ved EMD Lexigen

Basepar (bp) nr.	Beskrivelse	Litteratur	Kilde for sekvensinformasjon
1. Seks nukleotid (nt)-variasjoner i intronet til ledersekvensen ble funnet mellom pdHL10-DI-17E6γ2h(N297Q)-vektoren og de publiserte sekvensene. pdHL10-DI-17E6γ2h(N297Q)-vektoren inneholder G i 801, T i 985, C i 993, T i 1006, T i 1045 og A i 1071. Den publiserte sekvensen inneholder C, A, A, G, AC (et ekstra nt) og G i disse posisjonene. 2. Seks nukleotid (nt)-variasjoner i intronet til ledersekvensen ble funnet mellom pdHL10-DI-17E6γ2h(N297Q)-vektoren og den publiserte sekvensen. pdHL10-DI-17E6γ2h(N297Q)-vektoren inneholder G i 3780, T i 3964, C i 3972, T i 3985, T i 4024 og A i 4050. Den publiserte sekvensen inneholder C, A, A, G, AC (et ekstra nt) og G i disse posisjonene. 3. To nukleotid (nt)-varianter i intronet mellom CH2 og CH3 ble funnet mellom pdHL10-DI-17E6γ2h(N297Q)-vektoren og den publiserte sekvensen. pdHL10-DI-17E6γ2h(N297Q)-vektoren inneholder A i 5908 og A i 5922. Den publiserte sekvensen inneholder G i begge disse posisjonene. 4. En nukleotid (nt)-variant i CH1 ble funnet mellom pdHL10-DI-17E6γ2h(N297Q)-vektoren og den publiserte sekvensen. pdHL10-DI-17E6γ2h(N297Q)-vektoren inneholder G i 4736. Den publiserte sekvensen inneholder C i denne posisjonen.			

Fremstilling av produksjonscellekloner og forskningscellebanker

Transfeksjon og seleksjon av kloner med høy produksjon

[0095] Ekspresjonsplasmidet pdHL10-DI-17E6 γ 2h(N297Q) linearisert med restriksjonsendonukleasen FspI, som kutter én gang i sekvensen som koder for β -laktamasen, ble anvendt for transfeksjon av NS0-LD-celler ved elektroporering. Elektroporeringen ble utført ved anvendelse av et Gene Pulser Xcell™-system (BioRad, Hercules, CA) innstilt til 250 volt og 15 ms pulslengde. Stabilt transfekterte kloner ble selektert ved vekst i Super CD-medium supplementert med 200 mM metotreksat (Sigma, katalognummer M-8407). Super CD-mediet inneholder 9,69 g/l AGT CD hybridommedium (Invitrogen, P/N RM-00-136), 2,53 g/l natriumbikarbonat (EMD, P/N SX0320-3), 30 ml/l CD syreløselig konsentrat (Invitrogen, P/N 00-0336DK), 1,46 g/l L-glutamin (Sigma, P/N G8540), 3 g/l glukose (Sigma, P/N G-5400), 2 g/l BD Select Soytone (Becton Dickenson, P/N 212488) og 2 g/l BD Ultrafiltered Select Phytone (Becton Dickenson, P/N 210931). Supernatanter fra tilnærmet 474 stabile kloner fra tolv 96-brønners plater ble analysert ved anti-human Fc-ELISA for identifisering av kloner med høy produksjon. Ekspresjonsnivået i utvalgte kloner ble videre bekreftet ved rekombinant Protein A (rPA)-affinitetskromatografi. Klon nr. 395, som produserte 607 μ g/ml DI-17E6 γ 2h(N297Q) (ved rPA) i terminal stasjonær kultur i en 25 cm² T-flaske, ble valgt for subkloning ved begrensende fortynnninger.

[0096] Forsøk på subkloning i Super CD-medium var ikke vellykkede. Følgelig ble klon nr. 395 tilpasset vekst i DMEM/F12-medium (Invitrogen, katalognr. 21041-025) supplementert med 5 μ m Tropolone (Sigma, kat. nr. T7387), 10 μ l/l etanolamin

(Sigma, kat. nr. E0135), 10 µg/ml insulin (bovint, frysetørret, Invitrogen, kat. nr. 13007-018), 2 g/l Hypep 4601 (Quest International, kat. nr. 5Z10419) og 2 g/l Hypep 1510 (Quest International, kat. nr. 5X59053), 3,5 mM L-glutamin (Invitrogen, kat. nr. 25030-081) og 200 nM metotreksat (Sigma, kat. nr. M-8407) for én passasje og sub-
 5 kloning i en 1:1 blanding av det komplette DMEM/F12-medium med 200 nM metotreksat og kondisjonert komplett DMEM/F12-medium (kondisjonert fra en kultur av de ikke-transfektete NS0-LD-cellene, nedsentrifugert og så filtrert). For subkloning ble cellene utsådd med 1, 5 og 10 celler/brønn i 96-brønners plater. I løpet av tilnærmet to uker opptrådte subkloner i platene som inneholdt 10 og 4 celler/brønn. Subklonene i
 10 brønnene ble undersøkt under mikroskop for å sikre at det kun var én synlig klon i brønnen. Supernatanter fra 16 subkloner fra to 96-brønners plater (10 celler/brønn) og 1 subklon fra to 96-brønners plater (5 celler/brønn) ble analysert ved anti-humant Fc-ELISA, og kloner med høy produksjon ble utvalgt for rPA-analyse. De beste subklonene var nr. 395-2 og nr. 395-6, som produserte 669 µg/ml og 735 µg/ml DI-17E6
 15 γ2h(N297Q) (ved rPA) i terminal stasjonær kultur i 75 cm² T-flasker.

Ekspresjon av antistoffet

[0097] Pattedyrs-ekspresjonsplasmider ble konstruert, transfektert inn i NS/0-celler og stabile transfektanter isolert. Typisk ble NS/0-celler stabilt transfektert med en ekspresjonsvektor og overført til en 75 ml kultur i en T-flaske og dyrket i tre dager, slik at
 20 celletettheten var tilnærmet 400000 celler pr. milliliter. Under disse betingelsene var konsentrasjonen av utskilt DI-17E6 tilnærmet 50-100 mikrogram/ml.

Rensing av antistoff

[0098] Antistoffet kan renses ved anvendelse av noen eller alle av følgende trinn etter hverandre: Abx Mixed Resin-kolonnekromatografi, rekombinant Protein A-kromatografi og Q Sepharose-kolonnekromatografi, fulgt av Pellicon 2 tangentiellstrøms-diafiltrering for utbytning av bufferen til utformingsbuffer. Inaktivering og fjerning av virus legges mellom disse trinnene. Trinnene med inaktivering og fjerning av virus er
 30 ikke nødvendige for rensingen i seg selv, men anvendes for å oppfylle myndighetenes krav.

[0099] Analyse for bestemmelse av binding av DI17E6-antistoff til alfa V-integrinreseptorsubenheten. Evnen til DI17E6-antistoff til å binde alfa V-integrin ble analysert ved anvendelse av ELISA. Kort beskrevet ble forskjellige mengder av antistoff tilsatt
 35 til brønner som inneholdt alfa V-integrin, brønnene ble vasket og bundet antistoff ble analysert ifølge standard fremgangsmåter.

Eksempel 2:

[0100] Innføring av et stor antall antistoffmutasjoner for å finne mønster for optimal ekspresjon og bindingsaffinitet.

[0101] Oppsummering av resultater vedrørende økt ekspresjonsnivå av DI-17E6 ved modifisering

Ekspresjonsproblem: Ekspresjonsnivået av de av-immuniserte versjonene var enda lavere enn for kimæren:

	Transient i PER.C6	NS0 fra ECACC	NS0-LD
kim17E6-g2h, g4h og g4h(NtilQ)	~3-4 µg/ml	~15 µg/ml	Ikke målt
avImm17E6 VH33-VL60.2-g2h(FNtilAQ)	0,3 µg/ml	~1 µg/ml (96-brønner)	~1,6 µg/ml
avImm17E6 VH33-VL49-g2h(FNtilAQ)	0,7 µg/ml	-3 µg/ml	~10 µg/ml

[0102] For å øke ekspresjonsnivået av avImm17E6 VH33-VL49/VL60.2-g2h(FN til AQ) muterte vi:

- a.) C60 til S og Y i CDR2 i VH.
- b.) GEAA tilbake til DGTV i VL for gjeninnføring av et H-bindingsnettverk, men en mulig svak T-celle-epitop.
- c.) V20M-reversjon i VH

[0103] Resultatene fra to sett av transiente transfeksjoner ble oppsummert nedenfor: AvImm 17E6-mutant (C60S) ekspresjonsnivå sammenlignet med andre 17E6 (transient transfeksjon i PER.C6. 24 µg i 10 cm skål):

	Dag 1	Dag 4
AvImm 17E6[VL49/VH33(C60S)]-g2h(FN->AQ) nr. 15	15,7 ng/ml	956 ng/ml
AvImm 17E6[VL49/VH33(C60S)]-g2h(FN->AQ) nr. 16	13,1 ng/ml	734 ng/ml
AvImm 17E6[VL49/VH33]-g2h(FN->AQ) nr. 44 (DI-kontroll)	12,4 ng/ml	631 ng/ml
AvImm 17E6[VL60.2/VH33]-g2h(FN->AQ) nr. 1 (DI-kontroll)	8,3 ng/ml	589 ng/ml
17E6-g4h(FN->AQ) nr. 1 (kimær kontroll)	174 ng/ml	2716 ng/ml
17E6-g2h nr. 6 (kimær kontroll)	149 ng/ml	3582 ng/ml

AvImm-17E6-mutanter ekspresjonsnivå (transient transfeksjon i PER.C6.24 µg i 10 ml skål):

Dag 2	Dag 4
-------	-------

AvImm 17E6[VL49(GEAA->DGT V)/VH33]-g2h(FN->AQ) nr. 1	192 ng/ml	1187 ng/ml
AvImm 17E6[VL60.2(GEAA->DGT V)/VH33]-g2h(FN->AQ) nr. 20	120 ng/ml	949 ng/ml
17E6-g2h nr. 66 (kimær kontroll)	271 ng/ml	1442 ng/ml
AvImm 17E6 [VL60.2/VH33]-g2h(FN->AQ) nr. 1 (DI-kontroll)	65 ng/ml	883 ng/ml

Transfeksjoner med miniprep-DNA:

AvImm 17E6[VL49/VH33(V20M)]-g2h(FN->AQ nr. 5 (mini, 40 µl)	5 ng/ml	0,77 ng/ml
AvImm 17E6[VL49/VH33(C60Y)]-g2h(FN->AQ nr. 5 (mini, 40 µl)	119 ng/ml	745 ng/ml

C60S har bare marginal forbedring, mens resultatet for C60Y er lovende. Dersom C60Y-resultatet holder med maksiprep-DNA, som det har blitt utført transfeksjoner med, vil vi måtte forsikre oss om at det ikke er noe tap av bindingsaffinitet. GEAA til DGTV-reversjonen forbedret ekspresjonen tilnærmet 0,5 til 2 ganger. V20M-resultatet med miniprep-DNA er ikke pålitelig, men transfeksjonen har blitt gjentatt med maksiprep-DNA.

[0104] Forbedring av ekspresjonen av avImm17E6: Følgende nye konstruksjoner ble anvendt for transfeksjon av NS0-celler:

- pdHL10-DI-17E6[VH33(C60Y)/VL49(DGTV)]- g2h(FN->AQ)
- pdHL10-DI-17E6[VH33(C60Y)/VL60.2(DGTV)]- g2h(FN->AQ)
- pdHL10-DI-17E6[VH33(C60S)/VL49(DGTV)]- g2h(FN->AQ)
- pdHL10-DI-17E6[VH33(C60S)/VL60.2 (DGTV)]- g2h(FN->AQ)
- pdHL10-17E6-g2h(FN-AQ) (dette ble gjort for å sammenligne ekspresjonsnivået med 17E6g2h).

Analyse for transient ekspresjon i PER.C6 ved HuFc-ELISA:	Dag 2	Dag 7
DI-17E6[VH33(C60Y)/VL49(DGT V)]- g2h(FN->AQ)	304	2518 ng/ml
DI-17E6[VH33(C60Y)/VL60.2(DGT V)]- g2h(FN->AQ)	233	1674 ng/ml
DI-17E6[VH33(C60S)/VL49(DGT V)]- g2h(FN->AQ)	433	2734 ng/ml
DI-17E6[VH33(C60S)/VL60.2(DGT V)]- g2h(FN->AQ)	467	3138 ng/ml
17E6-g2h(FN->AQ) (kimær kontroll)	587	5425 ng/ml
17E6-g2h (kimær kontroll)	537	3683 ng/ml
DI-17E6[VH33/VL60.2]-g2h(FN->AQ) (DI-kontroll)	48	669 ng/ml
DI-17E6[VH33/VL60.2(DGT V)]-g2h(FN->AQ)	142	1302 ng/ml
DI-17E6[VH33(C60Y)/VL49]- g2h(FN->AQ)	371	1535 ng/ml

[0105] ELISA-resultatene viste at ekspresjonsnivået av 17E6-g2h(FN->AQ) og 17E6-g2h var sammenlignbare. Overraskende nok var ekspresjonsnivået av (C60S)/(DGTV)-kombinasjoner høyere enn av (C60Y)/(DGTV), mens tidligere resultater viset at C60Y og DGTV hver for seg økte ekspresjonsnivået av AvImm17E6 fra 1x til 2.3x, mens

[0106] 17E6VH/425VL-g2h(FN til AQ) og følgende transiente ekspresjoner ble utført:

	Fc-ELISA
17E6VH/425VL-g2h(FN til AQ) i triplikat:	28,5, 26,7, 18,7 µg/ml
DI-17E6[VH33(C60Y)/VL49(DGTV)]-g2h(FN->AQ) i duplikat	2,1, 1,7
DI-17E6[VH33(C60Y)/VL49(DGTV)]-g2h(FN->AQ) i duplikat	2,1, 1,7
17E6-g2h(FN->AQ) i duplikat (kimær kontroll)	4,9, 4,0
425EU Ab i duplikat (425-kontroll)	27,4, 20,0

[0107] Det er åpenbart at endring av VL økte ekspresjonsnivået til samme nivå som 425 Ab!

Uheldigvis binder ikke 17E6VH/425VL-g2h(FN til AQ) avb3 i bindings-ELISA (se Figur 21).

[0108] For å løse ekspresjons/bindings-problemet ble følgende molekyler konstruert:

T8P- og A44Psubstitusjoner i avImm17E6VL:

DI-17E6 VL60.2(**DGTV**)med **T8P** / DI-17E6 VH33(C60Y) -g2h(FN til AQ)

DI-17E6 VL60.2(**DGTV**)med **A44P** / DI-17E6 VH33(C60Y) -g2h(FN til AQ)

DI-17E6 VL60.2(**DGTV**)med **T8P** / DI-17E6 VH33(C60S) -g2h(FN til AQ)

DI-17E6 VL60.2(**DGTV**)med **A44P** / DI-17E6 VH33(C60S) -g2h(FN til AQ)

[0109] Celler ble transfektert, selv om de endelige konstruksjonene er i ferd med å bekreftes ved sekvensering (siden restriksjonskutting ikke kan skille rekombinant fra utgangsmolekyl). Kombinering av T8P og A44P kan være nødvendig. Transplantasjon av 17E6 avImmVL-CDR inn i avImm425 VL-FR. Ekspresjonsnivået av avImm425-VL/avImm17E6 VH ble analysert, siden avImm425 VL ikke nødvendigvis uttrykkes i det samme høye nivå som hu425 VL. DI-425VL1 ble anvendt, men med en P til L-reversjon (VL1 bandt ikke). Følgelig ble P til L-reversjonen i CDR3 innført for å gjenoppnå binding. Denne ble parret med avImm17E6 VH33 (konstruksjon a nedenfor) og kim17E6 VH (konstruksjon b nedenfor). Transiente transfeksjoner ble utført ved anvendelse av kontrollene Hu425VL/kim17E6 VH (konstruksjon c nedenfor) og kim17E6.

Konstruksjoner	Transient ekspresjon ved Fc-ELISA
a.) DI-425VL1(P til L)/avImm17E6VH33-g2h(FN til AQ)	25
b.) DI-425VL1(P til L)/kim17E6VH-g2h(FN til AQ)	69
c.) Hu425VL/kim17E6VH-g2h(FN til AQ)	8394
d.) 17E6-g2h(FN til AQ)	643

[0110] De transiente resultatene viste at mens (c) ga et svært høyt ekspresjonsnivå ga konstruksjonene a og b med DI-17E6 nivåer som var enda lavere enn nivået for kim17E6.

- 5 NS0-LD-produksjonskloner med
pdHL10-425VLFRs/DI17E6VL60.2CDRs/17E6VH33(C60S)-g2h(FN->AQ)-Ab og
pdHL10-425VLFRs/DI-17E6VL60.2CDRs/17E6VH33 (C60Y)-g2h(FN->AQ)-Ab.

- 10 Transplantater med (FR1+FR2 alene) uttrykkes ikke godt og binder dårlig, mens
transplantater med (FR3+FR4) alene uttrykkes temmelig godt og binder godt. FR4
alene virket ikke. Tabellen nedenfor viser at FR3 alene ikke ga økt ekspresjon.

Transient transfeksjon i PER.C6					
Proteinnavn	huFc- ELISA (µg/ml)	huFc- ELISA (µg/ml)	huFc- ELISA (µg/ml)	huFc- ELISA (µg/ml)	huFc- ELISA (µg/ml)
DI.17E6VL60.2CDR- 425VL FR3 /VH33 (C60Y)-g2h(FN->AQ)	0,79	2,72			
DI-17E6VL60.2CDR- 425VL FR3 FR4/VH33 (C60Y)-g2h(FN->AQ)	14,17	25,36	19,6		17
DI-17E8VL60.2CDR- 425VL FRs /VH33 (C80Y)-g2h(FN->AQ)	20,78	31,76	24,3		28,5
DI-17E6VL60.2CDR- 425VL FR1FR2 /VH33 (C60Y)-g2h(FN->AQ)			4,5		6,2
DI.17E6VL60.2CDR- 425VL FR4 /VH33 (C60Y)-g2h(FN->AQ)				1,9	
DI-17E6VL60.2CDR- 425VL FR1 /VH33 (C60Y)-g2h(FN->AQ)				3	

Proteinnavn	huFc- ELISA (µg/ml)	huFc- ELISA (µg/ml)	huFc- ELISA (µg/ml)	huFc- ELISA (µg/ml)	huFc- ELISA (µg/ml)
DI-17E6VL60.2CDR-425VLFRs/17E6VH-g2h(FN->AQ)	21,65	33,7	35,1	19	25,9
425VUI7E6VH-g2h(FN->AQ)	35,14	53,66	47,3	40	51,9
17E6-g2h(FN->AQ)	3,74	8,86	9,8	4	8,7

Stabile kloner i NS0-LD i DMEM/F12 i T25-flasker

Proteinnavn/klon nr.	rPA (µg/ml)
DI-17E6VL60.2CDR-425VLFRs/VH33(C60Y)-g2h(FN->AQ)	
Nr. 423	38
Nr. 433	135
Nr. 434	62,5
Nr. 10	381
DI-17E6VL60.2CDR-425VLFR3FR4/VH33(C60Y)-g2h(FN->AQ)	
Nr. 1	29,5
Nr. 2	31,3

DI-17E6-g2h(NtilQ)(C60Y) ble valgt som det endelige molekyl, grunnet det høye ekspresjonsnivå av de stabile NS0-LD-klonene og siden det bibeholder bindingsaffiniteten.

Eksempel 3

[0111] For karakterisering av integrinspesifisiteten til DI-17E6 ble ELISA, cellulær ELISA og væskestrømscytometrisk analyse anvendt, og disse tillot oss å identifisere α v-kjeden i integriner som den spesifikke liganden for EMD 535797.

EMD525797 gjenkjenner rensede α v-integriner men hadde, som forventet, ingen reaktivitet mot rensed α Iib β 3. EMD 525797 interagerer også med humane cellelinjer med α v-integriner på celleoverflaten, uavhengig av den assosierte β -kjedesubenheten. EMD 525797- og LM609-immunreaktiviteter vises i tabellene nedenfor:

Immunreaktivitet mot rensede integriner

	α vp3	α v β 5	α Iib β 3
EMD 525797	+	+	-
LM609	+	-	-

[0112] Reaktiviteten av LM609 (monoklonalt anti- $\alpha\text{v}\beta 3$ -antistoff fra mus) vises for sammenligningens skyld. Immunreaktivitet mot tumorcellelinjer

	Analysecelle	M21	M21-L	MeWo	HT29	Colo205	SKBR-3	A498	V+B2	CV-1
	αv -integrin-mønster	$\alpha\text{v}\beta 3$ $\alpha\text{v}\beta 5$	Ingen αv -integriner	$\alpha\text{v}\beta 3$ $\alpha\text{v}\beta 5$	$\alpha\text{v}\beta 6$ $\alpha\text{v}\beta 5$	$\alpha\text{v}\beta 6$ $\alpha\text{v}\beta 5$	$\alpha\text{v}\beta 5$	$\alpha\text{v}\beta 3$	$\alpha\text{v}\beta 1$	$\alpha\text{v}\beta 3$
EMD 525797		+	-	+	+	+	+	+	+	+
LM609		+		+	-	-	-	+	-	ikke målt

5 **[0113]** Reaktiviteten av LM609 monoklonalt anti- $\alpha\text{v}\beta 3$ -antistoff fra mus) vises for sammenligningens skyld. Humane tumorcellelinjer: M21, M21-K og MeWo melanomer, HT29 og Colo205 kolonkarsinomer, SKBR-3 brystkarsinom, A498 nyrekarsinom og V+B2 okulært melanom. SV-1 er en vervetapecellelinje.

10 **[0114]** EMD 525797 gjenkjenner kun αv -integriner fra menneske og ape, og ingen andre arter. Det molekylære grunnlaget for denne uvanlige profilen har blitt utvetydig etablert ved epitopkartlegging, sekvenssammenligning og røntgen-ko-krystallografi. Epitopen som gjenkjennes av DI-17E6 er bekreftet å være unik for menneske og ape ved immunpresipitasjon og western-blottinganalyse utført med flere arter.

15 **Eksempel 4**

Immunogenisitet

[0115] Resultatene viser at DI-17E6 er mye mindre immunogent enn den opprinnelige muse-17E6-versjonen. Figur 2 viser at serumnivået av muse-17E6 gitt til et forsøksdyr avtar betydelig i løpet av forsøket.

20 **[0116]** Derimot økte serumnivået av ape-antistoffer med spesifisitet mot muse-17E6 i løpet av forsøket og korrelerer inverst med det avtagende serumnivå av muse-17E6.

[0117] Denne inverse korrelasjonen tyder på at muse-17E6 er svært immunogent i aper og mennesker og at aper eller mennesker derfor utvikler en MAMA- henholdsvis HAMA-respons som på uheldig måte påvirker farmakokinetikken til muse-17E6.

25 **[0118]** Et annet mål med undersøkelsen var videre å anslå den anti-angiogene aktiviteten av DI-17E6 i et Matrige-plugg-eksperiment i ape. For sammenligningens skyld ble 17E6 anvendt som referanseforbindelse.

[0119] Fire forskjellige grupper med ett enkelt dyr i hver gruppe ble anvendt: bærer, muse-17E6 i en dose på 30 mg/kg, DI-17E6 i en dose på 30 mg/kg og DI-17E6 i en dose på 10 mg/kg. Apene ble tilført én i.v. injeksjon (i armen) av muse-17E6 eller DI-17E6 ved begynnelsen av eksperimentet, som fortsatte i 6 dager (Figur 2).

30 **[0120]** Serum ble samlet på tre forskjellige tidspunkter (fra beina): Umiddelbart før antistoffinjeksjon, umiddelbart (1-2 minutter) etter antistoffinjeksjon og ved undersøkelsens avslutning, før dyrene ble avlivet. Nivået av både muse-17E6 og DI-17E6 ble

analysert. For påvisning av gitt serumfortynning) ble funnet på de to forskjellige tidspunktene i serum: umiddelbart etter antistofftilførselen og ved undersøkelsens avslutning. Dette ble observert i begge de to DI-17E6-behandlede gruppene: 10 og 30 mg/kg.

5 **[0121]** Serumnivået av muse-17E6 kunne imidlertid kun påvises umiddelbart etter antistoffinjeksjonen. Nivået var nesten null ved undersøkelsens avslutning. Eksperimentet viste en enorm, nøytraliserende ape anti-muse-antistoff (MAMA - monkey anti-murine antibody)-respons mot 17E6, noe som klart viser den høye immunogenisiteten av muse-17E6 i aper og andre primater, for eksempel mennesker. Denne responsen
10 førte til en hurtig og fullstendig fjerning av 17E6 fra apeserumet.

[0122] Dette tyder følgelig på at muse-17E6 fjernes hurtigere i mennesker, via en enorm HAMA-respons.

[0123] I en annen undersøkelse ble de farmakokinetiske parameterene for en enkelt dose av DI-17E6 i aper anslått, og i tillegg skulle denne undersøkelsen utforske
15 immunogenisiteten av DI-17E6. DI-17E6 ble gitt i en dose på 1 mg/kg som én enkelt i.v. injeksjon ved eksperimentets begynnelse. Analysetiden var 6 uker. Serum ble tappet før dosering og 1, 3 og 6 uker etter tilførselen. Nivået av apeantistoffer mot DI-17E6 ble analysert. I denne undersøkelsen ble immunogenisiteten studert direkte ved anvendelse av en spesifikk sandwich-ELISA-fremgangsmåte utformet for denne typen
20 av undersøkelser (fremgangsmåten er ennå ikke validert).

[0124] Figur 3 viser at ingen apeantistoffer mot DI-17E6 kunne påvises på noe tidspunkt i analysen, noe som klart viser at det ble utløst en lav ape anti-menneske (MAHA)-respons.

[0125] I ytterligere eksperimenter ble immunogenisiteten av de to antistoffene
25 undersøkt indirekte ved å undersøke det vedvarende serumnivå av de to 17E6-antistoff-variantene, muse-17E6 og DI-17E6. DI-17E6 hadde høyt serumnivå på alle tidspunkter i analysen, noe som tyder på at DI-17E6 ikke utløste en antistoffrespons og følgelig ikke var immunogent i aper. I motsetning til dette kunne muse-17E6 ikke påvises (svært lavt nivå til null-nivå) i serum på det siste tidspunktet. Dette indikerer igjen at
30 aper iverksatte en fjernende MAMA-respons mot muse-17E6 grunnet dets immunogenisitet.

[0126] Siden 17E6 ble av-immunisert basert på fjerning av humane T-celle-gjenkjenningsepitoper forventes immunogenisiteten av DI-17E6 å være lav i mennesker, noe som tillater gjentatt terapeutisk dosering uten den komplikasjon at det utløses en
35 immunrespons som kan motvirke den terapeutiske effektiviteten. Dette er et unikt funn som grunnet den høye grad av homologi mellom apegenomet og det humane genom, innbefattet 17E6-antigenet alfa-v-integrin, lett kan utvides til situasjonen i mennesker.

[0127] Dette ble i mellomtiden bekreftet ved en første klinisk utprøving utført i USA i 2006/2007. DI-17E6 ble tilført til 5 grupper med friske frivillige (hver gruppe

inneholder 6 frivillige forsøkspersoner) i forskjellige doser: 200 mg/kg, 120 mg/kg, 70 mg/kg, 35 mg/kg, som tilsvarer 250 mg, 500 mg, 1000 mg og 1500 mg/dose. Bare i gruppen tilført 250 mg utviklet én forsøksperson anti-medikament-antistoffer, mens ingen forsøkspersoner utviklet noen form for immunrespons mot DI-17E6 i gruppene tilført høyere doser (disse dosene ligger innenfor området for standard terapeutisk tilførsel). I motsetning til dette fremkaller muse-17E6 en kraftig immunrespons i dyremodeller.

[0128] Ifølge T-celle-epitopkartleggingen og elimineringsfremgangsmåten som ble anvendt heri, hvor sekvensen til museantistoffet oppdeles i overlappende peptider, ble tapet av immunogenisitet etter av-immunisering bekreftet ved en klar nedgang av scoren i en *in vitro*-T-celleanalyse, noe som viser at mulige humane T-celle-epitoper har blitt deletert. Følgelig avtok scoren fra 147 (muse-17E6) til 92 (DI-17E6) i lettkjedene og fra 181 (muse-17E6) til 85 (DI-17E6) i tungkjedene.

Muse-12E6-lettkjede

Posisjon	Sekvens	nBind	Score	Middel
15	LGDRVIISC	4	100,16	25,04
19	VIISCRASQ	31	1177,12	37,97
20	IISCRASQD	1	22,34	22,34
21	ISCRASQDI	3	78,13	26,04
29	ISNYLSWYQ	7	169,20	24,17
33	LSWYQQKPD	1	20,93	20,93
44	VKLLIFYTS	12	303,43	25,29
46	LLIFYTSKL	24	940,44	39,18
47	LIFYTSKLH	15	497,37	33,16
48	IFYTSKLHS	34	1151,58	33,87
50	YTSKLHSGV	1	25,29	25,29
54	LHSGVPSRF	2	52,00	26,00
71	YSLTISNLD	3	76,60	25,53
83	IATYFCQQG	2	40,82	20,41
86	YFCQQGNTF	4	84,56	21,14
98	FGGGTKVEM	3	94,75	31,58
Total score:		147		

AvI 17E6 endelig lettkjede

Posisjon	Sekvens	nBind	Score	Middel
2	*IQMTQSPSS	22	615,49	27,98
15	*VGDRVITIC	5	139,09	27,82
19	*VTITCRASQ	17	421,29	24,78

21	ITCRASQDI	3	86,42	28,81
29	*ISNYLAWYQ	4	98,65	24,66
46	LLIYYTSKI	33	1195,64	36,23
47	LIYYTSKIH	15	497,37	33,16
48	IYYTSKIHS	30	906,02	30,20
49	YYTSKIHS	1	20,00	20,00
50	YTSKIHS	1	25,29	25,29
54	IHSGVPSRF	2	52,00	26,00
71	YTFTISSLQ	4	115,43	28,86
73	*FTISSLQPE	3	71,05	23,68
83	IATYYCQQG	2	40,82	20,41
86	YYCQQGNTF	4	88,56	22,14
94	*FPYTFGQGT	2	44,83	22,41
98	*FGQGTKVEI	5	135,81	27,16
<u>Total score:</u>			<u>92</u>	

Muse-17E6 tungkjede

Posisjon	Sekvens	nBind	Score	Middel
2	VQLQQSGAE	5	129,45	25,89
4	LQQSGAELA	6	140,28	23,38
18	VKMSCKASG	27	881,03	32,63
27	YTFSSFWMH	2	46,55	23,28
29	FSSFWMHWV	3	80,61	26,87
32	FWMHWVKQR	18	546,68	30,37
33	WMHWVKQRP	2	59,09	29,55
36	WVKQRPQG	9	229,70	25,52
37	VKQRPQGL	4	90,82	22,70
47	WIGYINPRS	9	282,09	31,34
48	IGYINPRSG	10	280,39	28,04
51	INPRSGYTE	3	81,56	27,19
63	IFRDKATMT	7	197,95	28,28
64	FRDKATMTA	19	609,26	32,07
80	YMQLSGLTS	22	678,41	30,84
81	MQLSGLTSE	5	116,59	23,32
83	LSGLTSEDS	3	63,39	21,13
93	VYYCASFLG	11	297,27	27,02
94	YYCASFLGR	2	51,02	25,51
99	FLGRGAMDY	11	321,71	29,25
107	YWGQGTSTVT	1	23,40	23,40

108	WGQGTSVTV	2	62,07	31,03
<u>Total score:</u>		<u>181</u>		

AvI-17E6 endelig tungkjede

Posisjon	Sekvens	nBind	Score	Middel
2	VQLQQSGGE	5	129,45	25,89
18	*VKVSCKASG	12	366,95	30,58
27	YTFSSFWMH	2	46,55	23,28
29	FSSFWMHWV	3	80,61	26,87
32	FWMHWVRQA	14	673,39	48,10
33	*WMHWVRQAP	2	52,27	26,14
36	*WVRQAPGQG	17	473,32	27,84
37	*VRQAPGQGL	8	276,30	34,54
47	WIGYINPRS	9	282,09	31,34
48	IGYINPRSG	10	280,39	28,04
51	INPRSGYTE	3	81,56	27,19
63	IFRDKATMT	7	197,95	28,28
64	FRDKATMTT	10	304,58	30,46
80	*YMELSSLRS	16	481,10	30,07
81	MELSSLRSE	1	35,56	35,56
86	*LRSEDТАVY	12	357,27	29,77
93	VYYCASFLG	11	297,27	27,02
94	YYCASFLGR	2	51,02	25,51
99	FLGRGAMDY	11	321,71	29,25
107	YWGQGTSVT	1	23,40	23,40
108	WGQGTSVTV	2	62,07	31,03
<u>Total score:</u>		<u>85</u>		

5

Eksempel 5

[0129] Selv om DI-17E6 ikke kryssreagerer med fibrinogenreseptoren $\alpha\text{IIb}\beta 3$ på blodplater, uttrykker blodplater også noen αv -integriner. For å utelukke mulige bivirkninger av antistoffet på blodplater ble EMD 525797 evaluert for inhibering av blodplateaggregering *in vitro* med humant blodplaterikt plasma/kollagen. Ingen anti-aggregeringsaktivitet ble påvist, verken ved 160 mM eller 1600 nM. Aggregerings- og aktiveringsundersøkelser ble utført ved anvendelse av blodplaterikt plasma (PRP). Trombedannelse ved bruk av perfusjonskammer med eksponert subendotel-matriks.

[0130] Det eksperimentelle resultatet kan oppsummeres som følger:

DI-17E6 induserer ikke blodplateaktivering eller blodplateaggregering i noen konsentrasjon (fra svært lav til svært høy; 0,1 til 1000 $\mu\text{g/ml}$).

15

[0131] Overraskende nok blokkerer DI-17E6 blodplateaggregering induisert av en svak aggregerings-inducer som ADP på en doseavhengig måte. DI-17E6 påvirker ikke blodplateaggregering induisert av en kraftig aggregerings-inducer som kollagen. DI-17E6 påvirker (blokkerer) også blodplate-trombedannelse i perfusjonskammeret på en dose-

5 avhengig måte og viser en antitrombotisk aktivitet.

[0132] Den svake interferensen med blodplateaggregering er et uventet funn for DI-17E6 som kan vise seg å være terapeutisk anvendbar, siden en tumors nærmiljø er karakterisert ved mange trombogene karseter.

10 **Eksempel 6**

Anti-angiogen aktivitet in vivo i xenotransplantat-tumormodeller i mus

[0133] Human hud inneholdene humane M21-melanomceller ble innpodet ved implantasjon/transplantasjon i SCID-mus eller nakne mus. Eksperimentelle tumorer vokste i dette vevet etter intradermal inokulering av tumorceller, og den innledende

15 angiogene vaskulator var avledet fra blodkar i den humane huden. I det neste eksperimentet betyr anvendelsen av M21-L-celler, som ikke har αv -integriner, at kun de integriner som uttrykkes på endotelcellene i den transplanterte humane huden kunne fungere som målmolekyler for antistoffet.

[0134] DI-17E6 inhiberte veksten av M21-L-tumorer i SCID-mus-human hud-kimær-

20 modellen og var aktiv i en dose på 1 mg/dose tilført i.p. 3 ganger i uken med start av behandlingen én dag etter inokulering av tumorcellene (Figur 4). Dette funnet viser at EMD 525797 utøver en anti-angiogen virkning på tumorveksten.

Eksempel 7

25 Inhibering av vekstfaktorindusert angiogenese i Matrigel-plugg-modellen i aper ved i.v. injeksjon av EMD 525797

[0135] For å utvide vurderingen av den anti-angiogene aktiviteten av EMD 525797 ble antistoffet testet i en tumorfri modell i aper, hvor angiogenese induseres av den angiogene faktoren bFGF.

30 **[0136]** Matrigel-plugger som inneholdt bFGF ble implantert subkutan i buken til friske cynomologus-aper. Dyrene ble injisert i.v. én gang med EMD 525797, enten med 10 mg/kg eller 30 mg/kg. Evaluering av angiogenese ble utført 6 dager senere ved kvantifisering av hemoglobinnholdet i Matrigel-pluggene. Behandling av aper med EMD 525797 blokkerte dannelse av nye blodkar på en doseavhengig måte, og var

35 svært effektiv i en dose på 30 mg/kg, men inaktiv ved en dose på 10 mg/kg (Figur 5).

Eksempel 8

In vitro-analyse av DI17E6 i kombinasjon med kjemoterapeutiske midler i HUVE-celler

[0137] I denne undersøkelsen ble representative kjemoterapeutiske midler fra forskjellige klasser av inhibitorer i kombinasjon med alfa-v-integrininhhibitoren cilengitide og Di-17E6 undersøkt. Den eksperimentelle utformingen besvarer spørsmålet om hvorvidt blokkering med det ene middelet reduserte IC₅₀ av det andre for blokkering av endotelcellevekst i nærvær av tumorvekstfaktorene VEGFA og FGF2. Analysene ble utført med HUVEC-celler og endotelceller fra mikrokår, som ble tilført VEGFA og FGF2, som stimulerer veksten av slike celler med en faktor på opp til 500 %.

[0138] Plater ble belagt med 100 µl VN i en konsentrasjon på 1 µg/ml i PBS pr. 96 brønner ved 4 °C over natten. Celler ble utsådd med 5x10³ celler/brønn i 100 µl Medium 199 tilsatt 2 % FCS. Etter 60 minutter ved 37 °C ble alfa-V-integrinblokkere og kjemoterapeutiske midler tilsatt, alene eller i kombinasjon, i to gangers konsentrasjon i 100 µl/brønn i Medium 199 pluss 2 % FCS og 20 ng/ml FGF-2 for HUVEC-cellene eller med 20 ng VEGF for HDMVEC-cellene (den endelige konsentrasjonen av vekstfaktorene var 10 ng/ml). Tilsatt i kombinasjon ble de to analyseforbindelsene sammenblandet i utgangskonsentrasjonene, og blandingen ble seriefortynnet, som for de enkelte midlene alene. I noen analyser ble de kjemoterapeutiske midlene seriefortynnet i nærvær av en konstant mengde av alfa-V-blokkerne ved IC₅₀- eller IC₇₀-konsentrasjonen. Platene ble inkubert i 72 timer, hvorefter det relative celletall ble bestemt ved tilsetning av 20 µl/brønn Alamar Blue (Resazurin). Etter 4 timers inkubering ved 37 °C ble fluorescensen avlest i en Genios plateleser (SLT) ved 535/590 nm (eksitasjon/emisjon).

[0139] Punktene ble analysert i duplikat eller i triplikat. Reagens-nullprøver, som inneholdt medium pluss Alamar Blue uten celler, ble analysert i hver plate. Nullverdiene ble subtrahert fra analyseverdiene og var rutinemessig 5-10 % av de ikke-inhiberte kontrollverdiene.

[0140] Cilengitide ble analysert i området 50 µM til 0,1 nM. Antistoffene 17E6 og DI-17E6 ble analysert i konsentrasjonsområdet 50 µg/ml til 0,1 ng/ml.

Utgangskonsentrasjonen av de kjemoterapeutiske midlene som har blitt analysert gis i tabellen nedenfor.

Kjemoterapeutisk middel	Virkningsmekanisme	Utgangskonsentrasjon
Taksol	Taksan/mikrotubuli	50 ng/ml
Etoposid	Topoisomerase II-inhibitor	100 µM
Vinkristin	Vinca-alkaloid/mikrotubuli	10 nM
Cis-platinin	Platina-analog	200 µM
Kamptotecin	topoisomerase I-inhibitor	10 µM
Doksorubicin	antrasyklin	1 µM
Melfalan	Alkylerende middel	100 µM

Kjemoterapeutisk middel	Virkningsmekanisme	Utgangskonsentrasjon
Temazolomid	Alkylerende middel	50 μ M
Estramustin	Alkylerende middel	100 μ M
5-FU	antimetabolitt	100 μ M
Gemcitabin	antimetabolitt	nM

[0141] Den alfa V-integrinblokkerende forbindelsen cilengitide (EMD 121974) og to alfa V-integrinfunksjon-blokkerende antistoffer, 17E6 (EMD 73034) og dets av-immuniserte form DI-17E6 (EMD 525797), ble analysert alene og i kombinasjon med vanlige kjemoterapeutiske midler i en vekstanalyse med FGF-stimulering og anvendelse av konvensjonelle humane endotelceller (HUVEC) eller i en VEGF-stimulerings-analyse ved anvendelse av humane endotelceller fra dermal mikrovaskulatur. I dette analysesystemet dyrkes cellene i et medium med redusert serum (2 % FCS i Medium 199) med FGF-2 eller VEGF som eneste vekststimulus. Vekstfaktorene FGF2 viste seg å være den beste vekststimulerende middel for HUVEC, og VEGF var det beste stimulerende middel for HDMVEC, målt ved anvendelse av Alamar Blue-analysen. HUVEC tilsatt 12,5 ng/ml FGF-2 viste en 406 % økning og med VEGF en 238 % økning sammenlignet med kontrollceller som ikke var tilført vekstfaktorer etter 72 timers vekst på VN. I motsetning til dette ble HDMVEC fortrinnsvis stimulert av VEGF snarere enn FGF-2 (484 %). Analysene ble rutinemessig utført ved anvendelse av HUVEC i medium tilsatt 10 ng/ml FGF-2 eller HDMVEC i medium tilsatt 10 ng/ml VEGF. Alfa V-integrin-blokkerne og paklitaksel inhiberte celleveksten når disse ble tilsatt som eneste middel. I en typisk analyse ved anvendelse av HUVEC var IC₅₀ for cilengitide 700 nN, for 17E6 5 ng/ml og for DI-17E6 4 ng/ml. For paklitaksel var IC₅₀ 0,27 ng/ml når tilsatt alene, med IC₅₀ ble redusert til 0,13 ng ved anvendelse i kombinasjon med cilengitide. Antistoffene 17E5 og DI-17E6 ga en reduksjon av IC₅₀ for paklitaksel til 0,18 ng/ml henholdsvis 0,1 mg/ml. Et typisk resultat for DI17E6 anvendt i kombinasjon med paklitaksel vises i Figur 6.

[0142] Den additive virkningen av paklitaksel med alfa V-integrin-blokkere ble også beholdt med HDMVEC. Den fullstendige listen over analyserte kjemoterapeutiske midler vises i den påfølgende Tabell.

Kjemoterapeutisk middel	Cilengitide	Mab 17E6	DI-17E6	IC50
Taksol	ja	ja	ja	0,3 ng/ml
Etoposid	ja	ja	ja	0,7 μ M
5FU	ja	ja	ja	14,5 μ M
Cisplatinin	ja	ja	ja	13,2 μ M
Melfalan	ja	ja	ja	11,4 μ M

Doksorubicin	ja	ja	ja	0,2 µM
Kamptotecin	ja	ja	ja	0,08 µM
Vinkristin	ja	ja	ja	0,7 nM
Gemcitabin	ja	ja	ja	4 nM
Estramustin	nei	nei	nei	182 µM
Temozolmid	nei	nei	nei	inaktiv
121974				296 nM
Mab 17E6				5 ng/ml
DI-17E6				4 ng/ml

[0143] Resultatene viser at DI-17E6 i HUVEC gir en klar additiv virkning ved kombinasjon med et andre terapeutisk middel, for eksempel paklitaksel, mens andre kjemoterapeutiske midler i kombinasjon med et modifisert antistoff ifølge oppfinnelsen

5 viser ingen virkning eller bare en svak additiv virkning.

Eksempel 9

In vitro-analyse av DI17E6 i kombinasjon med kjemoterapeutiske midler i forskjellige humane melanomceller.

10 **[0144]** I en *in vitro*-proliferasjonsanalyse ble virkningen av en rekke velkjente kjemoterapeutiske midler som benyttes i tumorbehandling undersøkt i kombinasjon med DI-17E6 i forskjellige humane melanomcellelinjer: m21, SKMEL-23, SKMEI, MeWo, WM-793.

15 **[0145]** Resultatene viser at det kun er små forskjeller når det gjelder det anvendte kjemoterapeutiske middel (i dette tilfellet cisplatin, paklitaksel, vinblastin, vinkristin og temoyolomid).

[0146] Forskjeller er påvisbare når det gjelder den anvendte tumorcellelinje. I alle tilfeller ga DI-17E6 ikke mer enn additive virkninger til det kjemoterapeutiske middelet.

20 **[0147]** I oppsummering: ingen virkning eller kun en svak additiv virkning ble observert med kombinasjonen DI-17E6 pluss kjemoterapeutisk middel for tumorcellelinjer som ikke er følsomme overfor DI-17E6. En kraftig additiv virkning kunne påvises med kombinasjonen DI-17E6 pluss kjemoterapeutisk middel for tumorcellelinjer som er følsomme overfor DI-17E6. I dette tilfellet tilsvarer proliferasjonsprofilen

25 den som er vist for paklitaksel + DI-17E6 i HUVEC (se Figur 6).

Eksempel 10

Synergistisk kombinasjon av DI-17E6 og cilengitide in vitro

30 **[0148]** Uventede funn har blitt oppnådd ved analyse av kombinasjoner av DI-17E6 og cilengitide *in vitro*. NSCLC-cellelinjene H322, A549, H1975 og H460, den humane

myelomcellelinjen M21 og nyrekarsinomcellelinjene ACHN, A498, Caki 1 og Caki2 ble behandlet med cilengitide i nærvær av DI-17E6. Resultatene viste betraktelig mer celledød etter 3 dagers dyrkning i normalt medium enn i nærvær av cilengitide eller DI-17E6 alene.

- 5 Et typisk eksperimentelt oppsett for analyse av den synergistiske virkningne av DI-17E6 og cilengitide ble utført som en proliferasjonsanalyse med M21-, CAKI-2- og A498-celler:

96-brønners plater har blitt belagt med vitronektin, og etter blokkering har celler blitt tilsatt (3000-5000 celler/brønn), og etter 4 timer (tilstrekkelig tid til at cellene fester seg og sprer seg) tilsettes medikamenter og får vokse i nærvær av seriefortynnet cilengitide
10 alene eller sammen med DI-17E6 i en konsentrasjon på 1 µg/ml. Cellene har videre blitt inkubert i 3 dager, og cellenes levedyktighet ble målt ifølge instruksjonene fra leverandøren av Alamar Blue-reagenset.

[0149] Figur 7 viser graden av celledød for kombinasjonen i M21-celler (øvre kurve: cilengitide alene, nedre kurve cilengitide + DI-17E6).
15

[0150] Figur 8 viser graden av celledød for kombinasjonen i CAKI-2-celler (øvre kurve: cilengitide alene, nedre kurve cilengitide + DI-17E6).

[0151] Figur 9 viser graden av celledød for kombinasjonen i A498-celler (øvre kurve: cilengitide alene, nedre kurve cilengitide + DI-17E6).

[0152] Dette er et uvanlig funn, med begge alfav-integrin-bindere tenker seg forhånds-
20 metning av systemet med en allosterisk inhibitor før pulsede tilsetninger av den kompetitive inhibitor i fortsatt nærvær av den allosteriske inhibitor. Dette gir en synergistisk blokkering av integrinet, noe som gir en kraftig forsterkning av virkningen av den kompetitive inhibitor alene eller sterisk/allosterisk inhibitor alene. Det er viktig
25 at kontinuerlig nærvær av de kompetitive inhibitorene vanligvis ikke er nødvendig, dens roller er å frigjøre den primære interaksjonen og gi tilgang til den allosteriske inhibitoren.

Eksempel 11

30 *In vivo-analyse av DI-17E6 i kombinasjon med kjemoterapeutiske midler Gemcitabin pluss DI-17E6 i humane bukspyttkjertelceller NP18-b3*

[0153] Veksten av en ortotopisk xenotransplantert bukspyttkjerteltumor i nakne mus ble undersøkt under systemisk EMD 525797 pluss samtidig behandling med gemcitabin. Gemcitabin ble valgt for kombinasjonsbehandlingen av en modell med
35 ortotopisk xenotransplantert human bukspyttkjerteltumor, siden dette er det beste godkjente kjemoterapeutiske middel for denne indikasjonen.

[0154] Den humane bukspyttkjertel-cellelinjen NP18-b3, som uttrykker $\alpha\beta3$ -integrin, ble implantert ortotopisk i bukspyttkjertelen til immunsupprimerte mus.

Dyrene ble tilfeldig fordelt på grupper, og en uke senere startet behandlingen med medikamenter og bærer.

[0155] Tumorer ble fjernet og kuttet i biter på 10 mg. Disse bitene ble så sydd fast til bukspyttkjertelen til friske dyr (én bit pr. dyr). 4-6 uker senere ble tumorene fjernet, igjen kuttet i biter og sydd inn i nye dyr. Disse nye dyrene ble så tilfeldig fordelt i grupper, og en uke senere startet behandlingen med medikamenter og bærer. EMD 525797 ble dosert i.p. i en dose på 500 µg pr. dyr tre ganger i uken. Gemcitabin ble tilført som en suboptimal dose på 50 mg/kg 3 ganger i uken (suboptimal dose basert på tidligere undersøkelser). I en fjerde gruppe ble EMD 525797 kombinert med sub-optimale doser av gemcitabin, basert på tidligere eksperimenter. Måling av tumorveksten (vekten av de fjernede tumorene) ble utført 6 uker etter transplantasjon av tumoren.

[0156] Ortotopiske tumorer behandlet med EMD 525797 hadde tilsvarende størrelse og vekt som i kontrolldyr behandlet med bærer. På tilsvarende måte var heller ikke gemcitabin aktiv i den suboptimale dosen. I den samme dosen som i behandlingen med ett medikament alene hadde imidlertid gemcitabin pluss EMD 525797 en synergistisk aktivitet, med en reduksjon av tumoren på 52 % (Figur 10).

Cisplatin/dakarbazin pluss DI-17E6 i modeller med xenotransplantert humant M21- eller MeWo-melanom

[0157] Humane M21- eller MeWo-melanomceller positive for ekspresjon av $\alpha\text{v}\beta 3$ -integrin ble inokulert subkutan i SCID-mus eller nakne mus ifølge velkjente standardfremgangsmåter.

DI-17E6 ble tilført systemisk sammen med enten cisplatin (cPT) eller dakarbazin (DTIC), to kjemoterapeutiske midler som anvendes i klinisk behandling av melanom.

DI-17E6 ble tilført i.p. en gang i uken fra og med samme dag som M21- eller MeWo-celler ble injisert s.c. i dyrene, i en suboptimal ukentlig vedlikeholdsdose på 27,2 mg/kg (tilsvarer tilnærmet 500 µl/ml serum). DTIC ble tilført i.p. en gang i uken i en dose på 50 mg/kg, og cPT ble tilført i.p. en gang i uken i en dose på 10 mg/kg, begge med start 11 dager etter injeksjonen av tumorceller.

[0158] Resultatene erholdt med cisplatin i M21-xenotransplantatmodellen vises i Figur 11.

I motsetning til *in vitro*-resultatene vist tidligere gir kombinasjonen av cisplatin pluss DI-17E6 *in vivo* en statistisk signifikant, synergistisk økning av responsen, sammenlignet med tilførsel av hver medikamentbehandling alene.

[0159] Resultatene erholdt med DTIC i MeWo-xenotransplantatmodellen vises i Figur 12.

I motsetning til *in vitro*-resultatene vist tidligere gir kombinasjonen av cisplatin pluss DI-17E6 *in vivo* en statistisk signifikant, synergistisk økning av responsen, sammenlignet med tilførsel av hver medikamentbehandling alene.

Eksempel 12

In vivo-analyse av DI-17E6 i en musemodell med xenotransplantert humant CAKI-1-nyrekarsinom

[0160] CAKI-1 ble inokulert subkutan i SCID-mus eller nakne mus ifølge velkjente standardfremgangsmåter.

DI-17E6 ble tilført systemisk i.p. en gang i uken fra samme dag som M21- eller MeWo-celler ble injisert s.c. i dyrene i forskjellige doser.

[0161] Figur 13 viser at DI-17E6 overraskende nok kan redusere tumorvolumet/-størrelsen fra lave (1 µg/ml) til middels (100 µg/ml serum) doser i tilnærmet samme grad (ingen virkelig doseeffekt), mens tilførsel av en høy dose 500 µg/ml fører til fullstendig reduksjon av tumorvolumet.

Eksempel 13:

Kombinatorisk virkning av DI-17E6 med cetuksimab (Erbix®) i en modell med xenotransplantert humant CAKI-1-nyrecellekarsinom.

[0162] Nyrecellekarsinom-cellelinjen CAKI-1 ble dyrket i RPMI tilsatt 10 % FCS (varmeinaktivert) pluss 2 mM glutamin, 1 mM natriumpyruvat, 100 enheter/ml penicillin og 199 µg/ml streptomycin. Cellene ble overført ved konfluens ved en gangs vask med kation-fritt PBS fulgt av 3 minutters inkubering i trypsin (0,5 µg/ml)/EDTA (0,2 µg/ml)-løsning i PBS ved 37 °C. Cellene ble overført til medium, sentrifugert, suspendert i medium og tellet.

[0163] Dyrene som ble anvendt i denne undersøkelsen ble levert av HARLAN INTERFAUNA IBERICA S.L. (Sant Feliu de Codines (Barcelona), Spania) og oppstallet under akklimatiseringstiden på minst 5 dager i karantenerommet i spesifikt patogenfrie anlegg.

[0164] Under akklimatiseringen ble alle observasjoner registrert. Alle dyr ble undersøkt av en veterinær for å sikre dyrenes helse.

[0165] Behandlingen startet for alle grupper på eksperimentets dag 0 (samme dag som cellene ble injisert).

[0166] Dyrene ble behandlet intraperitonealt (i.p.) med produkt eller bærer i et volum på 10 mg/ml en gang i uken for EMD 525797 og to ganger i uken for Erbitux.

[0167] Behandlingsdosene for EMD 525797 ble justert til de forventede bunnverdiene i serum på 100 µg/ml. For å nå disse bunnverdiene i serum ble dyrene dosert etter en enkel innledende dose på 17,1 mg/kg pluss flere (ukentlige) vedlikeholdsdoser på 5,1 mg/kg, som beskrevet i neste tabell.

[0168] Alle dyr ble observert daglig og kontrollert for fysisk tilstand, adferd, forekomst av skader og eventuelle kliniske tegn.

Grupper:

Gruppe	Forbindelse tilført	Bunnverdi i serum (µg/ml)	Enkelt innledende dose av DI17E6 (mg/kg)	Ukentlige vedlikeholdsdoser (mg/kg)	Antall dyr
A	Bærer (PBS)	0	0	0	10
B	DI17E6	100	17,1	5,1 (ukentlig)	10
C	Erbitux	-	12	12 (2 ganger i uken)	10
D	Erbitux	-	4	4 (2 ganger i uken)	10
E	DI17E6+Erbitux	100	17,1/12	5,1 (hver uke)/12 (2 ganger i uken)	10
F	DI17E6+Erbitux	100	17,1/4	5,1 (hver uke)/4 (2 ganger i uken)	10

5

[0169] Dyr med xenotransplanterte humane CAKI-1-nyretumorer ble behandlet med DI17E6, Erbitux eller kombinasjonen av de to med start på dag 0, da tumorcellene ble inokulert. Varigheten av behandlingen for DI17E6 var 40 dager og for Erbitux og kombinasjonsgruppene 29 dager. Tumorveksten ble fulgt opp til 111 dager etter inokulasjonen av tumorceller. Behandling med en innledende dose på 17,1 mg/kg fulgt av en ukentlig behandling med 5,1 mg/kg DI17E6 førte til bunnverdier på 100 µg/ml, noe som ga en signifikant inhibering av tumorveksten på dag 40, hvor behandlingen ble avsluttet (T/C: 25 %).

10

[0170] Etter dag 40 kunne en forsinkelse av veksten fortsatt observeres til observasjonsperiodens avslutning. Behandling to ganger i uken med enten 4 mg/kg eller 12 mg/kg Erbitux ga en kraftig og signifikant anti-tumorstørrelse. T/C på dag 29, hvor behandlingen ble avsluttet, var 9 %. En tilsvarende kraftig anti-tumorstørrelse ble observert for de to kombinasjonene DI17E6 pluss 4 mg/kg Erbitux 2/uke og DI17E6 pluss 12 mg/kg 2/uke. TC på dag 29, hvor behandlingen ble avsluttet, var 10 % henholdsvis 9 % (se tabell 1).

15

20

[0171] Det bør bemerkes at 10 µg/ml serum/plasma tilsvarer 0,55 mg/kg kroppsvekt.

[0172] Tumorene i behandlingsgruppene med Erbitux alene begynte imidlertid å vokse videre etter avsluttet behandling. I motsetning til dette fortsatte inhiberingen av tumorveksten i de to kombinasjonsgruppene, noe som fremgår av den avtagende middelvei og medianverdi for tumorstørrelsen (Figur 14).

25

[0173] Ved avslutningen av observasjonstiden for de to kombinasjonsgruppene hadde bare én av tumorene nådd volumet den hadde på dag 7, som representerer dagen for den første målingen av tumorstørrelsen.

5 **[0174]** I gruppene som bare ble behandlet med Erbitux vokste 3 tumorer til en betydelig størrelse ($> 1000 \text{ mm}^3$), og de fleste av dem vokste til en størrelse som lå over tumorstørrelsen på dag 7.

[0175] Generelt ble alle behandlinger godt tålt, noe som vises av vektøkningen i løpet av eksperimentet. Vektreduksjonen i bærergruppen og i den DI17E6-behandlede gruppen på én enkelt måledag skyldes trolig manglende vannforsyning. I de to
10 relevante gruppene var vektreduksjonen reversibel, fulgt av en stadig vektøkning.

[0176] Behandling med en innledende dose på 17,1 mg/kg fulgt av en ukentlig dose på 5,1 mg/kg DI17E6, som førte til bunnverdier på 100 µg/ml under behandlingstiden, førte til en signifikant vekstinhibering av humane CAK-1-nyretumorer. Også
15 behandling med to forskjellige doser av Erbitux alene med tilførsel to ganger i uken ga en signifikant inhibering av tumorveksten. De to dosene av Erbitux var tilnærmet like effektive i sin anti-tumoraktivitet. Kombinasjonen av DI17E6 og enten 4 mg/kg Erbitux eller 12 mg/kg Erbitux ga også en kraftig anti-tumorvirkning, som er sammenlignbar med behandlingene med Erbitux alene under behandlingstiden.

[0177] Den slående forskjellen mellom behandlingene med Erbitux alene og kombinasjonsbehandlingene er imidlertid vekstadferden etter behandlingens avslutning på dag 29. Så lenge som 82 dager etter behandlingens avslutning hadde bare én av tumorene i kombinasjonsgruppen vokst til samme størrelse som på dag 7, den første dag hvor tumorstørrelsen ble målt, noe som betyr at tumorene behandlet med DI17E6 og Erbitux enten hadde regresjon eller viste stabil sykdom.

25 **[0178]** I motsetning til dette vokste noen tumorer i de to gruppene behandlet med Erbitux alene etter behandlingens avslutning til en betydelig størrelse (varierende fra 429 til 3581 mm³), noe som tyder på at kombinasjonen av DI17E6 og Erbitux kan forhindre forverring av tumorveksten etter behandling med Erbitux.

[0179] Den kraftige synergistiske virkningen av DI-17E6 på behandling med tyrosinkinaseinhibitorer, for eksempel cetuximab (Erbitux®), kan anses som ekstraordinær
30 og åpner feltet for en lovende kombinasjonsbehandling av tumorer.

P a t e n t k r a v

1. Modifisert rekombinant anti- α v-integrin-hybridantistoff, omfattende

(i) lettkjede-CDR-områdene:

CDR1: RASQDISNYLA,

CDR2: YTSKIHS,

CDR3, QQGNTFPYT,

(ii) tungkjede-CDR-områdene:

CDR1: SFWMH,

CDR2: YINPRSGYTEYNEIFRD,

CDR3: FLGRGAMDY,

(iii) lettkjede-rammeverkområdene:

FR-1: DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC,

FR-2: WYQQKPGKAPKLLIY

FR-3: GVPSRFSGSGSGTDYTFTISLQPEDIATYYC

FR-4: FGQGTKVEIK,

(iv) tungkjede-rammeverkområdene:

FR1: QVQLQQSGGELAKPGASVKVCKASGYTFS

FR2: WVRQAPGQGLEWIG

FR3: KATMTTDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAS

FR4: WGQGTTVTVSS

og

(v) et konstant tungkjedeområde avledet fra humant IgG og et humant konstant lettkjedeområde.

2. Modifisert antistoff ifølge krav 1, hvor det konstante tungkjedeområde er avledet fra IgG2.

3. Modifisert antistoff ifølge krav 2, hvor det konstante IgG2-området omfatter et modifisert IgG1-hengselområde.

4. Modifisert antistoff ifølge krav 3, hvor det modifiserte IgG1-hengselområde omfatter sekvensen EPKSSDKTHTCPPCP.

5. Modifisert antistoff ifølge ethvert av kravene 2 til 4, hvor det konstante IgG2-område er modifisert ved å erstatte aminosyre N med Q i posisjon 297.

6. Modifisert antistoff ifølge krav 5, hvor aminosyrerest F i posisjon 296 er erstattet med A for å fjerne en T-celleepitop som dannes ved modifikasjonen i posisjon 297.

5 7. Modifisert antistoff ifølge ethvert av kravene 1 til 6, hvor og det konstante lettkjedeområde er humant kappa.

8. Rekombinant anti- α v-integrin-hybridantistoff ifølge ethvert av de foregående krav, bestående av

10 (i) variable og konstante lettkjedesequenser:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYYTSKIH
SGVPSRFSGSGSGTDYTFITISSLQPEDVATYYCQQGNTFPYTFGQGTKVEIKRTVAA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKDSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

og

(ii) variable og konstante tungkjedesequenser:

QVQLQQSGGELAKPGASVKVSCKASGYTFSSFWMHWRQAPGGGLEWIGYINP
RSGYTEYNEIFRDKATMTTDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCASFLGRGAMDY
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTV
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQAQSTFRVVSVLTQVHQLDWSLNGKEYKCKV
 NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALH
 NHYTQKSLSLSPGK,

15 9. Fusjonsprotein, omfattende et antistoff ifølge ethvert av kravene 1 til 8 fusjonert via C-enden til et cytokin eller en vekstfaktor.

10. DNA-molekyl som koder for et antistoff eller antistoff-fusjonsprotein som beskrevet i ethvert av kravene 1 til 9.

20 11. Ekspresjonsvektor, omfattende et DNA-molekyl ifølge krav 10.

12. Proteinekspresjonssystem, omfattende en pattedyrvertscelle transformert med ekspresjonsvektoren ifølge krav 11, hvor en human vertscelle er utelukket.

13. Farmasøytisk sammensetning, omfattende et antistoff eller antistoff-fusjonsprotein som beskrevet i kravene 1 til 9 i en farmasøytisk effektiv mengde, om ønskelig sammen med et farmasøytisk akseptabelt bærestoff, et fortynningsmiddel eller en eksipiens.

14. Farmasøytisk sammensetning omfattende et første og et andre farmasøytisk effektivt, terapeutisk middel, hvor det første middel er et antistoff eller antistoff-fusjonsprotein som beskrevet i kravene 1 til 9 og det andre middel er utvalgt fra gruppen som består av: et kjemoterapeutisk middel, en angiogenese-inhibitor og et antitumormiddel, om ønskelig sammen med et farmasøytisk akseptabelt bærestoff, et fortynningsmiddel eller en eksipiens.

15. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 14, hvor anti-tumormiddelet er et anti-tumorantistoff.

16. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 15, hvor anti-tumorantistoffet er et anti-EGFR-antistoff eller et anti-Her2-antistoff.

17. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 16, hvor anti-tumorantistoffet er anti-EGFR-antistoffet cetuximab eller matuzumab.

18. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 14, hvor angiogenese-inhibitoren er integrin-inhibitoren cilengitide.

19. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 14, hvor det kjemoterapeutiske middel er cisplatin, DTIC eller darkarbazin.

20. Modifisert antistoff eller antistoff-fusjonsprotein som beskrevet i ethvert av kravene 1 til 9 for anvendelse i behandling av faste tumorer eller tumormetastaser.

21. Modifisert antistoff ifølge krav 20 for anvendelse ifølge krav 20, hvor virkningen på tumorveksten er uavhengig av den indirekte anti-tumovirkningen av antistoffet som skyldes dets angiogenese-blokkerende virkning.

22. Farmasøytisk sammensetning ifølge kravene 13 til 19 for anvendelse i behandling av tumorer.

23. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 16 for anvendelse i behandling av tumorer, hvor anti-tumorantistoffet er et anti-EGFR-antistoff og det modifiserte rekombinante antistoff forhindrer eller forsinker gjenvekst av tumoren etter avsluttet tilførsel av det modifiserte antistoff.

5

24. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 23 for anvendelse ifølge krav 23, hvor det første terapeutiske middel er det modifiserte antistoff ifølge krav 8 og det andre terapeutiske middel er cetuximab.

10

Figur 1A

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S
 GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGTGACAGAGTGACCATCACCTGTAGGGCAAGT
 Q D I S N Y L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y Y T S
 CAGGACATTAGCAATTATTTAGCCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGTAAGGCTCCAAAGCTGCTGATCTACTACACATCA
 K I H S G V P S R F S G S G S G T D Y T F T I S S L
 AAAATCCACTCAGGTGTGCCAAGCAGATTACGCGGTAGCGGTAGCGGTACCGACTACACCTTCACCATCAGCAGCCTC
 Q P E D I A T Y Y C Q Q G N T F P Y T F G Q G T K V
 CAGCCAGAGGACATCGCCACCTACTACTGCCAACAGGGTAATACGTTTCCGTACACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTG
 E I K
 GAAATCAAA

SEKV.ID. NR. 1

Figur 1B

Q V Q L Q Q S G G E L A K P G A S V K V S C K A S G
 CAGGTCCAGCTTCAGCAGTCTGGGGGCGAACTGGCCAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTGTCTGCAAGGCTTCTGGC
 Y T F S S F W M H W V R Q A P G Q G L E W I G Y I N
 TACACCTTTAGTAGTTTCTGGATGCACTGGGTAAGACAGGCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAAT
 P R S G Y T E Y N E I F R D K A T M T T D T S T S T
 CCTAGATCTGGTTATACTGAGT_aTAATGAGATATTACAGGACAAGGCCACAATGACTACCGACACCTCCACCAGCACA
 A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A S F L G R G A
 GCCTACATGGAGCTGAGTAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCAGTCTATTACTGTGCAAGTTTTCTGGGACGAGGGGCT
 M D Y W G Q G T T V T V S S
 ATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCACCGTCACCGTCTCCTCA

SEKV.ID. NR. 2

Figur 1C

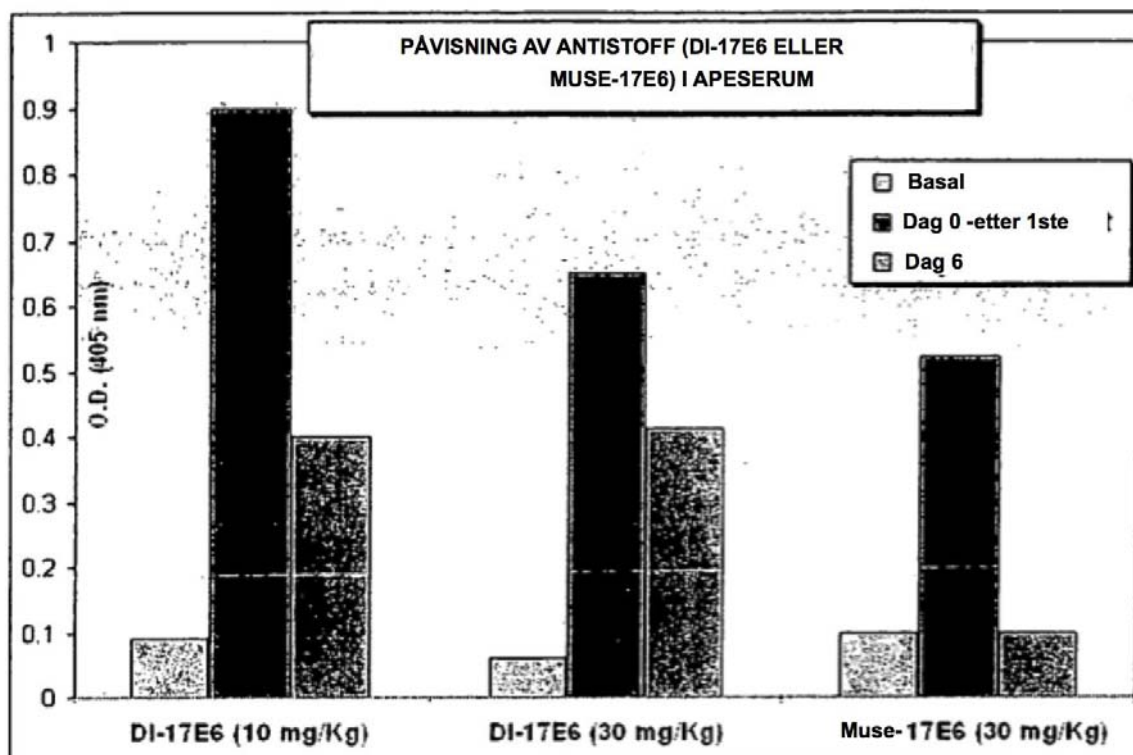
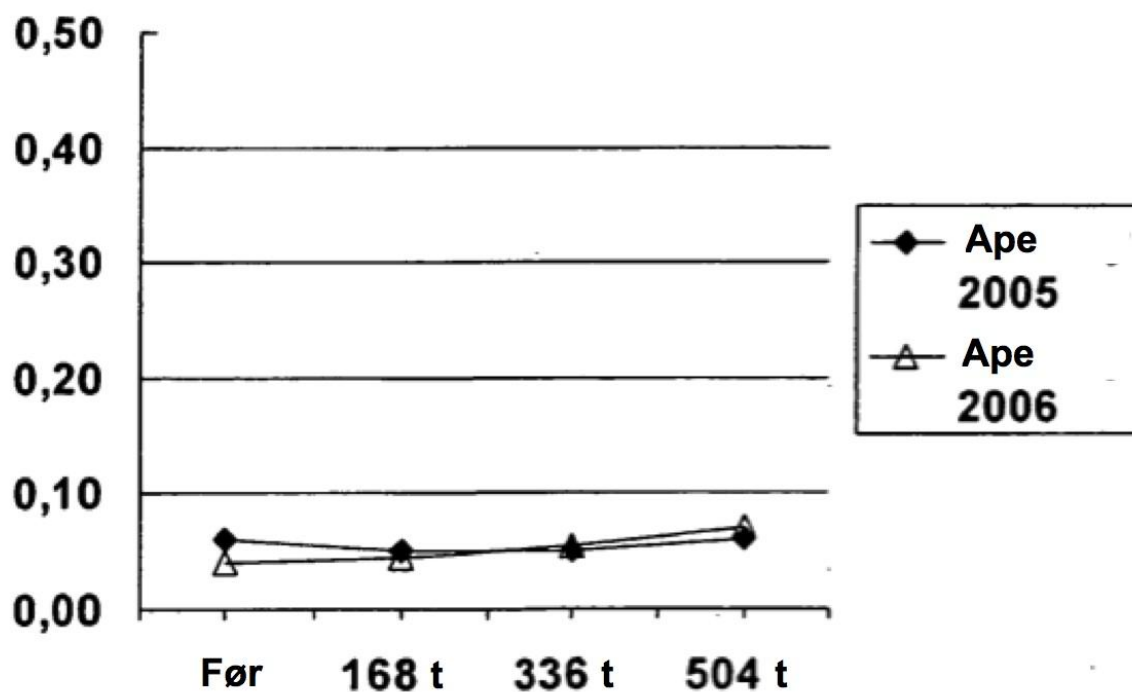
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYYTSKIHSGVPS
RFSGSGSGTDYTFITISLQPEDIAITYYCQQGNTPPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

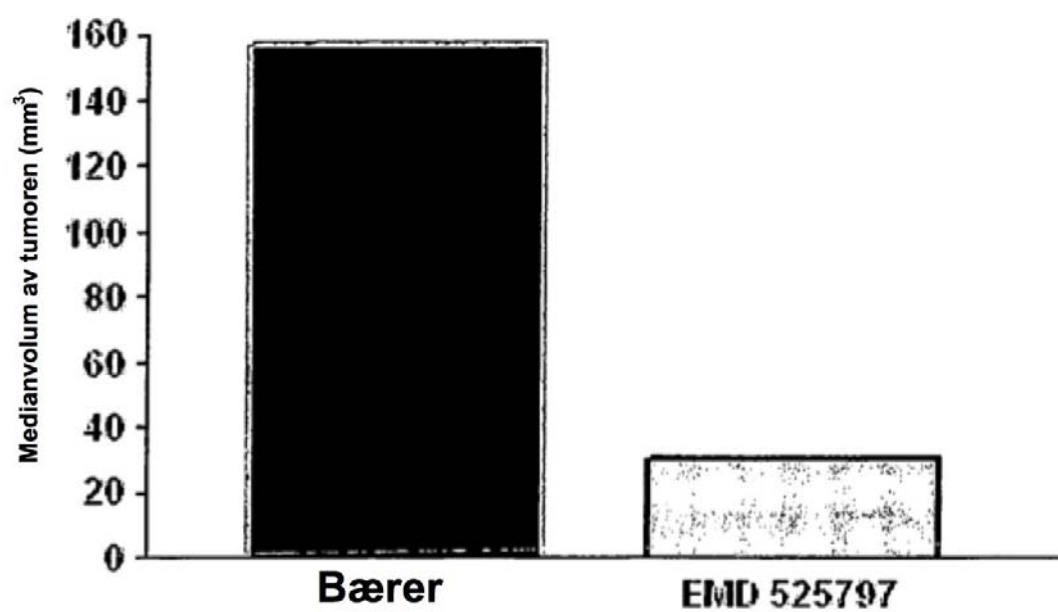
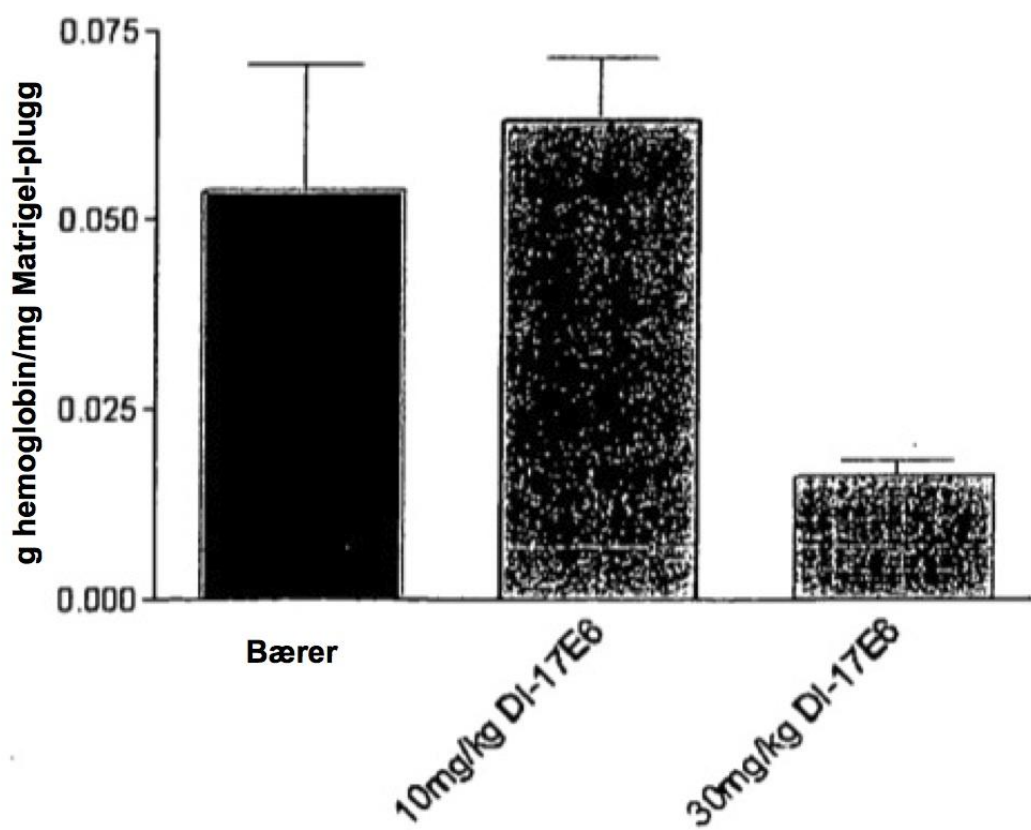
SEKV.ID. NR. 3

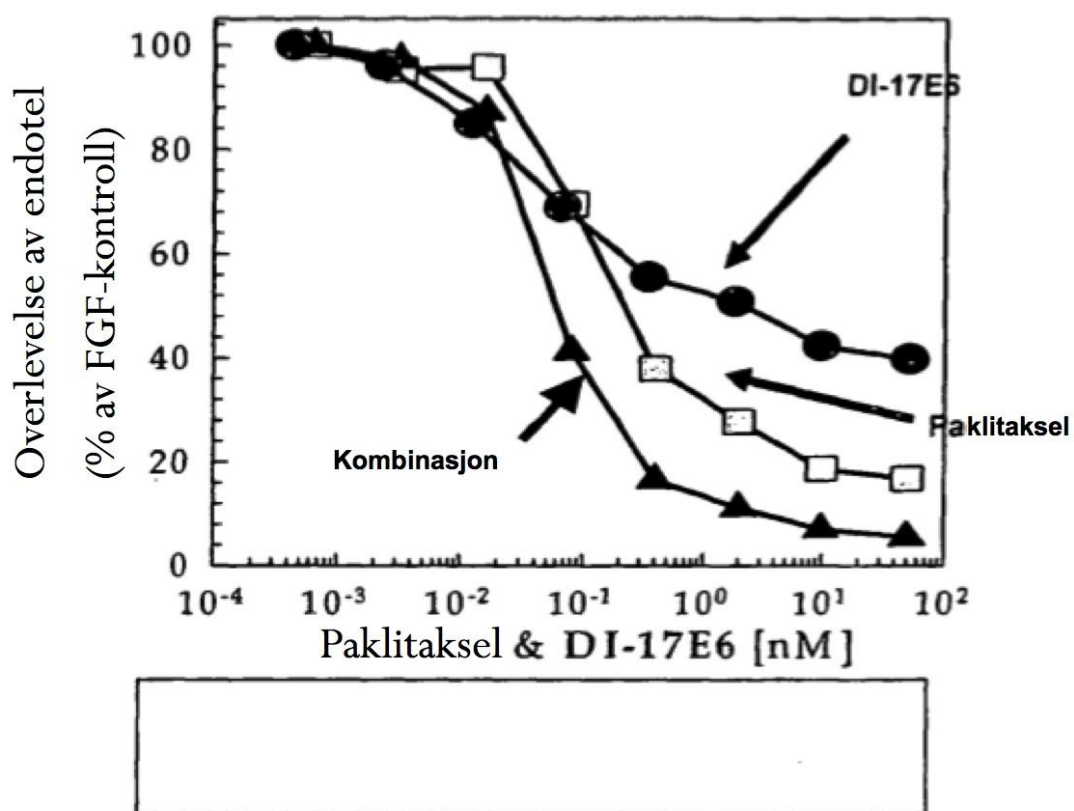
Figur 1D

QVQLQQSGGELAKPGASVKVSCKASGYTFSSFWMHVVRQAPGQGLEWIGYINP
RSGYTEYNEIFRDKATMTTDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASFLGRGAMDY
WGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTV
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQAQSTFRVSVTLTVVHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALH
 NHYTQKSLSLSPGK

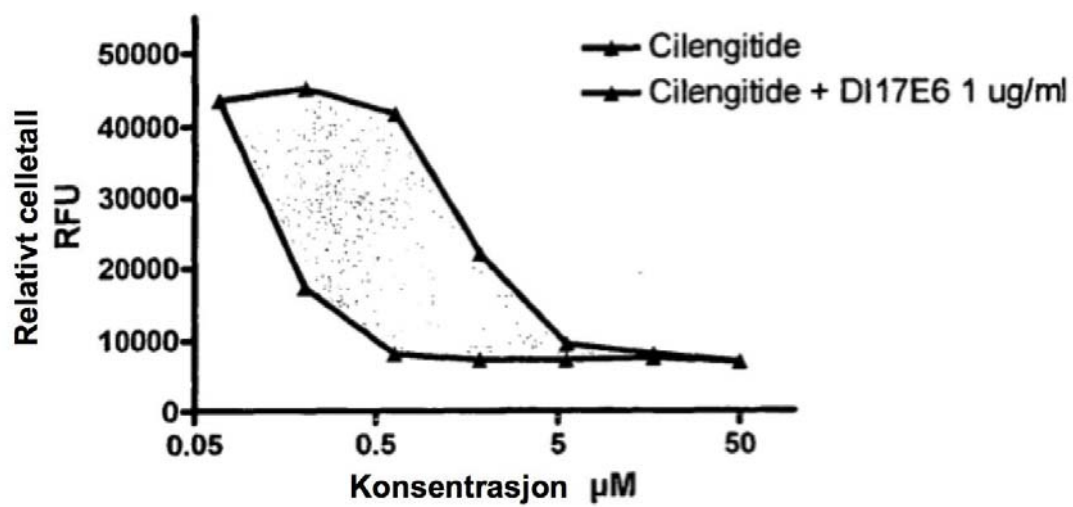
SEKV.ID. NR. 4

Figur 2**Figur 3**

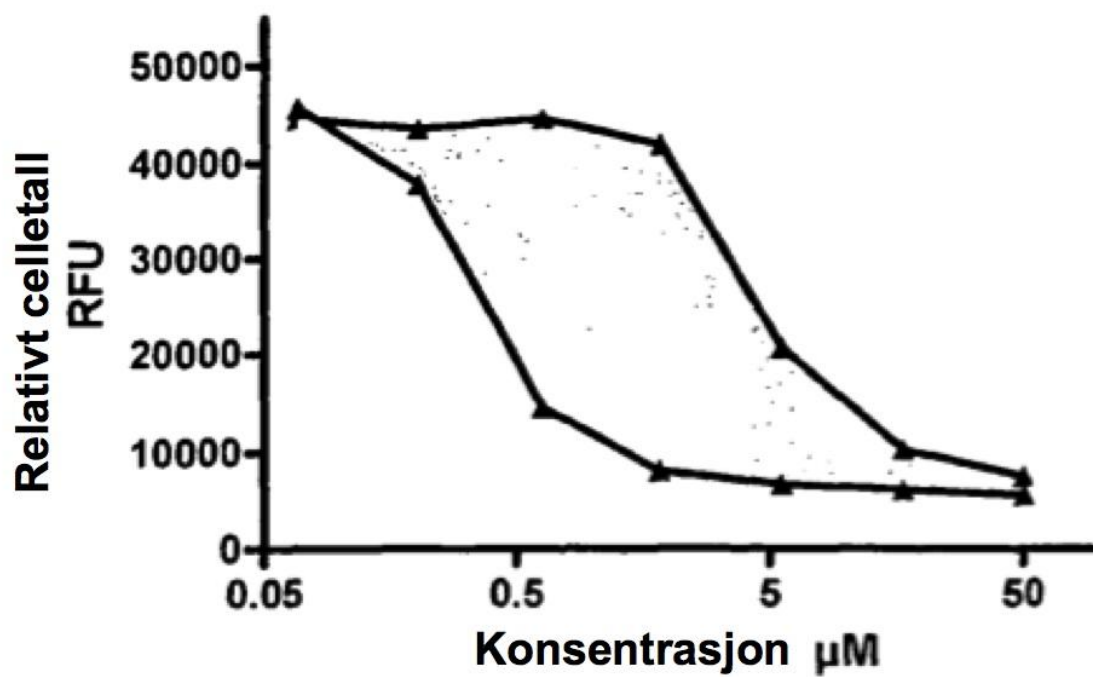
Figur 4**Figur 5:**

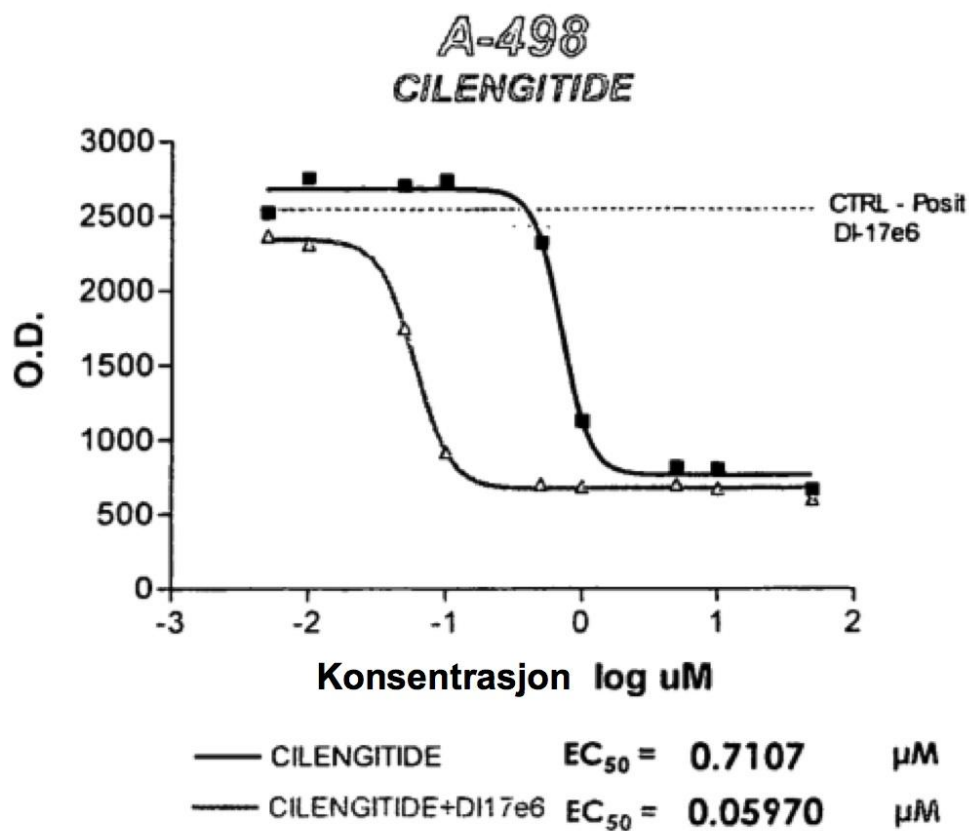
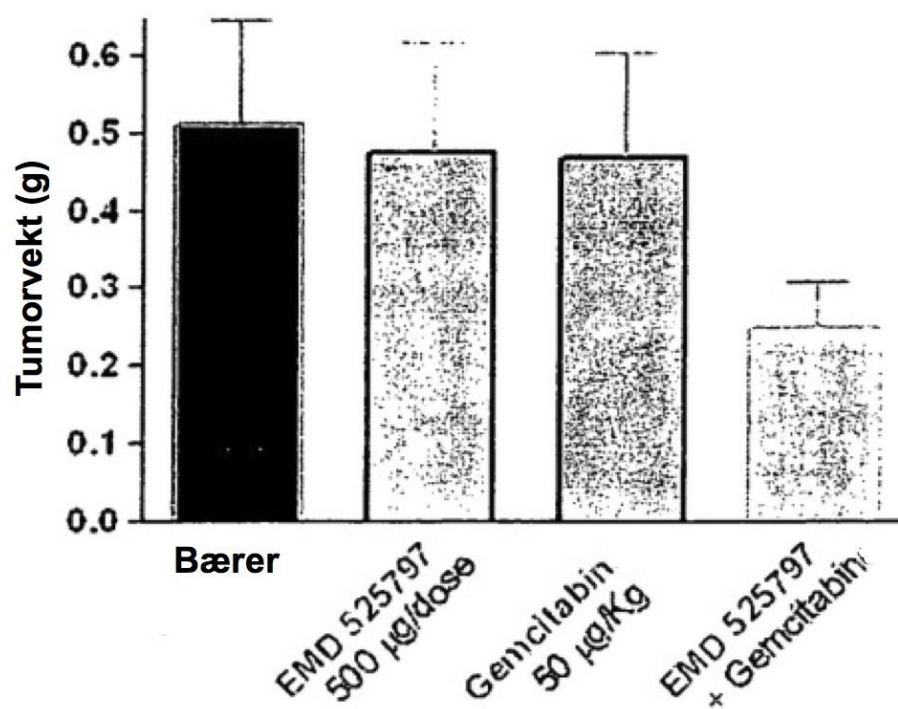
Figur 6:

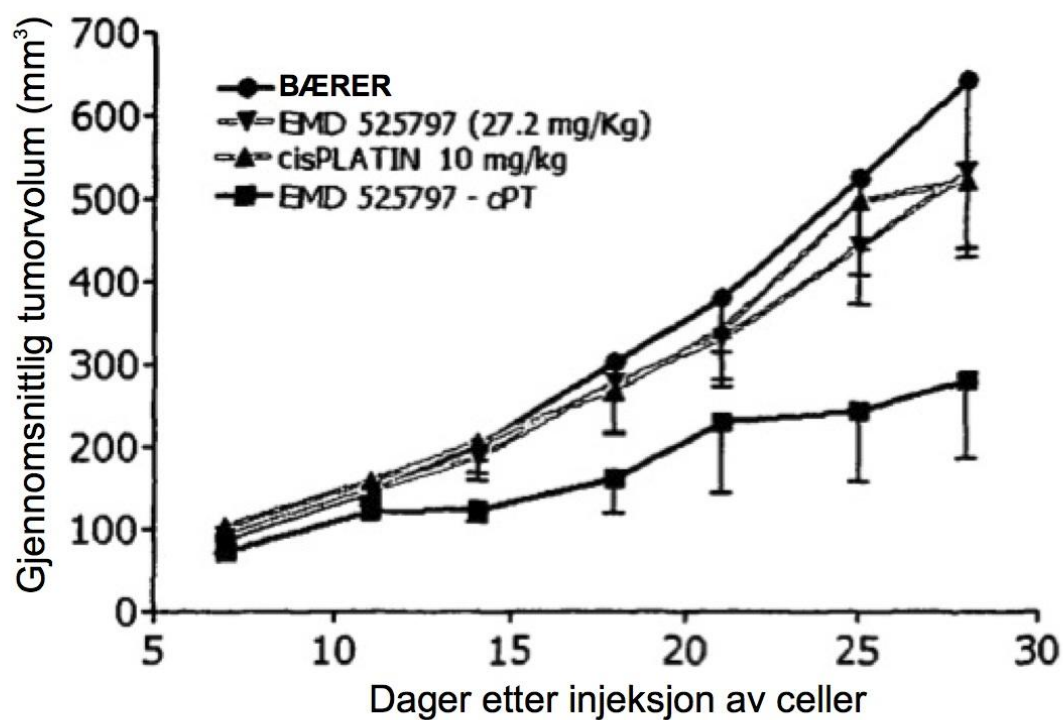
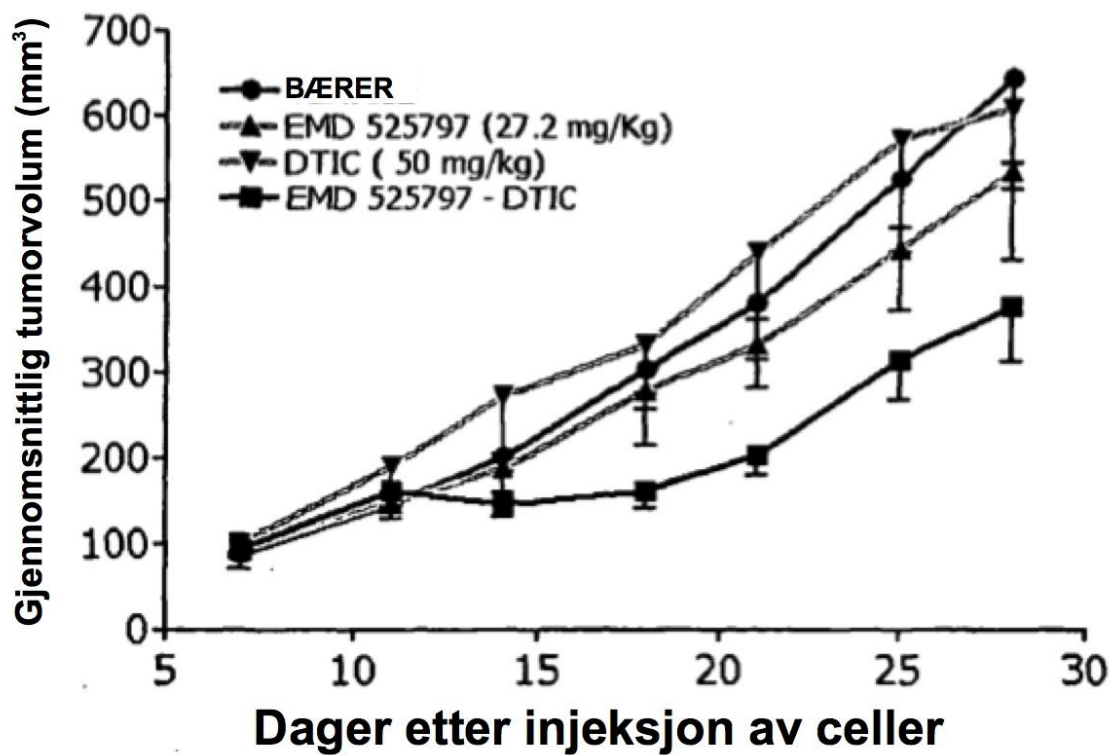
Figur 7:
M21-celler

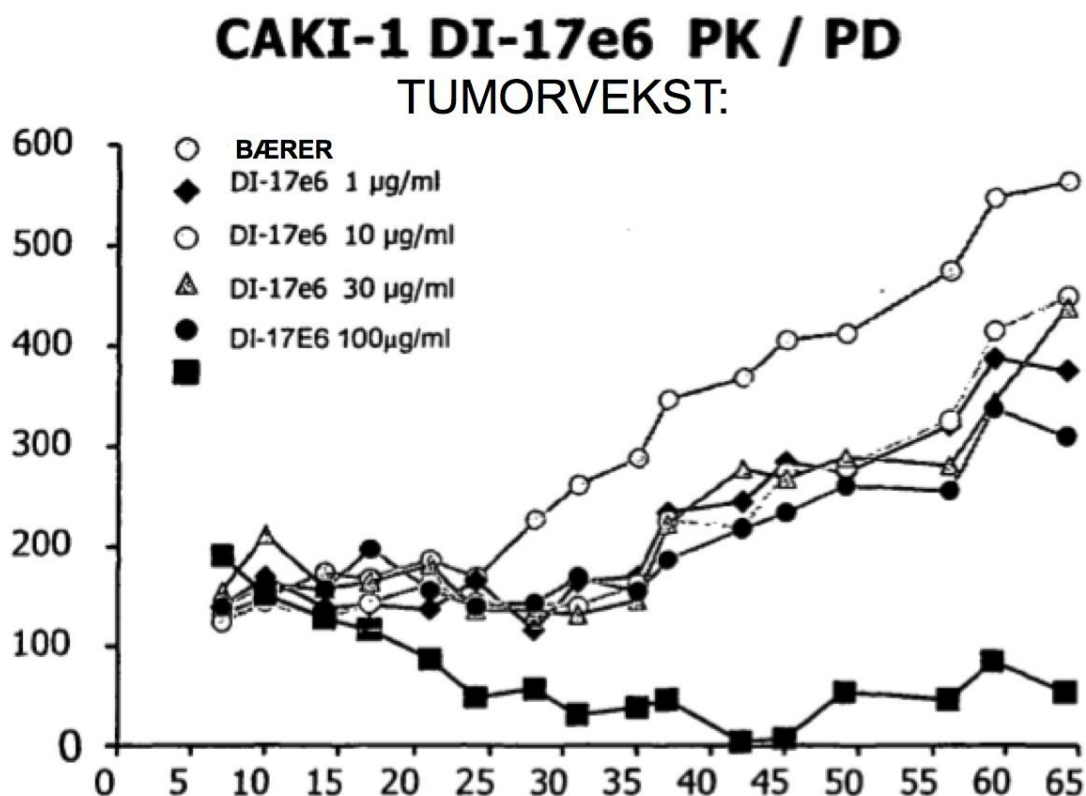
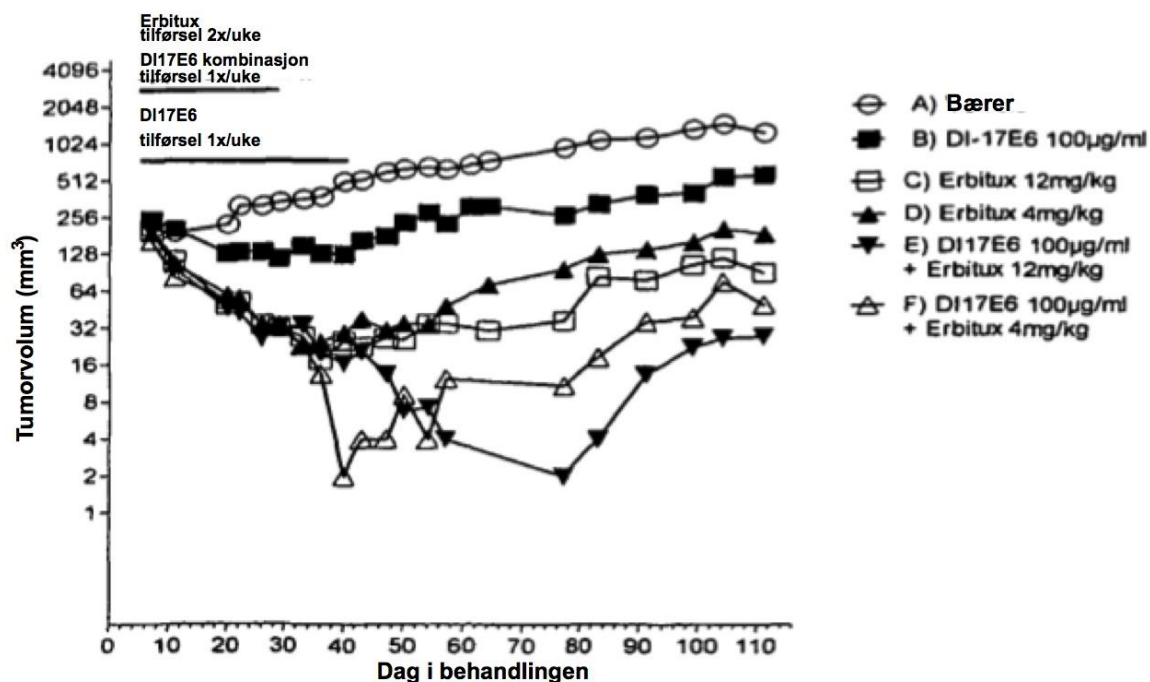


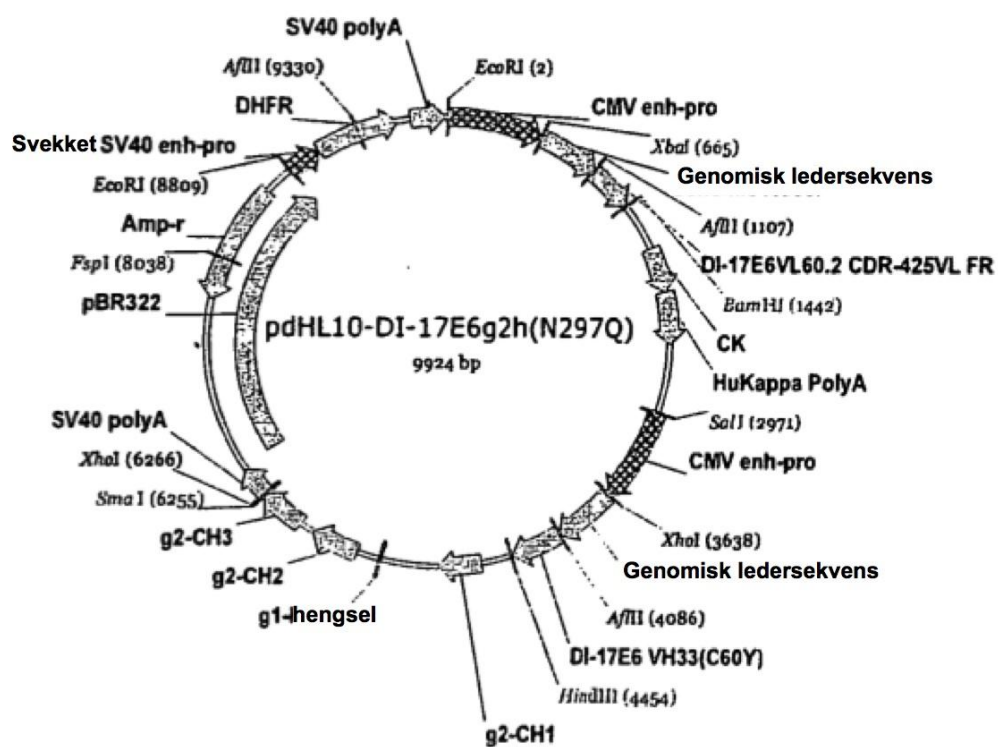
Figur 8:
CAKI-2-celler



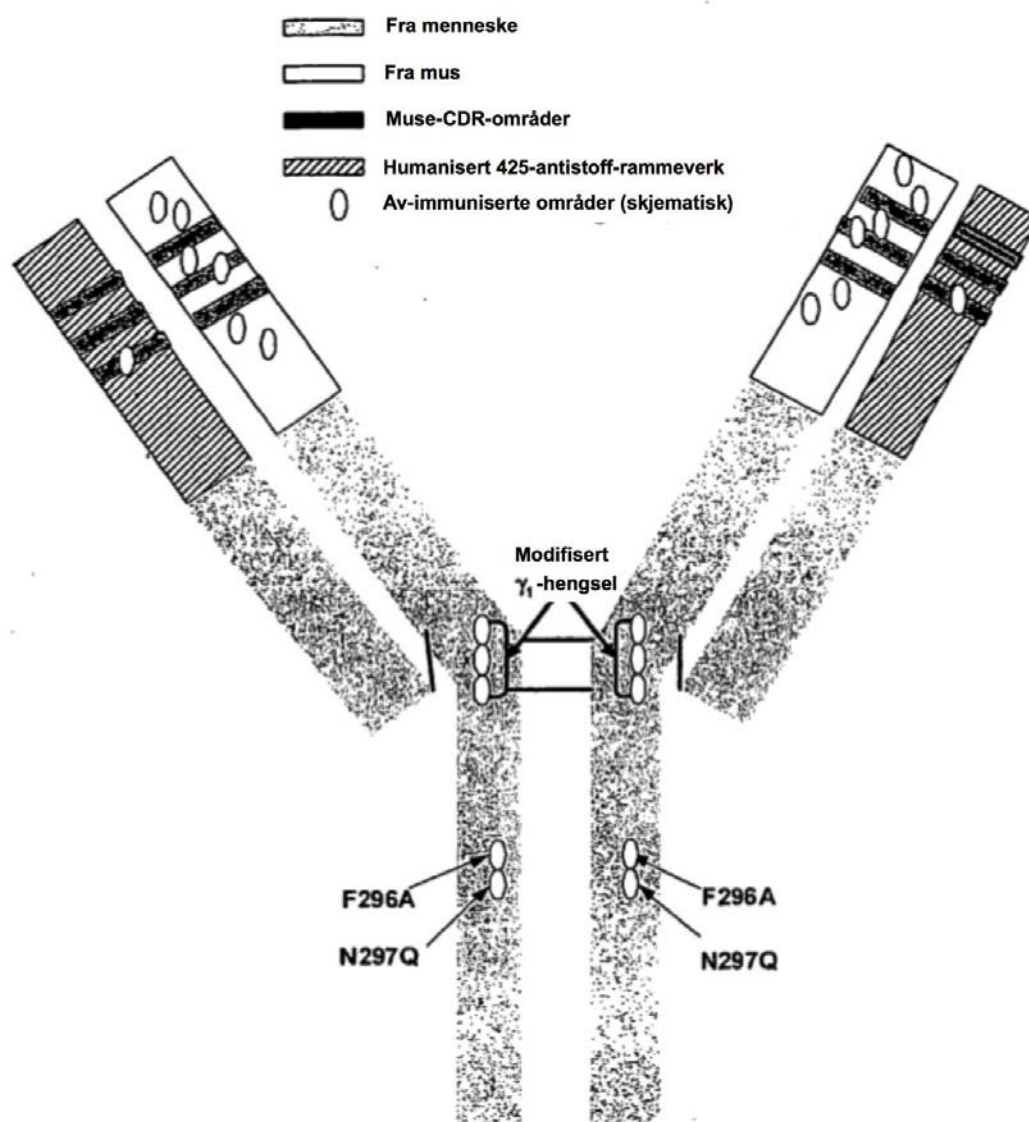
Figur 9:**Figur 10:**

Figur 11:**Figur 12:**

Figur 13:**Figur 14:****Figur 15**



Figur 16



Figur 17A

ATGGAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTGgtgaggagagaggggaagtg
 agggaggagaatggacagggagcaggagcactgaatcccattgctcattccatgtattctggcat
 gggtgagaagatgggtcttattcctccagcatggggcctctgggggtgaatacttgtagagggagg
 ttccagatgggaacatgtgctataatgaagattatgaaatggatgcctgggatgggtctaagtaat
 gcctagaagtgactagacacttgcaattcacttttttggtaagaagagatttttaggctataaa
 aaaatgttatgtaaaaataaacatcacagttgaaataaaaaaaataaaggatgttcatgaatt
 ttgtgtataactatgtatttctctctcattgtttcagCTTCCTTAAGCGACATCCAGATGACCCA
 GAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGTGACAGAGTGACCATCACCTGTAGGGCAAGTCAGG
 ACATTAGCAATTATTAGCCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGTAAGGCTCCAAAGCTGCTGATCTAC
 TACACATCAAAAATCCACTCAGGTGTGCCAAGCAGATTGAGCGGTAGCGGTAGCGGTACCGACTA
 CACCTTCACCATCAGCAGCCTCCAGCCAGAGGACATCGCCACCTACTACTGCCAACAGGGTAATA
 CGTTTCCGTACACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACgtaagtggatcccgcaattc
 taaactctgaggggggtcggtgacgtggccattctttgcctaaagcattgagtttactgcaaggt
 cagaaaagcatgcaaagccctcagaatggctgcaaagagctccaacaaaacaatttagaacttta
 ttaaggaatagggggaagctaggaagaaactcaaaacatcaagattttaaatcgcttcttggtc
 tccttgctataattatctgggataagcatgctgtttctgtctgtccctaacatgccctgtgatt
 atccgcaaacacacaccccaagggcgagaactttgttacttaaacaccatcctgtttgcttctttc
 ctgagGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG
 GAACTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAG
 GTGGATAACGCCCTCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG
 CACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG
 CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
 TAG

SEKV.ID. NR. 27

Figur 17B

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGTGACAGAGTGACCATCAC
 CTGTAGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAGCCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGTAAGGCTC
 CAAAGCTGCTGATCTACTACACATCAAAAATCCACTCAGGTGTGCCAAGCAGATTCAGCGGTAGC
 GGTAGCGGTACCGACTACACCTTCACCATCAGCAGCCTCCAGCCAGAGGACATCGCCACCTACTA
 CTGCCAACAGGGTAATACGTTTCCGTACACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

SEKV.ID. NR 29

5 **Figur 17C**

CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC
 TGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG
 ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC
 TACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTG
 CGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEKV.ID. NR. 31

Figur 18A

ATGGAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCTGgtgaggagagaggggaagtg
 agggaggagaatggacagggagcaggagcactgaatcccatgtctcattccatgtattctggcat
 ggggtgagaagatgggtcttatcctccagcatggggcctctggggtgaatacttgttagagggagg
 ttccagatgggaacatgtgctataatgaagattatgaaatggatgcctgggatgggtctaagtaat
 gcctagaagtgactagacacttgcaattcacttttttggtaagaagagatttttaggctataaa
 aaaatgttatgtaaaaataaacatcacagttgaaataaaaaaaatataaggatgttcatgaatt
 ttgtgtataactatgtatttctctctcattgtttcagCTTCCTTAAGCCAGGTCAGCTTCAGCA
 GTCTGGGGGCGAACTGGCCAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACA
 CCTTTAGTAGTTTCTGGATGCACTGGGTAAAGACAGGCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGA
 TACATTAATCCTAGATCTGGTTATACTGAGTATAATGAGATATTCAGGGACAAGGCCACAATGAC
 TACCGACACCTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGTAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCAG
 TCTATTACTGTGCAAGTTTTCTGGGACGAGGGGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCAACGTC
 ACCGTCTCCTCAGgtgagtaagctttctggggcgagccgggcctgactttggctttggggcaggg
 agtgggctaaggtgaggcaggtggcgccagccaggtgcacacccaatgcccgtgagcccagacac
 tggaccctgcctggaccctcgtggatagacaagaaccgaggggcctctgcgcctggggcccagctc
 tgtcccacaccgcggtcacatggcaccacctctcttgagCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTT
 CCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG
 ACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACC
 TTCCAGCTGTCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAG
 CAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA
 AGACAGTTGgtgagagggccagctcagggagggaggggtgtctgctggaagccaggctcagccctcc
 tgcctggagcaccgccggtgtgcagccccagcccagggcagcaaggcagggcccatctgtctcc
 tcacccggaggcctctgcccgcaccaactcatgtctcagggagaggggtcttctggctttttccacca
 ggctccaggcaggcacaggctgggtgcccctaccccaggcccttcacacacaggggcaggtgctt
 ggctcagacctgcaaaaagccatatccgggaggacctgcccctgacctaaagccgaccccaaagg
 ccaaactgtccactccctcagctcggacaccttctctctctccagatccgagtaactcccaatct
 tctctctgcagAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAggtaaagccag
 cccaggcctcgccctccagctcaaggcgggacaggtgccctagagttagcctgcatccagggagag
 gccccagctgggtgctgacacgtccacctccatctcttctcagCACCACCTGTGGCAGGACCGT
 CAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACG
 TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT
 GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGGCCAGAGCACGTTCCGTGTGGTCA
 GCGTCTTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC
 AAAGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGgtgggacccgcgggggtatg
 agggccacatggacagaggccggctcgggccacctctgacctgagagtgaccgctgtaccaacc
 tctgtccctacagGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCACGGGAGGAGAT
 GACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGG
 AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGAC
 GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
 CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCC
 CGGGTAAATGA

SEKV.ID. NT 33

Figur 18B

CAGGTCCAGCTTCAGCAGTCTGGGGGCGAACTGGCCAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTGTCCTG
 CAAGGCTTCTGGCTACACCTTTAGTAGTTTCTGGATGCACTGGGTAAGACAGGCCCCCTGGACAGG
 GTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGATCTGGTTATACTGAGTATAATGAGATATTCAGG
 GACAAGGCCACAATGACTACCGACACCTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGTAGCCTGAG
 ATCTGAGGACACCGCAGTCTATTACTGTGCAAGTTTCTGGGACGAGGGGCTATGGACTACTGGG
 GTCAAGGAACCAACCGTCACCGTCTCCTCA

SEKV.ID. NR. 35

Figur 18C

GCCTCCACCAAGGGCCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCAC
 AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAG
 GCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC
 AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCA
 CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTT**GAGCCCCAAATCTTCTGACAAA**ACTCACACAT
GCCCACCGTGCCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC**AAAACCC**AAG
 GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA
 CCCCAGAGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCAC
 GGGAGGAGCAGGCCCAGAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC GTTGTGCACCAGGACTGG
 CTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAAC
 CATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCACGGGAGG
 AGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCC
 GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTC
 CGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG
 TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTG
 TCCCCGGGTAAA

SEKV.ID. NR 37

5

Figur 18D

GAGCCCCAAATCTTCTGACAAA**ACTCACACATGCCCACCGTGCCCA** SEKV.ID. NR. 39

10

Figur 19A

CAGGTCCAGCTTCAGCAGTCTGGGGGCGAACTGGCCAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTGTCTTG
 CAAGGCTTCTGGCTACACCTTTAGTAGTTTCTGGATGCACTGGGTAAGACAGGCCCTGGACAGG
 GTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGATCTGGTTATACTGAGTATAATGAGATATTGAGG
 GACAAGGCCACAATGACTACCGACACCTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGTAGCCTGAG
 ATCTGAGGACACCGCAGTCTATTACTGTGCAAGTTTCTGGGACGAGGGGCTATGGACTACTGGG
 GTCAAGGAACCACCGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCG
 CCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC
 CGAACC GG TGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCAGCTG
 TCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGC
 ACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGA
GCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGT
 CAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACG
 TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT
 GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGGCCCAGAGCACGTTCCGTGTGGTCA
 GCGTCTCACC GTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC
 AAAGGCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA
 GGTGTACACCCTGCCCCCATCACGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGG
 TCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC
 TACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCT
 GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
 ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAA SEKV.ID. NR. 41

Figur 19B

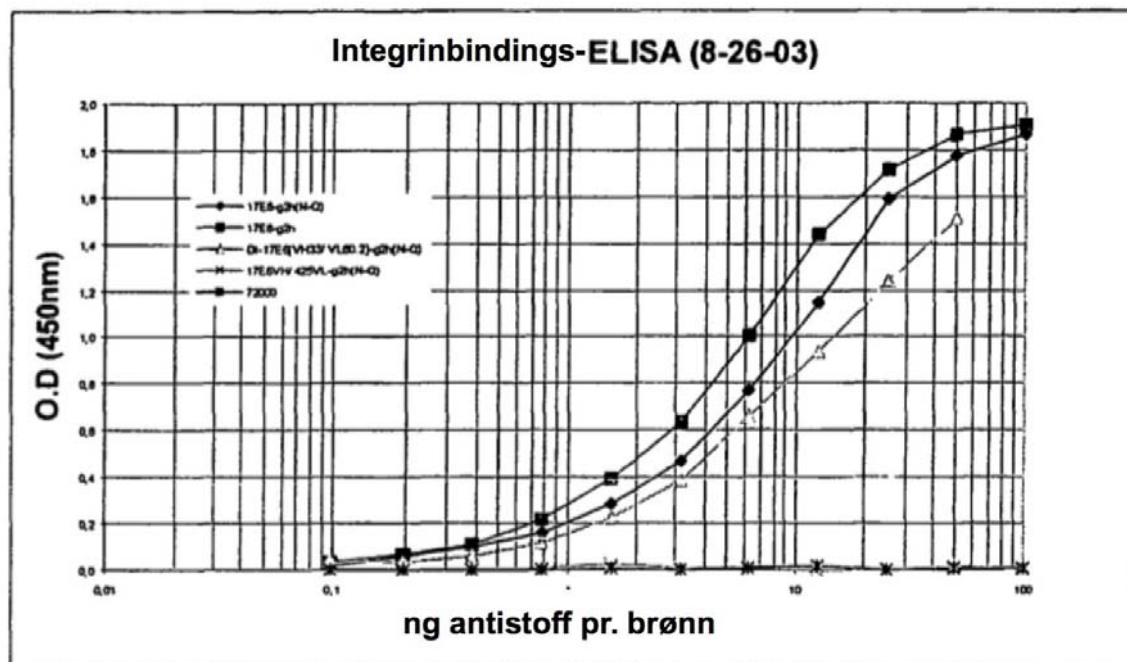
GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGTGACAGAGTGACCATCAC
 CTGTAGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAGCCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGTAAGGCTC
 CAAAGCTGCTGATCTACTACACATCAAAAATCCACTCAGGTGTGCCAAGCAGATTACGCGGTAGC
 GGTAGCGGTACCGACTACACCTTCACCATCAGCAGCCTCCAGCCAGAGGACATCGCCACCTACTA
 CTGCCAACAGGGTAATACGTTTCCGTACACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAA
 CTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGGC
 TCTGTTGTGTGCTGTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAA
 CGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA
 GCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA
 GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
 SEKV.ID. NR 43

Figur 20A

DIQMTQTSSLSASLGDRV I I SCRASQDISNYLSWYQQKPDGTVKLLI FYTSKLH
 SGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLDQEDIATYFCQQGNTFPYTFGGGTKVEMR
 SEKV.ID. NR. 25

Figur 20B

QVQLQQSGAELAEPGASVKMSCKASGYTFSSFWMHVVKQRPGQGLEWIGYINPRS
 GYTECNEIFRDKATMTADTSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYYCASFLGRGAMDYWGQ
 GTSVTVSS SEKV.ID. NR. 26

Figur 21A**Figur 21B**