



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2170956 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2015.03.16
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.10.22
(86)	Europeisk søknadsnr	08759230.9
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.06.13
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.04.07
(30)	Prioritet	2007.06.15, US, 944359 P
(84)	Utpekete 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	Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg, DE-Tyskland Medigene AG, Lochhamer Strasse 11, 82152 Planegg/Martinsried, DE-Tyskland
(72)	Oppfinner	KELM, Daniela, Hegelstrasse 24, 71711 Steinheim an der Murr, DE-Tyskland ALTEVOGT, Peter, Adolf-Kolping-Strasse 3, 69151 Neckargemünd, DE-Tyskland MOLDENHAUER, Gerhard, Jahnstrasse 11, 34454 Bad Arolsen, DE-Tyskland BREITLING, Frank, Bergheimerstrasse 123, 69115 Heidelberg, DE-Tyskland KRÜGER, Achim, Stefan-George-Ring 57, 81929 München, DE-Tyskland BÄRREITER, Silke, Im Bärle 33, 69469 Weinheim, DE-Tyskland LÜTTGAU, Sandra, Blumenstrasse 38, 86596 Schongau, DE-Tyskland MÖBIUS, Ulrich, Am Rain 7, 82131 Gauting, DE-Tyskland LI, Yi, 16 The CroftWest HanneyWantage, Oxfordshire OX12 10D, GB-Storbritannia SEBENS, Susanne, Gneisenastr. 25, 24105 Kiel, DE-Tyskland SCHÄFER, Heiner, Gerhardstr. 10, 24105 Kiel, DE-Tyskland
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	BEHANDLING AV TUMORER VED BRUK AV SPESIFIKT ANTI-L1-ANTISTOFF
(56)	Anførte publikasjoner	EP-A- 1 172 654 WO-A-2004/083373 WO-A-2007/114550 WO-A-2008/023946 ARLT MATTHIAS J E ET AL: "Efficient inhibition of intra-peritoneal tumor growth and dissemination of human ovarian carcinoma cells in nude mice by anti-L1-cell adhesion molecule monoclonal antibody treatment" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, USA, DE, vol. 66, no. 2, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 936-943, XP002436282 GAST D ET AL: "The cytoplasmic part of L1-CAM controls growth and gene expression in human tumors that is reversed by therapeutic antibodies." ONCOGENE 21 FEB 2008, vol. 27, no. 9, 21 February 2008 (2008-02-21), pages 1281-1289, XP002501631 ISSN: 1476-5594 RUDIHOFF S ET AL: "Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 79, 1 March 1982 (1982-03-01), pages 1979-1983, XP007901436, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.79.6.1979 A. Casadevall ET AL: "Immunoglobulin isotype influences affinity and specificity", Proceedings of

BEHANDLING AV TUMORER VED BRUK AV SPESIFIKT ANTI-L1-ANTISTOFF

Standardbehandlingen for fremskreden kreft er ofte kjemoterapi eller stråleterapi. På tross av den første responsen på terapi er det imidlertid ofte observert at ulike karsinomer oppnår resistens mot kjemoterapeutiske legemidler eller stråleterapi, hvilket fører til tumortilbakekomst og ofte død for pasientene. Ofte blir det da bestemt å bytte til et annet kjemoterapeutisk legemiddel eller til høyere doser. Men ofte observeres ingen forbedring av den kliniske situasjonen.

L1 er en type I-membranglykoprotein på 200 til 230 kDa som strukturelt tilhører Ig-superfamilien (Moos M, Tacke R, Scherer H, Teplow D, Fruh K, Schachner M. Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature* 1988; 334:701-3). L1 spiller en avgjørende rolle i aksonstyring og cellemigrering ved utvikling av nervesystem (Hortsch M. Structural and functional evolution of the L1 family: are four adhesion molecules better than one? *Mol Cell Neurosci* 2000; 15:1-10., Schachner M. Neural recognition molecules and synaptic plasticity. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9:627-34). Nyere studier har også implisert L1-uttrykking i progresjonen av humane karsinomer. L1-uttrykking ble funnet på ulike tumorer inkludert lungekreft (Katayama M, Iwamatsu A, Masutani H, Furuke K, Takeda K, Wada H, et al. Expression of neural cell adhesion molecule L1 in human lung cancer cell lines. *Cell Struct Funct* 1997;22:511-6), gliomer (Senner V, Kismann E, Puttmann S, Hoess N, Baur I, Paulus W. L1 expressed by glioma cells promotes adhesion but not migration. *Glia* 2002;38:146-54), melanomer (Thies A, Schachner M, Moll I, Berger J, Schulze HJ, Brunner G, et al. Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. *Eur J Cancer* 2002;38:1708-1, Fogel M, Mechtersheimer S, Huszar M, Smirnov A, Abu DA, Tilgen W, et al. L1 adhesion molecule (CD 171) in development and progression of human malignant melanoma. *Cancer Lett* 2003;189:237-47), renal karsinom (Meli ML, Carrel F, Waibel R, Amstutz H, Crompton N, Jaussi R, Moch H, Schubiger PA, Novak-Hofer I. Anti-neuroblastoma antibody chCE7 binds to an isoform of L1-CAM present in renal carcinoma cells. *Int J Cancer*, 1999; 83: 401-408, Allory Y, Matsuoka Y, Bazille C, Christensen EI, Ronco P, Debiec H. The L1 cell adhesion molecule is induced in renal cancer cells and correlates with metastasis in clear cell carcinomas. *Clin Cancer Res*

2005;11:1190-7) og tykktarmskarsinom (Gavert N, Conacci-Sorrell M, Gast D, Schneider A, Altevogt P, Brabletz T, et al. L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. J Cell Biol 2005; 168:633-42). Videre er det kjent i teknikken at L1
 5 overuttrykkes i eggstokk- og endometriekarsinomer på en stadiavhengig måte (Fogel M, Gutwein P, Mechtersheimer S, Riedle S, Stoeck A, Smirnov A, et al. L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. Lancet 2003; 362:869-75).

10 I teknikken er det foreslått å bruke anti-L1-antistoffer for behandlingen av eggstokk- og endometrietumorer (jf. WO 02/04952, WO 06/013051 og Arlt MJ, Novak-Hofer I, Gast D, Gschwend V, Moldenhauer G, Grunberg J, et al. Efficient inhibition of intra-peritoneal tumor growth and dissemination of human ovarian carcinoma cells in nude mice by anti-L1-cell adhesion molecule monoclonal
 15 antibody treatment. Cancer Res 2006;66:936-43). I teknikken er ulike anti-L1-antistoffer kjent (f.eks. mAb 14.10: Huszar M, Moldenhauer G, Gschwend V, Ben-Arie A, Altevogt P, Fogel M: Expression profile analysis in multiple human tumors identifies L1 (CD171) as a molecular marker for differential diagnosis and targeted therapy. Hum Pathol 37:1000-1008, 2006, mAb chCE7: Meli ML, Carrel
 20 F, Waibel R, Amstutz H, Crompton N, Jaussi R, Moch H, Schubiger PA, Novak-Hofer I: Anti-neuroblastoma antibody chCE7 binds to an isoform of L1-CAM present in renal carcinoma cells. Int J Cancer 83:401-408, 1999, mAb UJ 127.11: Patel K, Kiely F, Phimister E, Melino G, Rathjen F, Kemshead JT: The 200/220 kDa antigen recognized by monoclonal antibody (MAb) UJ127.11 on
 25 neural tissues and tumors is the human L1 adhesion molecule. Hybridoma 10:481-491, 1991, mAb 5G3: Wolff JM, Frank R, Mujoo K, Spiro RC, Reisfeld RA, Rathjen FG: A human brain glycoprotein related to the mouse cell adhesion molecule L1. J Biol Chem 263:11943-11947, 1988). Videre, i Sebens Muerkoster et al., Oncogene. 2007 Apr 26;26(19):2759-68, Epub 2006 Nov 6, er det
 30 foreslått å bruke anti-L1-antistoffer for å sensibilisere tumorceller for behandling med et kjemoterapeutisk legemiddel eller med stråleterapi.

Det er alltid et behov for forbedrede anti-tumormidler.

35 Den foreliggende oppfinnelsen vedrører i ett aspekt et anti-L1 monoklonalt antistoff

i) som kan binde til den samme L1-epitopen som gjenkjennes av det monoklonale antistoffet 9.3, fremstilt ved hybridomcellen deponert under DSMZ ACC2841 og som binder L1 med en affinitet (KD) på minst 10^{-10} , eller

ii) karakterisert ved at dets komplementaritetsbestemmende regioner (CDR-er) har de følgende sekvensene: LCDR1: RASQDISNYLN, LCDR2: YTSRLHS, LCDR3: QQGNTLPWT, HCDR1: RYWML, HCDR2: EINPRNDRTNYNEKFKT, og HCDR3: GGGYAMDY, og som binder L1 med en affinitet (KD) på minst 10^{-10} , eller

iii) et monoklonalt antistoff, fremstilt ved hybridomcellen deponert under DSMZ ACC2841.

Innenfor rammen av den foreliggende oppfinnelsen er det overraskende funnet at det monoklonale antistoffet 9.3, fremstilt ved hybridomcellen deponert under DSMZ ACC2841, har forbedrede anti-tumorevner (se eksempler). Særlig har det monoklonale antistoffet 9.3 den beste evnen til å hemme tumorvekst og invasjon av tumorceller av alle testede antistoffer. Videre synes det monoklonale antistoffet 9.3 å oppheve kjemoresistens i større grad enn antistoffet 11A testet i WO 2008/046529 (se eksempel 13).

Monoklonale antistoffer og produksjonen av monoklonale antistoffer tilhører teknikkens stand og er også beskrevet i referansene sitert i Materialer og fremgangsmåter-delen i eksemplene. Generelt kan monoklonale antistoffer for eksempel fremstilles ifølge den kjente fremgangsmåten til Winter og Milstein (Winter, G. & Milstein, C. (1991) Nature, 349, 293-299). Som et alternativ til å fremstille monoklonale antistoffutskillende hybridomer, kan et monoklonalt antistoff rettet mot et polypeptid ifølge oppfinnelsen identifiseres og isoleres ved screening av et rekombinant kombinatorisk immunglobulinbibliotek (f.eks. et antistoffagdisplaybibliotek) med polypeptidet av interesse. Kits for å generere og screene fagdisplaybiblioteker er kommersielt tilgjengelige (f.eks. Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, katalog nr. 27-9400-01; og Stratagene SurfZAP Phage Display Kit, katalog nr. 240612). I tillegg kan det finnes eksempler på fremgangsmåter og reagenser som er spesielt tilgjengelig for bruk i generering og screening av antistoffdisplaybibliotek, i for eksempel, US-patent nr. 5,223,409; WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; WO 90/02809; Fuchs et al., 1991, Bio/Technology 9:1370-1372; Hay et al., 1992, Hum. Antibod. Hybridomas

3:81-85; Huse et al., 1989, Science 246:1275-1281; Griffiths et al., 1993, EMBO J. 12:725-734.

Siden effekten av et antistoff medieres av dets evne til å binde til en spesifikk epitop, vedrører oppfinnelsen alle monoklonale antistoffer som gjenkjenner den samme epitopen som antistoffet 9.3, og som binder L1 med en affinitet (KD) på minst 10^{-10} . Fremgangsmåter for å bestemme epitopen til et gitt antistoff er kjent i teknikken og inkluderer fremstillingen av syntetiske lineære peptider fra en gitt region av interesse og den etterfølgende testingen av om antistoffet binder til peptidene (se Epitope Mapping, A practical approach, Oxford University Press 2001, Editors: Olwyn Westwood and Frank Hay). Alternativt kan andre rekombinante proteiner som dekker regionen av interesse, fremstilles og testes for bindingen av antistoffet (Oleszewski, M., Gutwein, P., von der Lieth, W., Rauch, U., Altevogt, P., Characterization of the L1-neurocan binding site. Implications for L1-L1 homophilic binding. J.Biol.Chem. 275: 34478-34485 (2000).

Videre, når en spesifikk epitop av et monoklonalt antistoff er kjent, er det innenfor fagmannens ferdighet å identifisere eller fremstille andre antistoffer, særlig monoklonale antistoffer, eller bindingsmolekyler som definert nedenfor, som binder til den samme epitopen. For eksempel er det mulig å bruke peptidene eller proteinene som er beskrevet ovenfor i forbindelse med epitopmappingen, også til identifikasjon eller produksjon av antistoffene eller bindingsmolekylene.

Som det kan ses fra eksemplene, er epitopen av antistoffet 9.3 med det første immunglobulinlignende domenet til L1. Derfor er epitopen av det monoklonale antistoffet ifølge oppfinnelsen også fortrinnsvis innenfor det første immunglobulinlignende domenet til L1.

I tillegg er det beskrevet et anti-L1 monoklonalt antistoff, med den samme evnen til å hemme tumorvekst som det monoklonale antistoffet 9.3, fremstilt av hybridomcellen deponert under DSMZ ACC2841. Denne evnen kan testes ved å bruke den samme tumorvekstassayen som beskrevet i eksempel 1, del 1.3.9. Ifølge oppfinnelsen betyr "den samme evnen" at det monoklonale antistoffet har en tumorveksthemmende evne som ikke avviker mer enn 5 % fra den tumorveksthemmende evnen til det monoklonale antistoffet 9.3.

Fortrinnsvis hemmer dette antistoffet ifølge oppfinnelsen også L1-dimerisering, slik det er vist for antistoffet 5G3 (se ovenfor).

5 I ett aspekt vedrører oppfinnelsen et anti-L1 monoklonalt antistoff, karakterisert ved at dets komplementaritetsbestemmende regioner (CDR-er) har de følgende sekvensene LCDR1: RASQDISNYLN, LCDR2: YTSRLHS, LCDR3: QQGNTLPWT, HCDR1: RYWML, HCDR2: EINPRNDRTNYNEKFKT, HCDR3: GGGYAMDY, og som binder L1 med en affinitet (kD) på minst 10^{-10} .

10

De ovennevnte sekvensene viser CDR-ene til det monoklonale antistoffet 9.3 bestemt ifølge Kabat-metoden (se eksempel 2). Et slikt monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen kan f.eks. fremstilles ved CDR-poding eller ved rekombinant produksjon av antistoffet. Slike fremgangsmåter er kjent i teknikken (se f.eks. 15 Queen, US-patent nr. 5,585,089 og Winter, U.S: 5,225,539, Cabilly U.S. 4,816,567).

Beskrevet er et anti-L1 monoklonalt antistoff, karakterisert ved at minst en av dets komplementaritetsbestemmende regioner (CDR-er)

20

a) har en av de følgende sekvensene QDISNY, YTS, QQGNTLPWT, GYTFTRYW, INPRNDRT eller ALGGGYAMDY eller

b) har en sekvens som, sammenlignet med sekvensene nevnt under a), har minst en konservativ aminosyreutveksling.

25

Disse sekvensene viser igjen CDR-ene til det monoklonale antistoffet 9.3 (se figur 12), men CDR-ene er bestemt ved hjelp av en annen metode kjent i teknikken, nemlig ifølge IMGT®-metoden fra The international ImMunoGeneTics information system®.

30

I et spesielt foretrukket aspekt vedrører oppfinnelsen et monoklonalt antistoff, fremstilt ved hybridomcellen deponert under DSMZ ACC2841. Denne hybridomcellen er deponert med Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen den 25. april 2007 i henhold til Budapest-traktaten.

I et annet aspekt vedrører oppfinnelsen et humanisert antistoff omfattende de ikke-humane CDR-ene til et monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen og en strukturregion (FR) fra et humant immunglobulinmolekyl.

5 Humaniserte antistoffer er antistoffmolekyler fra ikke-humane arter som har én eller flere komplementaritetsbestemmende regioner (CDR-er) fra de ikke-humane artene og en strukturregion (FR) fra et humant immunglobulinmolekyl. (Se f.eks. Queen, US-patentnr. 5,585,089 og Winter, US U.S: 5,225,539.) Slike kimære og humaniserte monoklonale antistoffer kan fremstilles ved
10 rekombinante DNA-teknikker kjent i teknikken.

Generelt, for å oppnå et humanisert antistoff, kan nukleinsyresekvenser som koder for humane variable tungkjeder og variable lettkjeder endres ved å erstatte CDR-sekvensene i den humane (akseptor-) sekvensen med sekvens
15 som koder for den respektive CDR-en i muse-antistoffsekvensen (donorsekvensen). Den humane akseptorsekvensen kan omfatte FR avledet fra ulike gener.

Sekvenser som koder for antistoffer av full lengde, kan deretter oppnås ved å
20 binde de tilveiebrakte variable tung- og variable lettkjedesekvensene til humane konstante tungkjede- og konstante lettkjederegioner. Foretrukne humane konstante lettkjedesekvenser inkluderer kappa og lambda konstante lettkjedesekvenser. Foretrukne humane konstante tungkjedesekvenser inkluderer IgG1, IgG2 og sekvenser som koder for IgG1-mutanter som har
25 tilveiebrakt immunstimulerende egenskaper. Slike mutanter kan ha en redusert evne til å aktivere komplement- og/eller antistoffavhengig cellulær cytotoxicitet og er beskrevet i US 5,624,821; WO 99/58572, US 6,737,056. En spesielt foretrukket konstant tungkjede er en IgG1 som omfatter substitusjonene E233P, L234V, L235A, A327G, A330S, P331 S og en delesjon av rest 236.

30 I en annen utførelsesform omfatter antistoffet av full lengde, en IgA-, IgD-, IgE-, IgM-, IgY- eller IgW-sekvens.

Egnede humane donorsekvenser kan bestemmes ved sekvenssammenligning av
35 peptidsekvenser kodet av musedonorsekvensene til en gruppe av humane sekvenser, fortrinnsvis til sekvenser kodet av humane kimbaneimmunglobulingener eller modne antistoffgener. En human sekvens med

en høy sekvenshomologi, fortrinnsvis med den høyeste homologien bestemt, kan tjene som akseptorsekvensen for humaniseringsprosessen.

5 I tillegg til utvekslingen av humane CDR-er med muse-CDR-er kan ytterligere manipuleringer i den humane donorsekvensen utføres for å oppnå en sekvens som koder for et humanisert antistoff med optimaliserte egenskaper (slik som affinitet for antigenet).

10 I et foretrukket eksempel endres tungkjederestene 31-35, 50-58 og 95-102 og restene 6, 23, 24, og 49 i den humane akseptorsekvensen for å korrespondere med de respektive restene av musesekvensen (Adair, U.S. 5,859,205).

15 Videre kan de endrede variable domenesekvensene for humant akseptorantistoff også være tilveiebrakt for å kode for én eller flere aminosyrer (i henhold til Kabat-nummereringssystemet) for posisjon 4, 35, 38, 43, 44, 46, 58, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 73, 85, 98 for den lette variable regionen og 2, 4, 36, 39, 43, 45, 69, 70, 74, 75, 76, 78, 92 for den tunge variable regionen som samsvarer med musedonorsekvensen (Carter og Presta, U.S. 6,407,213)

20 Humaniseringen av et muse-L1-antistoff er beskrevet i eksempel 2.

Det er beskrevet at sekvensene til CDR-ene kan endres, fortrinnsvis ved utvekslinger som fører til en konservativ aminosyreutveksling.

25 Generelt kan manipuleringer føre til endringer i både FR- og CDR-regionene og inkludere utvekslinger, delesjoner og innsetting av rester. Endringene kan induseres av tilfeldig eller rettet mutagenese. Et antistoffagdisplaysystem, som beskrevet tidligere, kan benyttes til seleksjon av mutanter med ønskede og/eller forbedrede egenskaper.

30 Beskrevet er et humant antistoff som kan gjenkjenne den samme epitopen som antistoffet 9.3. Fremgangsmåter for generering av humane antistoffer er kjent i teknikken. Disse fremgangsmåtene anvender for eksempel mus der de endogene immunglobulingenene er delvis eller fullstendig inaktivert og humane immunglobulinloci ble introdusert. Ved immunisering med en immunogen epitop
35 kan disse musene produsere humane antistoffer (U.S. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,589,369; 5,591,669; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016)

I en ytterligere foretrukket utførelsesform omfatter det humaniserte antistoffet ifølge oppfinnelsen sekvensen L1_9.3hu eller L1_9.3hu3 som vist i figur 8a) og b).

5

Beskrevet er et bindingsmolekyl omfattende

a) minst en av de følgende sekvensene RASQDISNYLN, YTSRLHS, QQGNTLPWT, RYWML, EINPRNDRTNYNEKFKT eller GGGYAMDY eller

b) minst en sekvens som, sammenlignet med sekvensene gitt i a), har minst en konservativ aminosyreutveksling.

10

Som forklart ovenfor viser disse sekvensene CDR-ene til antistoffet 9.3 (se eksempel 2).

15

Beskrevet er et bindingsmolekyl omfattende

a) minst en av de følgende sekvensene QDISNY, YTS, QQGNTLPWT, GYTFTRYW, INPRNDRT eller ALGGGYAMDY eller

b) minst en sekvens som, sammenlignet med sekvensene gitt i a), har minst en konservativ aminosyreutveksling.

20

Som forklart ovenfor viser disse sekvensene igjen CDR-ene til det monoklonale antistoffet 9.3, bestemt ved en annen fremgangsmåte kjent i teknikken.

Slikt bindingsmolekyl er et molekyl som kan binde L1. Fortrinnsvis er bindingsmolekylet et immunglobulinomfattende molekyl, dvs. omfatter minst ett Ig-domene.

25

Det er beskrevet at bindingsmolekylet ifølge oppfinnelsen er valgt fra gruppen bestående av enkeltkjedeantistoffer (f.eks. scFv, multimerer av scFv-lignende diastoffer, triastoffer eller tetrastoffer, antistoffragmenter (f.eks. Fab), tandaber, fleksistoffer, bispesifikke antistoffer og kimære antistoffer.

30

Strukturen til et antistoff og særlig funksjonen til dets CDR-er er kjent i teknikken (Carter PJ. Potent antibody therapeutics by design. Nature Rev. Immunol. 6:343-357,2006).

35

scFv og multimerer derav, tandaber, diastoffer og fleksistoffer er standard antistofformater kjent i teknikken, f.eks. fra WO 88/1649, WO 93/11161, WO 99/57150 og EP1293514B1.

5

I enkeltkjedet Fv (scFv) er de to antigenbindende variable regionene til lett- og tungkjeden (VH Fv og VL Fv) til et antistoff kunstig forbundet ved hjelp av et linkerpeptid, utpekt som et enkeltkjedet variabelt fragment eller enkeltkjedeantistoff (Bird, et al. (1988) Science 242:423-426; Orlandi, et al (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:3833-3837; Clarkson et al., Nature 352: 624-628 (1991)). Antigenbindingsstedet er dannet av de variable domenene til lett- og tungkjeder for et monoklonalt antistoff. Flere undersøkelser har vist at Fv-fragmentet faktisk har den fulle intrinsiske antigenbindingsaffiniteten til ett bindingssted på hele antistoffet.

10

15

Innenfor rammen av denne oppfinnelsens er diastoffer scFv med to bindingsspesifisiteter og kan enten være monospesifikke og bivalente eller bispesifikke og bivalente.

20

Tandaber og fleksistoffer er ytterligere antistofformater som f.eks. er definert i henholdsvis US2007031436 og EP1293514.

25

Antistofffragmenter som inneholder idiotypene av proteinet, kan genereres ved hjelp av teknikker kjent i teknikken. For eksempel kan slike fragmenter inkludere, men er ikke begrenset til, F(ab')₂-fragmentet som kan fremstilles ved pepsinfordøyning av antistoffmolekylet; Fab'-fragmentet som kan genereres ved å redusere disulfidbroene til F(ab')₂-fragmentet; Fab-fragmentet som kan genereres ved å behandle antistoffmolekylet med papain og et reduksjonsmiddel; og Fv-fragmenter.

30

Et kimært antistoff er et molekyl der forskjellige partier er avledet fra forskjellige dyrearter, slik som de som har en variabel region avledet fra en murin mAb og en human immunglobulinkonstant region. (Se f.eks. Cabilly et al., US-patent nr. 4,816,567; and Boss et al., US-patent nr. 4,816,397).

35

Bifunksjonelle, eller bispesifikke, antistoffer har antigenbindingssteder med ulike spesifisiteter. Ulike former for bispesifikke antistoffer er fremstilt. Disse

- inkluderer BSIgG, som er IgG-molekyler som omfatter to distinkte tungkjeder og to distinkte lettkjeder som er utskilt av såkalte "hybridhybridomer", og heteroantistoffkonjugater fremstilt ved den kjemiske konjugeringen av antistoffer eller antistofffragmenter med ulike spesifisiteter (Segal DM, Weiner GJ, Weiner LM. Bispecific antibodies in cancer therapy. Current Opin. Immunol. 11:558-562, 1999, Van Spriël AB, Van Ojik HH, Van de Winkel JGJ. Immunotherapeutic perspective for bispecific antibodies. Immunology Today 21:391-397, 2000).
- 10 Bispesifikke antistoffer er generert for å levere celler, cytotoksiner eller legemidler til spesifikke steder. En viktig anvendelse har vært å levere cytotoksiske vertsceller, slik som naturlige dreper- eller cytotoksiske T-celler, til spesifikke cellemål. (P. J. Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79: 315 (1990)). En annen viktig anvendelse har vært å levere cytotoksiske proteiner til spesifikke cellemål. (V. Raso, T. Griffin, Cancer Res. 41:2073 (1981); S. Honda, Y. Ichimori, S. Iwasa, Cytotechnology 4:59 (1990)). En annen viktig anvendelse har vært å levere anti-cancer ikke-protein legemidler til spesifikke cellemål (J. Corvalan, W. Smith, V. Gore, Intl. J. Cancer Suppl. 2:22 (1988); M. Pimm et al., British J. of Cancer 61:508 (1990)). Slike bispesifikke antistoffer er fremstilt ved kjemisk kryssbinding (M. Brennan et al., Science 229:81 (1985)), disulfidutveksling, eller produksjon av hybrid-hybridomer (kvadromer). Kvadromer konstrueres ved å fusjonere hybridomer som utskiller to ulike typer antistoffer mot to ulike antigener (Kurokawa, T. et al., Biotechnology 7:1163 (1989)).
- 25 I en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen bindes antistoffet ifølge oppfinnelsen til et aktivt stoff, fortrinnsvis et toksin, en nanopartikkel, et cytokin, eller en radionuklid. Slike antistoffkonjugater er kjent i teknikken (Wu AM, Senter PD. Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. Nature Biotechnol. 23:1137-1146, 2005, Pastan I, Hassan R, FitzGerald DJ, Kreitman RJ. Immunotoxin treatment of cancer. Annu. Rev. Med. 58:221-237, 2007, WO 90/12592, WO 2007/030642, WO 2004/067038, WO 2004/003183, US 2005/0074426, WO 94/04189).
- 30 Antistoffet ifølge oppfinnelsen binder L1 med en affinitet (KD) på minst 10^{-10} eller 10^{-11} .

Fortrinnsvis binder antistoffet ifølge oppfinnelsen ikke signifikant til andre medlemmer av L1-proteinfamilien som for eksempel CHL1 (nær homolog med L1, aksesjonsnummer NM_006614), NrCAM (Nevronalt celleadhesjonsprotein, aksesjonsnummer NM_001037132 eller NM_005010) og/eller NFASC (Neurofascin, aksesjonsnummer NM_015090). Fortrinnsvis binder antistoffet de andre medlemmene av L1-familien med en minst 100 ganger lavere affinitet, mer foretrukket minst 1000 ganger lavere affinitet sammenlignet med affiniteten for L1. Antistoffets affinitet for de ulike proteinene bestemmes for eksempel ved å måle bindingsaffiniteten til rekombinante proteiner som beskrevet i eksempel 6. Antistoffets binding til de ulike L1-familiemedlemmene i L1-familien kan også bestemmes ved å uttrykke proteinene på CHO-celler og måle antistoffbindingen ved hjelp av FACS-analyse som beskrevet i eksempel 1.2 og eksempel 7.

Det er ett aspekt ved oppfinnelsen at antistoffet ikke signifikant øker frigivelsen av cytokiner, f.eks. tumornekrosefaktor-alfa eller interferongamma. Fortrinnsvis økes ikke frigivelsen med mer en 30 %, mer foretrukket ikke mer enn 20 % og mest foretrukket ikke mer enn 10 %. Frigivelsen av cytokiner kan testes som beskrevet i eksempel 8. Alternativt kan konsentrasjonen av cytokiner bestemmes i et dyrs blod før og etter administreringen av antistoffet. Cytokinkonsentrasjonen kan bestemmes ved hjelp av en ELISA-assay eller andre fremgangsmåter kjent i teknikken.

I en annen foretrukket utførelsesform induserer ikke antistoffet signifikant T-celleproliferasjon eller hemmer T-celleproliferasjon. Et antistoffs effekt på T-celleproliferasjon kan bestemmes som beskrevet i eksempel 9.

Beskrevet er et bindingsmolekyl som kan binde til den samme L1-epitopen som gjenkjennes av det monoklonale antistoffet 9.3, fremstilt ved hybridomcellen deponert under DSMZ ACC2841. Med hensyn til dette bindingsmolekylet som er beskrevet, gjelder de samme utførelsesformene som er definert med hensyn til strukturen til bindingsmolekylet som er beskrevet ovenfor, også dette bindingsmolekylet.

Bindingen av antistoffet til epitopen økes eller reduseres fortrinnsvis ikke signifikant av glykosyleringstilstanden til L1-proteinet. Glykosyleringstilstandens innvirkning på antistoffbindingen kan bestemmes som beskrevet i eksempel 10.

Videre vedrører oppfinnelsen en hybridomcelle som fremstiller det monoklonale antistoffet ifølge oppfinnelsen.

Videre vedrører oppfinnelsen hybridomcellen deponert under DSMZ ACC2841.

5

Som forklart ovenfor og som beskrevet i eksempeldelen er det monoklonale antistoffet ifølge oppfinnelsen spesielt egnet for behandling av tumorigene sykdommer.

10

Derfor, i et annet aspekt, vedrører oppfinnelsen antistoffet ifølge oppfinnelsen for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av en tumorigen sykdom.

15

Videre vedrører oppfinnelsen også antistoffet ifølge oppfinnelsen for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av en tumorigen sykdom, hvori antistoffet ifølge oppfinnelsen administreres til et individ i en effektiv mengde for å behandle sykdommen. Med hensyn til anvendelsen av oppfinnelsen gjelder også alle utførelsesformer som definert nedenfor for anvendelsen av oppfinnelsen.

20

Som nevnt ovenfor har det i teknikken vært foreslått å bruke anti-L1-antistoffer for å sensibilisere tumorceller for behandling med et kjemoterapeutisk legemiddel eller med stråleterapi (se Sebens Mürkoster et al., Oncogene. 2007 Apr 26;26(19):2759-68, Epub 2006 Nov 6). Følgelig, i et annet aspekt, vedrører den foreliggende oppfinnelsen antistoffet ifølge oppfinnelsen for anvendelse i en fremgangsmåte for å sensibilisere tumorceller hos en pasient for behandling med et kjemoterapeutisk legemiddel eller med stråleterapi.

25

Dette aspektet ved den foreliggende oppfinnelsen er spesielt nyttig i tilfeller der tumorcellene er minst delvis resistente mot kjemoterapi eller mot stråleterapi.

30

Derfor, i en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen, er cellene som skal sensibiliseres, minst delvis resistente mot behandling med det kjemoterapeutiske legemiddelet eller mot stråleterapi.

35

Innenfor rammen av den foreliggende oppfinnelsen skal betegnelsen "sensibilisere" forstås som at etter behandling med anti-L1-antistoffet ifølge oppfinnelsen, er tumorcellene mer mottakelige for behandling med et kjemoterapeutisk legemiddel eller med stråleterapi enn før behandlingen. Dette

kan f.eks. testes ved å isolere tumorceller fra pasienten og teste in vitro om behandlingen med antistoffet eller bindingsmolekylet ifølge oppfinnelsen resulterer i en sensibilisering av cellene. Denne testen kan utføres som beskrevet i referanse (Sebens Mürkoster et al., Oncogene. 2007 Apr 26;26(19):2759-68, Epub 2006 Nov 6).

5

I en foretrukket utførelsesform var cellene, før administreringen av anti-L1-antistoffet ifølge oppfinnelsen, ikke mottakelige for behandlingen eller bare mottakelige i en grad der behandlingen med et kjemoterapeutisk legemiddel eller med stråleterapi ikke ville resultere i den ønskede terapeutiske effekten.

10

Fortrinnsvis, med hjelp av anti-L1-antistoffet ifølge oppfinnelsen, økes mottakeligheten med minst 20 %, mer foretrukket med minst 40 % og enda mer foretrukket med minst 100 %.

15

En oversikt over kjemoterapeutiske legemidler og stråleterapi gis f.eks. i Remington's Pharmaceutical Sciences, 5. utg., kapittel 33, særlig side 624 til 652.

20

Hvilke som helst av tallrike kjemoterapeutiske legemidler kan brukes i oppfinnelsens anvendelser. Disse forbindelsene faller innenfor flere ulike kategorier, inkludert for eksempel alkyliserende midler, antineoplastiske antibiotika, antimetabolitter og naturlig kilde-derivater.

25

Eksempler på alkyliserende midler som kan brukes i oppfinnelsen, inkluderer busulfan, karoplatin, karmustin, klorambucil, cisplatin, syklofosfamid (dvs. cytoxan), dakarbazin, ifosfamid, lomustin, mekloretamin, melfalan, prokarbazin, streptozocin og tiotepa.

30

Eksempler på antineoplastiske antibiotika inkluderer bleomycin, daktinomycin, daunorubicin, doksorubicin, idarubicin, mitomycin (f.eks. mitomycin C), mitoksantron, pentostatin og plikamycin.

35

Eksempler på antimetabolitter inkluderer fluordeoksyuridin, kladribin, cytarabin, floksuridin, fludarabin, flururacil (f.eks. 5-fluoruracil (5FU)), gemcitabin, hydroksyurea, merkaptopurin, metotreksat og tioguanin.

Eksempler på naturlig kilde-derivater inkluderer docetaxsel, etoposid, irinotekan, taksaner (f.eks. paklitaxsel), teniposid, topotekan, vinblastin, vinkristin, vinorelbin, prednison og tamoksifen.

- 5 Ytterligere eksempler på kjemoterapeutiske midler som kan brukes i oppfinnelsen, inkluderer asparaginase og mitotan.

Videre kan også C2-ceramid brukes.

- 10 I en spesielt foretrukket utførelsesform er det kjemoterapeutiske legemiddelet valgt fra gruppen som består av aktinomycin-D, mitomycin C, cisplatin, doksorubicin, etoposid, verapamil, podofyllotoksin, 5-FU, taksaner slik som paklitaxsel, og karboplatin.

- 15 Ifølge oppfinnelsen vedrører betegnelsen "stråleterapi" hver strålingsterapi som vanligvis brukes for å behandle tumorceller. I en foretrukket utførelsesform inkluderer denne terapien γ -stråler, røntgenstråler, mikrobølger, UV-stråling og den direkte leveringen av radioisotoper til eller ved siden av tumorceller (brakyterapi).

- 20 Som nevnt ovenfor er formålet med dette aspektet ved oppfinnelsen å sensibilisere tumorcellene for behandling med et kjemoterapeutisk legemiddel eller med stråleterapi. Følgelig, i en foretrukket utførelsesform, etter sensibiliseringen med anti-L1-antistoffet ifølge oppfinnelsen, behandles
- 25 pasienten videre med det kjemoterapeutiske legemiddelet eller med stråleterapien.

- Innenfor rammen av den foreliggende oppfinnelsen er det tatt sikte på å sensibilisere tumorceller av enhver type eller å behandle enhver tumorigen
- 30 sykdom. Tumorcellene eller den tumorigene sykdommen er fortrinnsvis av en type valgt fra gruppen som består av astrocytom, oligodendrogliom, meningiom, nevrofibrom, glioblastom, ependymom, schwannom, nevrofibrosarkom, medulloblastom, melanom, bukspyttkjertelkreft, prostatakarsinom, hode- og nakkekreft, brystkreft, lungekreft, eggstokkreft, endometriekreft, nyrekreft,
- 35 nevroblastomer, plateepitelcellekarsinomer, medulloblastomer, hepatom, tykktarmskreft og mesoteliom- og epidermiskarsinom.

Videre er det foretrukket at tumorcellene er fra en epitelial tumor eller den tumorigene sykdommen er en epitelial tumor, fortrinnsvis hvori den epiteliale tumoren er bykspyttkjertelkreft, tykktarmskreft, eggstokkreft eller endometriekreft.

5

I en foretrukket utførelsesform induserer ikke antistoffet nevronale bivirkninger når det administreres i en terapeutisk effektiv mengde.

10

Som drøftet ovenfor brukes anti-L1-antistoffet til fremstilling av en farmasøytisk sammensetning.

15

Generelt omfatter de farmasøytiske sammensetningene ifølge den foreliggende oppfinnelsen en terapeutisk effektiv mengde av et terapeutikum, og en farmasøytisk akseptabel bærer. I en spesifikk utførelsesform betyr betegnelsen "farmasøytisk akseptabel" godkjent av en føderal eller statlig reguleringsmyndighet eller oppført i Den amerikanske farmakopé eller en annen generelt anerkjent farmakopé for anvendelse hos dyr, og nærmere bestemt hos mennesker. Betegnelsen "bærer" henviser til et fortynningsmiddel, en adjuvans, et hjelpestoff, eller en vehikkel som terapeutikumet administreres med. Slike farmasøytiske bærere kan være sterile væsker, slik som vann og oljer, inkludert de av petroleum-, dyre-, vegetabilsk eller syntetisk opprinnelse, inkludert, men ikke begrenset til, peanøttolje, soyabønneolje, mineralolje, sesamolje og lignende. Vann er en foretrukket bærer når den farmasøytiske sammensetningen administreres oralt. Saltløsning og vandig dekstrose er foretrukne bærere når den farmasøytiske sammensetningen administreres intravenøst. Saltløsninger og vandig dekstrose og glyserolløsninger benyttes fortrinnsvis som flytende bærere for injiserbare løsninger. Egnede farmasøytiske eksipienter inkluderer stivelse, glukose, laktose, sukrose, gelatin, malt, ris, mel, kritt, silikagel, natriumstearat, glyserolmonostearat, talkum, natriumklorid, skummet tørrmelk, glyserol, propylen, glykol, vann, etanol og lignende. Sammensetningen kan om ønskelig også inneholde mindre mengder fuktmiddel eller emulgeringsmiddel eller pH-buffermiddel. Disse sammensetningene kan ta form av løsninger, suspensjoner, emulsjoner, tabletter, piller, kapsler, pulvere, formuleringer for vedvarende frisetting, og lignende. Sammensetningen kan være formulert som en stikkpille, med tradisjonelle bindemidler og bærere slik som triglycerider. Oral formulering kan inkludere standard bærere som farmasøytiske kvaliteter av mannitol, laktose, stivelse, magnesiumstearat, natriumsakkarin, cellulose,

20

25

30

35

magnesiumkarbonat osv. Eksempler på egnede farmasøytiske bærere er beskrevet i "Remington's Pharmaceutical Sciences" av E.W. Martin. Slike sammensetninger vil inneholde en terapeutisk effektiv mengde av terapeutikumet, fortrinnsvis i renset form, sammen med en egnet mengde bærer for å tilveiebringe formen for riktig administrering til pasienten. Formuleringen skal passe administreringsformen.

I en foretrukket utførelsesform er sammensetningen formulert, i henhold til rutineprosedyrer, som en farmasøytisk sammensetning tilpasset for intravenøs administrering til mennesker. Sammensetninger for intravenøs administrering er typisk løsninger i steril isoton vandig buffer. Der det er nødvendig, kan sammensetningen også inkludere et solubiliseringsmiddel og et lokalbedøvende middel slik som lidokain for å lindre smerte på injeksjonsstedet. Ingrediensene leveres generelt enten separat eller blandet sammen i enhetsdoseringsform, for eksempel som et frysetørket tørrpulver eller vannfritt konsentrat i en hermetisk forseglet beholder slik som en ampulle eller dosepose som indikerer mengden av aktivt middel. Der sammensetningen skal administreres ved infusjon, kan den dispenseres med en infusjonsflaske som inneholder sterilt vann eller saltløsning av farmasøytisk kvalitet. Der sammensetningen administreres ved injeksjon, kan en ampulle med sterilt vann eller saltløsning for injeksjon tilveiebringes slik at ingrediensene kan blandes før administrering.

Terapeutikaene ifølge oppfinnelsen kan formuleres som nøytrale eller salte former. Farmasøytisk akseptable salter inkluderer de som er dannet med frie karboksylgrupper slik som de som er avledet fra hydroklor-, fosfor-, eddik-, oksal-, vinsyrer osv., de som er dannet med frie amingrupper, slik som de som er avledet fra isopropylamin, trietylamin, 2-etylaminogetanol, histidin, prokain osv., og de som er avledet fra natrium-, kalium-, ammonium-, kalsium- og jernhydroksider, osv.

Mengden av terapeutikumet ifølge oppfinnelsen, som vil være effektivt i behandlingen av en bestemt lidelse eller tilstand, vil avhenge av lidelsens eller tilstandens natur, og kan bestemmes ved standard kliniske teknikker. In vitro-assayer kan i tillegg eventuelt benyttes for å bidra til å identifisere optimale doseringsområder. Den nøyaktige dosen som skal benyttes i formuleringen, vil også avhenge av administreringsveien og sykdommens eller lidelsens alvorlighetsgrad, og bør avgjøres etter legens skjønn og hver pasients

- omstendigheter. Egnede doseringsområder for intravenøs administrering er imidlertid generelt ca. 20–500 mikrogram med aktiv forbindelse per kilogram kroppsvekt. Egnede doseringsområder for intranasal administrering er generelt ca. 0,01 pg/kg kroppsvekt til 1 mg/kg kroppsvekt. Effektive doser kan
- 5 ekstrapoleres fra doseresponskurver avledet fra in vitro- eller dyremodelltestsystemer. Stikkpiller kan generelt inneholde aktiv ingrediens i området fra 0,5 % til 10 vekt-%; orale formuleringer inneholder foretrukket 10 % til 95 % aktiv ingrediens.
- 10 Ulike leveringssystemer er kjent og kan brukes til å administrere et terapeutikum ifølge oppfinnelsen, f.eks. innkapsling i liposomer, mikropartikler og mikrokapsler: bruk av rekombinante celler som kan uttrykke terapeutikumet, bruk av reseptormediert endocytose (f.eks. Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432); konstruksjon av en terapeutisk nukleinsyre som en del av en
- 15 retroviral eller annen vektor, osv. Fremgangsmåter for introduksjon inkluderer, men er ikke begrenset til, intradermale, intramuskulære, intraperitoneale, intravenøse, subkutane, intranasale, epidurale og orale veier. Forbindelsene kan også administreres ved hvilken som helst praktisk vei, f.eks. ved infusjon, ved bolusinjeksjon, ved absorpsjon gjennom epiteliale eller mukokutane hinner
- 20 (f.eks. orale, rektale og intestinale slimhinner, osv.), og kan administreres sammen med andre biologisk aktive midler. Administreringen kan være systemisk eller lokal. I tillegg kan det være ønskelig å introdusere de farmasøytiske sammensetningene ifølge oppfinnelsen i sentralnervesystemet ved enhver egnet vei, inkludert intraventrikulær og intratekal injeksjon;
- 25 intraventrikulær injeksjon kan forenkles ved for eksempel et intraventrikulært kateter, festet til et reservoar, slik som et Ommaya-reservoar. Pulmonal administrering kan også benyttes, f.eks. ved anvendelse av en inhalator eller nebulisator, og formulering med et aerosoliseringsmiddel.
- 30 I en spesifikk utførelsesform kan det være ønskelig å administrere de farmasøytiske sammensetningene ifølge oppfinnelsen lokalt til området som trenger behandling. Dette kan for eksempel uten begrensning oppnås ved lokal infusjon under kirurgi, topisk applisering, f.eks. i kombinasjon med en sårbandasje etter kirurgi, ved injeksjon, ved hjelp av et kateter, ved hjelp av en
- 35 stikkpille, eller ved hjelp av et implantat der implantatet er av et porøst, ikke-porøst eller gelatinøst materiale, inkludert membraner slik som silastiske membraner eller fibre. I en utførelsesform kan administrering være ved direkte

injeksjon på stedet (eller det tidligere stedet) for en ondartet tumor eller neoplastisk eller preneoplastisk vev.

5 I en annen utførelsesform kan terapeutikumet leveres i en vesikkel, særlig et liposom (Langer, 1990, Science 249:1527-1533), nærmere bestemt et kationisk liposom (WO 98/40052).

10 I enda en annen utførelsesform kan terapeutikumet leveres via et system for kontrollert frisetting. I en utførelsesform kan en pumpe brukes (Langer, supra). I enda en annen utførelsesform kan systemet for kontrollert frisetting plasseres i nærheten av det terapeutiske målet, hvilket således bare krever en fraksjon av den systemiske dosen.

15 Også beskrevet er en fremgangsmåte for å sensibilisere tumorceller hos en pasient for behandling med et kjemoterapeutisk legemiddel eller med stråleterapi, omfattende å administrere til pasienten en effektiv mengde av et anti-L1-antistoff eller bindingsmolekyl ifølge oppfinnelsen. Alle utførelsesformene beskrevet ovenfor gjelder også for denne fremgangsmåten.

20 Gjennom hele oppfinnelsen betyr betegnelsen "effektiv mengde" at et gitt molekyl eller en gitt forbindelse administreres i en mengde som er tilstrekkelig for å oppnå en ønsket terapeutisk effekt. Gjennom hele oppfinnelsen, i tilfelle to forbindelser administreres i en terapeutisk effektiv mengde, inkluderer dette at ett eller hver av forbindelsene administreres i en subterapeutisk mengde, dvs. at
25 mengden av hver forbindelse alene ikke er tilstrekkelig til å tilveiebringe en terapeutisk effekt, men at kombinasjonen av forbindelsene resulterer i den ønskede terapeutiske effekten. Det er imidlertid også inkludert i den foreliggende oppfinnelsen at hver av forbindelsene alene administreres i en terapeutisk effektiv mengde.

30 Også beskrevet er bruken av anti-L1-antistoffet eller bindingsmolekylet ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et medikament for behandling av tumorceller hos en pasient som tidligere er behandlet med et kjemoterapeutisk legemiddel eller med stråleterapi.

35 Som nevnt ovenfor er behandling av tumorceller med anti-L1-antistoffer allerede beskrevet i WO 02/04952 og WO 06/013051.

Innenfor rammen av den foreliggende oppfinnelsen kan betegnelsen "tidligere behandlet" inkludere pasienter som allerede er behandlet med et kjemoterapeutisk legemiddel eller med stråleterapi under forløpet av et separat regime som har foregått f.eks. innenfor de siste seks eller åtte månedene.

Under forløpet av tumorbehandling med kjemoterapeutiske legemidler eller stråleterapi er det i de fleste tilfeller observert at etter en første respons hos tumoren på slik terapi (tumormassereduksjon eller stabilisering av sykdommen), begynner tumorene å utvikle seg igjen. Slik progresjon begynner vanligvis uker eller måneder etter slik terapi. Disse tumorene er da typisk resistente overfor ytterligere behandling med det tidligere appliserte kjemoterapeutiske legemiddelet, og andre behandlingsmåter er ønsket. Som beskrevet ovenfor er det funnet at slike resistente tumorer uttrykker L1 og derfor blir et mål for anti-L1-antistoffer.

Derfor, ifølge denne utførelsesformen av oppfinnelsen, betyr betegnelsen "tidligere behandlet" fortrinnsvis at pasienten tidligere mottok slik behandling, slik behandling viste en initiell effekt og – på tidspunktet for terapi med anti-L1-antistoffet eller bindingsmolekylet utvikler tumoren seg igjen.

Videre kan betegnelsen "tidligere behandlet" også ses i en kontekst der L1 anti-L1-antistoffet eller bindingsmolekylet og det kjemoterapeutiske legemiddelet eller stråleterapien brukes innenfor det samme regimet, hvilket betyr at behandlingene gis innenfor én behandlingsplan. I denne konteksten betyr "i én behandlingsplan" at behandlingen appliseres samtidig, én etter én eller intermitterende, men – i motsetning til ovenfor – tidsintervallene mellom de enkelte behandlingene er korte (innenfor én uke eller innenfor 2–4 dager) og, hvis det ses en behandlingssuksess, venter man ikke på tumorprogresjon før den neste behandlingen appliseres.

I denne konteksten inkluderer oppfinnelsen fortrinnsvis tilfellet der en pasient behandles med et kjemoterapeutisk legemiddel eller med stråleterapi og deretter, fortrinnsvis innenfor en uke eller mindre, og mer foretrukket innenfor 2–4 dager, startes en behandling med anti-L1-antistoffet ifølge oppfinnelsen. I en ytterligere foretrukket utførelsesform foretas det flere sykluser med kjemoterapi eller stråleterapi på én side og behandling med anti-L1-antistoffet,

med intervaller på fortrinnsvis én uke eller mindre, og mer foretrukket innen 2–4 dager.

5 I en foretrukket utførelsesform er pasienten minst delvis resistent mot behandling med det kjemoterapeutiske legemiddelet eller med stråleterapi, en effekt som ofte observeres under forløpet av de nevnte behandlingstypene (se ovenfor).

10 I et ytterligere aspekt vedrører oppfinnelsen et anti-L1-antistoff ifølge oppfinnelsen for anvendelse i behandling av tumorceller hos en pasient som er minst delvis resistent mot behandling med et gitt kjemoterapeutisk legemiddel eller med stråleterapi.

15 Innenfor rammen av den foreliggende oppfinnelsen betyr betegnelsen "resistent mot behandling" at den respektive tumorcellen ikke reagerer på behandlingen med et kjemoterapeutisk legemiddel eller med stråleterapi på en fullstendig måte. I stedet, med hensyn til denne tumorcellen, er behandling med det kjemoterapeutiske legemiddelet eller stråleterapi nokså ineffektivt eller viser ingen effekt.

20 I et ytterligere aspekt ved oppfinnelsen vedrører oppfinnelsen et anti-L1-antistoff ifølge oppfinnelsen for anvendelse i behandling av en tumorigen sykdom, hvori anti-L1-antistoffet administreres i kombinasjon med et kjemoterapeutisk legemiddel eller med stråleterapi, fortrinnsvis hvori det kjemoterapeutiske legemiddelet eller stråleterapien administreres før anti-L1-antistoffet ifølge oppfinnelsen.

30 Ifølge oppfinnelsen inkluderer betegnelsen "behandling av tumorigene sykdommer" både dreping av tumorceller, reduksjon av proliferasjon av tumorceller (f.eks. med minst 30 %, minst 50 % eller minst 90 %) samt fullstendig hemming av proliferasjonen av tumorceller. Videre inkluderer denne betegnelsen forebygging av en tumorigen sykdom, f.eks. ved å drepe celler som kan eller er tilbøyelig til å bli en tumorcelle i fremtiden, samt dannelsen av metastaser.

35 Ifølge oppfinnelsen inkluderer betegnelsen "i kombinasjon med" enhver kombinert administrering av anti-L1-antistoffet og det kjemoterapeutiske

legemiddelet eller stråleterapien. Dette kan inkludere den simultane appliseringen av legemidlene eller stråleterapien eller, foretrukket, en separat administrering. I tilfelle det tas sikte på en separat administrering, kan det fortrinnsvis sikres at en signifikant tidsperiode ikke vil utløpe mellom leveringstidspunktet, slik at anti-L1-antistoffet og det kjemoterapeutiske legemiddelet eller stråleterapien fortsatt vil kunne utøve en fordelaktig kombinert effekt på cellen. I slike tilfeller er det foretrukket at cellen bringes i kontakt med begge midlene i løpet av ca. én uke, fortrinnsvis ca. 4 dager, mer foretrukket i løpet av ca. 12–36 timer etter hverandre.

Begrunnelsen bak dette aspektet ved oppfinnelsen er at administreringen av kjemoterapeutiske legemidler eller behandlingen med stråleterapi fører til en økning av L1-uttrykking på tumorcellenes overflate, hvilket i sin tur gjør tumorcellene til et bedre mål for anti-L1-antistoffet.

Derfor innbefatter dette aspektet ved oppfinnelsen også behandlingsregimer der anti-L1-antistoffet administreres i kombinasjon med det kjemoterapeutiske legemiddelet eller stråleterapien i ulike behandlingssykluser hvori hver syklus kan være atskilt med en tidsperiode uten behandling som kan vare f.eks. i to uker, og hvori hver syklus kan involvere den gjentatte administreringen av anti-L1-antistoffet og/eller det kjemoterapeutiske legemiddelet eller stråleterapien. En slik behandlingssyklus kan for eksempel innbefatte behandling med et kjemoterapeutisk legemiddel eller med stråleterapi, etterfulgt av f.eks. applisering to ganger av anti-L1-antistoffet i løpet av 2 dager.

Gjennom hele oppfinnelsen vil fagmannen forstå at den individuelle terapien som skal appliseres, vil avhenge av f.eks. pasientens fysiske tilstand eller av sykdommens alvorlighetsgrad og vil derfor måtte justeres fra tilfelle til tilfelle.

Spesielt under forløpet av slike gjentatte behandlingssykluser, er det også tatt sikte på innenfor den foreliggende oppfinnelsen at anti-L1-antistoffet administreres før det kjemoterapeutiske legemiddelet eller stråleterapien.

Også beskrevet er en fremgangsmåte for å behandle tumorceller hos en pasient som tidligere er behandlet med et kjemoterapeutisk legemiddel eller med stråleterapi, omfattende å administrere til pasienten en terapeutisk effektiv mengde av anti-L1-antistoffet ifølge oppfinnelsen. Videre er det også beskrevet

en fremgangsmåte for å behandle tumorceller hos en pasient som er minst delvis resistent mot behandling med et gitt kjemoterapeutisk legemiddel eller med stråleterapi, omfattende å administrere til pasienten en terapeutisk effektiv mengde av anti-L1-antistoffet ifølge oppfinnelsen. Videre er det beskrevet en fremgangsmåte for å behandle tumorceller hos en pasient, omfattende å administrere til pasienten en terapeutisk effektiv mengde av anti-L1-antistoffet ifølge oppfinnelsen i kombinasjon med et kjemoterapeutisk legemiddel eller med stråleterapi. Videre er det beskrevet en fremgangsmåte for å behandle tumorceller hos en pasient, omfattende å administrere til pasienten en terapeutisk effektiv mengde av anti-L1-antistoffet ifølge oppfinnelsen.

Antistoffet ifølge oppfinnelsen kan også anvendes i en fremgangsmåte for en diagnostisk metode for å bestemme nivået av L1-proteinet i kroppsvev eller -væsker.

Med hensyn til disse fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen er det beskrevet at alle utførelsesformer som er beskrevet ovenfor for de andre anvendelsene eller fremgangsmåtene til oppfinnelsen, også gjelder.

Oppfinnelsen vedrører også antistoffet ifølge oppfinnelsen for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av en tumorigen sykdom for sensibilisering av tumorceller hos en pasient for behandling med et kjemoterapeutisk legemiddel eller med stråleterapi.

I en foretrukket utførelsesform utviser anvendelsen ytterligere trekkene som definert for anvendelsene av oppfinnelsen.

Oppfinnelsen vedrører også farmasøytiske sammensetninger som omfatter antistoffet ifølge oppfinnelsen. Med hensyn til den farmasøytiske sammensetningen gjelder også alle utførelsesformer som er beskrevet ovenfor.

Oppfinnelsen belyses ytterligere ved hjelp av følgende figurer og eksempler.

Forklaringer til figurer og tabeller**Figur 1**

5 (A) FACS-analyse av CHO-, CHO-L1-, SKOV3ip- og OVMz-celler. Celler ble farget med angitte mAb-er (10 µg/ml) i 30 min ved 4 °C. Etterfulgt av en andre PE-konjugert mAb. (B) Western blot-analyse. Cellelysater fra CHO wt-, CHO-L1-, OVMz- og SKOV3ip-celler ble overført på en PVDF-membran og så inkubert med angitt mAb til L1 (1µg/ml), etterfulgt av en POX-konjugert andre mAb.

10

Figur 2

(A) Effekt av antistoffer på Erk-fosforylering i SKOV3ip-celler. Celler ble inkubert i 24 h ved 37 °C med de angitte rensede antistoffene til L1 (10 µg/ml) eller isotypekontroll IgG1. Celler ble også behandlet med DMSO (vehikkel), eller den MEK-spesifikke inhibatoren PD59098. Cellelysater ble undersøkt for fosforylering av Erk.

15

(B) Effekt av antistoffer på Erk-fosforylering i SKOV3ip-celler. Fluorescerende farging av antistoffbehandlede celler med et fosfo-Erk-spesifikt antistoff og en Alexa488-konjugert andre mAb.

20

Figur 3

25 Analyse av matrigel-celleinvasjon. Antistoff (10 µg/ml)-behandlede SKOV3ip-celler ble utsådd i en 4-brønnsplate og tillatt å invadere inn i matrigelen i 20 h (5 % CO₂; 37 °C).

Figur 4

30 Differensialgenuttrykking i SKOV3ip-celler. (A) SKOV3ip-celler ble transfektert med L1-spesifikk eller blandet siRNA, og 72 h senere ble mRNA-er isolert,

transkribert til cDNA og brukt som mal for qPCR (SYBRgreen-analyse). (B) SKOV3ip-celler ble behandlet med L1-9.3 mAb (10 µg/ml) eller kontroll-mAb IgG1 (10 µg/ml), og 96 h senere ble mRNA-er isolert, transkribert til cDNA og analysert ved qPCR for uttrykkningen av de angitte genene (SYBRgreen-analyse). (C) Differensialgenuttrykkningen av resterende tumorceller. mRNA-er fra resterende tumorer ble isolert fra antistoffbehandlede dyr, transkribert til cDNA og analysert ved qPCR for uttrykkningen de angitte genene.

Figur 5

Tumorvekst hos nakenmus. *LacZ*-merkede SKOV3ip-celler ble injisert i. p. i nakenmus og etter tumorimplantasjon ble dyrene behandlet med de angitte L1 mAb-ene eller kontroll-mAb EpCAM (Hea125). Etter 30 dager ble tumorvolumet bestemt og er gitt som forholdet mellom X-Gal-farget tumormasse og den totale situs. 6 dyr ble analysert per gruppe.

Figur 6

(A) Western blot-analyse av L1-V5-konstruksjoner. Supernatant av transfektert Sf9-insektceller ble mottatt fra Ricardo Gouveia og analysert ved Western blot ved bruk av L1-9.3 mAb og undersøkt på nytt ved anti-V5 mAb. (B) Western blot-analyse av L1-FC-konstruksjoner. L1-FC-konstruksjoner ble transfektert til Cos-7-celler ved bruk av Jet PEITM-transfeksjonsreagens som beskrevet. Etter 3 dager ble supernatanter rensert ved bruk av SepharoseA og analysert ved Western blot ved bruk av L1-9.3 mAb.

Figur 7

Homofil celleadhesjonsassay. (A) Bindingen av J558-L1-celler ble analysert ved lysfeltmikroskopi. Ett eksempel på hver behandling vises her. I den røde boksen er belegg med L1-Fc (10 µg/ml) uthevet, og i den svarte boksen vises begge kontrollene, fibronektin (10 µg/ml) og BSA. (B) Grafen viser gjennomsnitt ± SD av bundne celler etter den angitte antistoff- eller kontrollbehandlingen.

Figur 8

Antistoff lettjede- og tungjede-DNA-sekvensene brukt til å konstruere de humaniserte antistoffene er tilveiebrakt i henholdsvis figur 8a og 8b.

5

Figur 9

Aminosyresekvenser av det murine L1_9.3 scFv (a) og de humaniserte L1_9.3Hu (b) og L1_9.3Hu3 scFv-ene (c).

10

Figur 10

DNA- og aminosyresekvenser av de uttrykte partiene av L1_9.3 (a), L1-9.3Hu (b) og L1_9.3Hu3 scFv- (c) konstruksjoner.

15

Figur 11

Binding av L1_9.3 L1-9.3Hu og L1_9.3Hu3 scFv-ene til det humane L1-cancerantigenet. Rad A, B og C er belagt med L1, og rad D, E og F er belagt med streptavidin. Den blå fargen i brønnene indikerer binding av det individuelle scFv til L1 på platen. Mangelen på farge i de streptavidinbelagte radene viser at enkeltkjedeantistoffene spesifikt binder til L1

20

Figur 12

Genomiske sekvenser av de variable domenene til det monoklonale antistoffet 9.3

25

a) Sekvens av variabel kappakjederegion (prikkede linjer: CDR1, stiplede linjer: CDR2, understreket: CDR3)

30

b) Sekvens av variabel tungkjederegion (prikkede linjer: CDR1, stiplede linjer: CDR2, understreket: CDR3)

Figur 13

- 5 A) Humane PBMC- og L1-positive OVMZ-tumorceller ble inkubert med L1-9.3 mAb i 24 h og mengden bundet antistoff ble bestemt ved FACS-analyse.
- B) Dissosiasjonskonstantene K_D ble estimert fra regresjonskurver ved bruk av konsentrasjonen ved halvmaksimal binding.

Figur 14

10

L1-9.3 har ingen effekt på frisettingen av cytokiner ved hvilende og aktivert human PBMC. Cytokinnivåer for hvilende og OKT3-aktivert PBMC fra tre ulike donorer ble bestemt etter en inkubasjon i 24 h under nærvær eller fravær av 20 µg/ml L1-9.3. Ionomycin/PMA og LPS ble brukt som stimuleringskontroller. Resultater for IFN-γ (A) og TNF-α (B) er vist.

15

Figur 15

20

L1-9.3 inkluderer ikke T-celleproliferasjon og har ingen effekt på OKT3-indusert T-celleproliferasjon. Proliferasjon av OKT3-aktivert PBMC fra to ulike donorer ble bestemt under nærvær eller fravær av 20 µg/ml L1-9.3 ved bruk av BrdU-inkorporeringsassay 48 h etter stimulering. Det var ingen forskjell på om antistoffet ble tilsatt før, parallelt med eller etter stimulering med 75 ng/ml OKT3. L1-9.3 alene resulterte ikke i T-celleaktivering.

25

Figur 16

30

L1-9.3 var upåvirket av deglykosylering av L1. Western blot-fargingen av L1 i ubehandlet og deglykosylert cellelysate er vist ved bruk av flere ulike anti-L1 mAb-er. De testede antistoffene kan deles inn i tre klasser med hensyn til deres glykosyleringsavhengighet: Første klasse (upåvirket av glykosylering): L1-9.3. Andre klasse (binding i WB ble negativt påvirket av deglykosylering): 11A,

14.10, OV52.24 og OV549.20. Tredje klasse (binding i WB ble positivt påvirket av deglykosylering): 35.9 og 38.12.

Figur 17

5

Figuren viser in vivo binding av intravenøst applisert L1-9.3 til nyrens oppsamlingskanaler. In vivo binding kunne bare detekteres ved bruk av amplifikasjonssystemet CSA (fig. 17A), mens ved bruk av den konvensjonelle ABC-metoden var ikke noe signal synlig (fig. 17B). Følgelig ble L1-9.3 detektert i et område på 30–300 pmol i vevet (L1-9.3-konsentrasjon er formodentlig høyere enn 5 ng/ml og under 50 ng/ml). Negativ kontroll viste ikke farging, følgelig kan uspesifikk farging ekskluderes (fig. figur 17C). Fargemønsteret til in vivo bundet L1-9.3 (fig. 17A) samsvarer med L1-uttrykkingsmønsteret i nyren ved direktefarging av vevsseksjoner med L1-9.3 (fig. 17D).

10

15

Figur 18

FACS-analyse av humaniserte L1-9.3 mAb-er

20

Strømningscytometrianalyse av SKOV3ip pcDNA3.1-luciferaseceller. Celler ble farget med de angitte humaniserte mAb-ene (10 µg/ml) i 30 min 4 °C, etterfulgt av en andre PE-konjugert mAb.

Figur 19

25

Muse-SKOV3ip-xenograftmodell

30

7×10^6 SKOV3ip pcDNA3.1-luciferaseceller ble injisert intraperitonealt i 6 uker gamle CD1 nu/nu-hunnmus. Etter 24 h ble musene randomisert i grupper på 10 mus. Hver gruppe med mus ble tre ganger i uken injisert med 300 µg enten mAb L1-chi9.3, mAbL1-hu3 eller PBS intraperitonealt.

På dag 33 ble musene avbildet (fig. 2). Tumorvolum ble bestemt ved bruk av XENOGEN IVIS 200-systemet. Kort sagt ble musene bedøvet og injisert med 100 µl Luciferin D (3 µg/mus) intraperitonealt. Etterpå ble luciferaseaktivitet i tumorcellene målt ved å detektere lysemisjon. Tumorvolumet vises som foton per sekund (total fluks). Statistisk analyse ble utført ved bruk av students t-test.

Figur 20

In vivo total tumormasse

Etter 36 dager ble musene avlivet og tumormassen ble bestemt. Tumorvekst er gitt som et forhold mellom tumormasse og kroppsvekt. (A individuelle mus, B gjennomsnittsverdi). Statistisk analyse ble utført ved bruk av students t-test. Således kunne behandlingen av mus med immunsvekkelse med L1 9.3-antistoff reproduseres med kimerte og humaniserte former av L1 9.3 mAb.

Figur 21

PT45-P1res-celler ble enten ikke behandlet (w/o) eller ble behandlet med 20 µg/ml gemcitabon (A) eller etoposid (B) under fravær (w/o) eller nærvær av enten 1 eller 10 µg/ml anti-L1CAM-antistoff 9.3 eller 1 eller 10 µg/ml isotype-matchet kontroll-antistoff. Etter 24 timer ble cellene analysert ved caspase-3/-7-assay. Gjennomsnittsverdier ± SD fra tre uavhengige forsøk er vist. * angir $p < 0,05$.

Figur 22

Colo357-celler ble enten ikke behandlet (w/o) eller ble behandlet med 20 µg/ml gemcitabon (A) eller etoposid (B) under fravær (w/o) eller nærvær av enten 1 eller 10 µg/ml anti-L1CAM-antistoff 9.3 eller 1 eller 10 µg/ml isotype-matchet kontroll-antistoff. Etter 24 timer ble cellene analysert ved caspase-3/-7-assay. Gjennomsnittsverdier ± SD fra tre uavhengige forsøk er vist. * angir $p < 0,05$.

Tabell 1

Tabellen viser et sammendrag av antistoffer testet i de angitte assayene.

5 Eksempler**1. Eksempel 1****1.1 Sammendrag av eksempel 1**

10

15

20

25

L1-adhesjonsmolekylet (L1-CAM) er et transmembrant celleadhesjonsmolekyl som er involvert i cellemigrering og aksonstyring ved utviklingen av nervesystemet. L1 er også overuttrykt i eggstokk- og endometriekarsinomer. Her er L1-uttrykking assosiert med dårlig prognose. I karsinomcellelinjer forhøyer L1-overuttrykking cellemotilitet, tumorvekst hos mus og induserer uttrykking av Erk-avhengige gener. Her viser vi at behandling med antistoffer til L1 opphever Erk-aktivering, blokkerer celleinvasjon til matrigel og reduserer tumorvekst hos nakenmus. I celler behandlet med L1-antistoffer blir induksjonen av Erk-avhengige gener slik som HOX A9, $\beta 3$ -integrin og IER 3 reversert *in vitro* og *in vivo*. I denne rapporten viser vi at antistoffet L1-9.3 er det beste terapeutiske antistoffet av alle testede L1-antistoffer. I alle tilfeller viste L1-9.3 de beste resultatene når det gjelder den invasive fenotypen eller terapeutisk effekt på tumorvekst. Vi kunne vise at L1-9.3 binder til det første Ig-lignende domenet av L1 og kan blokkere den L1-L1 homofile bindingen. Blokkeringen av homofil binding ble bare observert med L1-9.3. Vi konkluderer at L1-9.3 er overlegent i terapi siden det kombinerer to funksjoner: det blokkerer erk-aktivering og forstyrrer bindingsfunksjonen til L1.

1.2 Resultater av eksempel 1

1.2.1 FACS-analyse av de nye L1-antistoffene

5 Ved bruk av immunisering med et rekombinant L1-Fc-fusjonsprotein genererte vi nye L1-antistoffer L1-9.3, L1-14.10, L1-35.9 og L1-38.12. For å belyse spesifisiteten for L1 de nye L1 mAb-ene ble disse antistoffene testet på de endogene L1-uttrykkende eggstokkarsinomcellelinjene OVMz og SKOV3ip samt eggcellene CHO og stabilt transduserte CHO-L1-celler av kinesisk hamster ved
10 fluorescerende farging (fig. 1A) og Western blot-analyse (fig. 1B). Alle testede antistoffer viste en positiv farging av L1 i CHO-L1-celler (fig. 1A). Fargemønsteret for OVMz- og SKOV3ip-cellene var forskjellig for antistoffene. Interessant nok viste L1-9.3-antistoffet klar farging av begge eggstokkarsinomcellelinjer OVMz og SKOV3ip, mens L1-14.10 viste en svært
15 svak farging (fig. 1A). De to L1-antistoffene L1-35.9 og L1-38.12 kunne ikke binde til disse cellenes endogene L1 (fig. 1A). Som forventet kunne ingen farging for L1 observeres i CHO-celler som ble brukt som negativ kontroll. Alle nye antistoffer detekterte L1 av full lengde i CHO-L1-, OVMz- og SKOV3ip-cellelysater ved Western blot-analyse. De L1-negative CHO-cellene tjente igjen
20 som negativ kontroll.

1.2.2 Erk-fosforyleringen reduseres etter antistoffbehandling

25 En nyere rapport har vist at uttrykking av L1 i samarbeid med serum-avledede vekstfaktorer fører til vedvarende Erk-aktivering og induksjon av Erk-avhengige gener (Silletti et al, 2004). Vi undersøkte om den undertrykkende effekten til L1-antistoffer kan skyldes interferens med L1-mediert genregulering. Derfor undersøkte vi virkningsmåten til L1-antistoffer ved bruk av SKOV3ip-celler. mAb-ene L1-11A, L1-9.3 og L1-14.10 blokkerte effektivt Erk-fosforylering (fig. 2A) *in*
30 *vitro*. Det var ingen hemming med isotype-matchet kontroll-mAb, DMSO som vehikkel eller L1-antistoffet L1-38.12 (fig. 2A) som kan binde bare den nevrale isoformen av L1. Fluorescensanalyse med det fosfo-spesifikke Erk-antistoffet bekreftet en klar reduksjon av aktivert Erk. En nedbryting fra kjernen i L1-mAb-behandlede celler (L1-11A, L1-9.3 og L1-14.10) kunne også observeres (fig. 2B).

1.2.3 Antistoffbehandling med L1-antistoffer reduserte celleinvasjon

Det har blitt demonstrert tidligere at behandling med et antistoff til L1 (L1-11A) reduserte den haptotaktiske cellemigreringen på fibronektin og ulike cellelinjers matrigelinvasjon (Arlt et al, 2006). Vi sammenlignet invasjonsevnen til SKOV3ip-celler behandlet de ulike L1-antistoffene. Antistoffene L1-11A, L1-14.10 og spesielt L1-9.3 reduserte invasjonen til SKOV3ip (fig. 3). I skarp kontrast viste celler behandlet med antistoffene L1-35.9 eller L1-38.12 ikke noen reduksjon av invasjon (fig. 3).

1.2.4 Antistoffer til L1 påvirker genuttrykking *in vitro* og *in vivo*

Videre undersøkte vi om antistoffer til L1 påvirker genuttrykkingsprofilen i SKOV3ip-celler *in vitro* på en lignende måte som den observert for siRNA-mediert nedbryting av L1 (fig. 4A). Riktig nok viste qRT-PCR-analyse av celler behandlet med L1-9.3 eller L1-11A versus kontrollantistoff signifikante endringer i uttrykkingen av L1-regulerte gener slik som β 3-integrin, transkripsjonsfaktorene HOXA9 og de apoptoserelaterte genene IER 3 og STK 39 (fig. 4A). Det samme settet med gener ble nedregulert i SKOV3ip-celler transdusert med et L1-spesifikt siRNA (fig. 4B).

Vi testet om mAb L1-9.3 også kunne influere genuttrykkingsprofilen til SKOV3ip-celler *in vivo* lignende det som ble observert *in vitro*. For dette formålet ble mRNA fra resterende tumorer hos L1-9.3-behandlede mus eller IgG-kontrollbehandlede mus isolert og utsatt for qRT-PCR-analyse. L1-9.3-behandling førte til signifikant regulering av L1-avhengige gener som demonstrert for HOXA9, β 3-integrin og IER 3 (fig. 4C).

1.2.5 Analyse av tumorigenisitet hos nakenmus

Deretter undersøkte vi om den intraperitoneale veksten av SKOV3ip hos mus kunne hemmes ved behandling med mAb-ene L1-11A, L1-9.3 eller L1-14.10. SKOV3ip-lacZ-celler ble injisert i det peritoneale hulrommet til hunn-nakenmus 2 dager før oppstart av terapi. Hver annen uke ble i.p. behandlinger utført ved bruk av antistoffkonsentrasjonen 10 mg/kg. Kontrollmus ble behandlet med PBS

eller HEA125 (anti-EpCAM) som et kontrollantistoff (annenhver uke 10 mg/kg i.p.). I alle anti-L1 mAb-behandlingsgrupper var en betydelig reduksjon i mengden tumormasse synlig sammenlignet med PBS eller kontrollantistoff HEA-125 (fig. 5). Sammenlignet med kontrollen førte alle anti-L1 mAb-er til en doseavhengig reduksjon av i.p. tumorbyrde [L1-11A (10 mg/kg), -40 %; L1-14.10 (10 mg/kg), -30 %; L1-9.3 (10 mg/kg), -60 %; fig. 5]. Tumorreduksjon i gruppen behandlet med L1-9.3 (10 mg/kg) var statistisk signifikant ($P_{L1-9.3 (10 \text{ mg/kg})} = 0,004$) sammenlignet med PBS-kontrollen. Mus behandlet med HEA125-kontrollantistoffet avslørte ingen detekterbar reduksjon av SKOV3ip-*lacZ* i.p. tumorbyrde sammenlignet med den PBS-behandlede gruppen (fig. 5), selv om EpCAM er til stede på SKOV3ip-cellene og HEA125 kan binde til tumorcellene. Ingen bivirkninger eller alvorlig toksisitet av behandling med L1-mAb-er L1-11A, L1-9.3 eller L1-14.10 ble observert under hele behandlingens forløp.

Følgelig reduserte behandling med antistoffer til L1 tumorvekst SKOV3ip-celler (fig. 5), hvilket antyder at antistoffer til L1 kan regulere genuttrykkningen, men også påvirke *in vivo* tumorvekst.

1.2.6 Biacore-studie av de nye L1-antistoffene

Denne studien ble utført av Avidex (Oxford) som beskrevet i eksempel 6. Tabell I oppsummerer disse resultatene vedrørende bindingskinetikken til de nye L1-antistoffene (k_a , k_d og KD).

1.2.7 Epitop-mapping av L1-9.3-bindingssted

En viktig faktor for karakteriseringen av nye L1-antistoffer er å undersøke deres bindingssteder i L1. Derfor konstruerte vi en rekke L1-Fc-fusjonsproteiner som dekker ulike deler av molekylet. PCR-produkter ble amplifisert kodende for ulike lengder av L1-ektodomeneregioner. Disse konstruksjonene ble klonet inn i pIg-vektoren, og uttrykket som Fc-fusjonsproteiner. Etter rensing ble produktene brukt til Western blot-analyse. For å sammenligne resultatene analyserte vi andre rekombinante L1-proteinfragmenter (oppnådd fra Ricardo Gouveia, Oeiras, Portugal). L1-9.3 ble funnet å binde til første Ig-domene av L1 (fig. 6). L1-14.10

binder i det tredje Ig-domenet, mens L1-11A binder mellom FN3-5-stedet (fig. 6).

1.2.8 m4B L1-9.3 blokkerer L1-L1 homofil binding

5

Vi spurte om L1-antistoffene kunne forstyrre den homofile bindingsfunksjonen til L1. For å svare på dette spørsmålet brukte vi en celleadhesjonsassay der L1-transfekteerte celler får binde til immobilisert L1. Etter første påstrykning av glassplater med et rekombinant L1-Fc-fusjonsprotein, fibronectin for positiv kontroll (til hvilket celler binder på en integrinavhengig måte) eller BSA som en negativ kontroll, inkuberte vi J558-L1-celler med L1-11A-, L1-9.3- eller L1-14.10-antistoff. Til kontroll brukte vi en IgG-kontroll, PBS eller et antistoff til CD24 (SWA11). mAb L1-9.3 kunne blokkere den L1-L1 homofile bindingen fullstendig, mens alle andre testede antistoffer ikke kunne forstyrre den homofile bindingsevnen. Ingen av antistoffene forstyrret bindingen til fibronectin (data ikke vist).

1.3 Materialer og fremgangsmåter

20

1.3.1 Cellelinjer og cellekultur

De humane eggstokkarsinomcellelinjene SKOV3ip (velvillig tilveiebrakt av Ellen Vitetta, University of Texas, Dallas, TX) og OVMz ble dyrket i DMEM (Biochrom, Berlin, Tyskland) med 10 % FCS under cellekulturbetingelser (5 % CO₂, 95 % relativ fuktighet, 37 °C). For identifisering og kvantifisering av tumormasse ble SKOV3ip-cellene stabilt transdusert med en *lacZ*-kodende retroviral vektor (GeneSuppressor Retroviral System, Biocarta, Hamburg, Tyskland). Eggstokkcellelinjen fra kinesisk hamster CHO som stabilt uttrykker humant L1 (-hL1), ble etablert ved transfeksjon med superfekt (Stratagene, Heidelberg, Tyskland) og seleksjon for L1-uttrykking med mAb L1-11A og magnetiske kuler (Myltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Tyskland) eller sortering med FACS Calibur. Alle celler ble kultivert i DMEM supplementert med 10 % FCS ved 37 °C, 5 % CO₂ og 100 % fuktighet. Humane L1-kodende plasmider og J558-L1-celler ble oppnådd fra Dr. Vance Lemmon (University of Miami, Miami, FL, USA).

1.3.2 Antistoffer

HEA-125, et muse-IgG1 rettet mot EpCAM, ble beskrevet tidligere og binder til alle humane adenokarsinomer (Moldenhauer et al., 1987). Monoklonalt antistoff L1-14.10 (Huszar et al., 2006), L1-9.3, L1-35.9 og L1-38.12 ble oppnådd etter immunisering av mus med humant L1-Fc-protein omfattende ektodomenet av L1 (Oleszewski et al., 1999). Anti-muse-IgG fra geit ble affinitetsrenset og absorbert til humane serumproteiner (Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA).

1.3.3 Biokjemisk analyse

SDS-PAGE og overføring av separerte proteiner til Immobilon-membraner ved bruk av halvtørr blotting er beskrevet tidligere (Gutwein et al., 2000). Etter blokkering med 5 % skummetmelk i TBS eller 1 % BSA i TBS/0,1 % Tween-20, ble blottene utviklet med det respektive primære antistoffet etterfulgt av peroksidasekonjugert sekundært antistoff og ECL-deteksjon.

1.3.4 FACS-analyse

Overflatefargingen av celler med mettede mengder mAb-er, enten hybridomsupernatanter eller rensede antistoffer, og PE-konjugerte geiteantistoffer til muse-Ig (Dianova, Hamburg, Tyskland) er beskrevet andre steder (Ebeling et al., 1996). Fargede celler ble analysert med en FACScan (Becton Dickinson).

1.3.5 Immunfluorescens

For immunfluoresent farging ble celler dyrket på dekkglass, behandlet i 10 min med pervanadat og fiksert i 20 min med 4 % paraformaldehyd/PBS ved romtemperatur. Celler ble vasket i PBS og permeabilisert med 0,1 % NP-40 i PBS inneholdende 5 % geiteserum i 15 min ved romtemperatur. Cellene ble så inkubert i 1 time med første antistoff (fosfo-spesifikk Erk1/2). Etter 3 vasketrinn med PBS ble cellene inkubert 30 min i mørket til et andre Alexa488-konjugert anti-muse-IgG fra geit. Etter vasking av cellene to ganger med PBS ble fargede celler montert på glassplater og undersøkt med et epifluorescensmikroskop (Axioplan-2; Zeiss, Oberkochen).

1.3.6 Invasjonsassay

5 Tumorcelleinvasjon *in vitro* ble bestemt i en dobbelfilterassay som beskrevet tidligere i Erkell et al. (1988). Kort fortalt ble en Matrigel lagt i lag mellom to
 10 filtre, et nedre 5 µm-porers nitrocellulosefilter og et øvre 8 µm-porers polykarbonatfilter. Etter en inkubasjon av 10^5 celler med filter-sandwichen i 20 h i 1 ml medium, ble sandwichen fiksert og filtrere separert og farget med DAPI. Celler til stede i gelen på det nedre filteret ble talt, og celleinvasjon ble uttrykt som forholdet mellom celletallet på det nedre filteret og det totale antallet celler til stede på begge filtrere.

1.3.7 Kvantitativ PCR

15 For qPCR ble cDNA rensset på Microspin G-50-kolonner (GE Healthcare, München, Tyskland) og kvantifisert ved NanoDrop-spektrofotometer (ND-1000. Kisker-Biotechnology, Steinfurt, Tyskland). Primere for qPCR ble utformet med DNA Star-programmet og ble fremstilt av MWG (Ebersberg, Tyskland). β-aktin ble brukt som en intern standard. PCR-reaksjonen ble utformet med SYBRgreen-mastermiksen (Applied biosystems, Darmstadt, Tyskland).

1.3.8 Cellebindingsassay

20 Cellebindingsassayer til L1-Fc eller fibronektin er beskrevet i detalj i Oleszewski et al (JCB 2000).

1.3.9 Tumormodell og terapi

25 Patogenfrie, atymiske CD1 *nu/nu*-hunnmus (7–9 uker gamle; 20 g i gjennomsnitt; Charles River) ble inokulert med 5×10^6 humane *lacZ*-merkede eggstokkarsinomceller (SKOV3ip-*lacZ*) inn i det peritoneale hulrommet på dag 0, hvilket førte til i.p. tumordannelse innen 5 uker. Anti-L1-mAb-er ble fortynnet i steril PBS til konsentrasjonen som trengtes til behandling. Tumorbærende mus
 30 ble behandlet i.p. to ganger i uken med 300 µl løsning av den respektive dosen (henholdsvis 10 mg/kg per applisering), vehikkel (PBS), eller Hea125-antistoffkontroll. Antistoffbehandlingene begynte fra dag 3 etter tumorcelleinjeksjon for å gi tumorcellene tid til å feste til innsiden av bukhuleveggen og overflaten på de i.p. organene. Ved obduksjon (dag 38), ble

det tatt prøver av ascites fra alle mus, og volumet ble bestemt. Alle i.p. organer (inkludert tumormasse), bukhuleveggen og diafragma ble fjernet, farget med β -galaktosidasesubstrat (X-gal; Roche-Diagnostics, Penzberg, Germany), fotografert og veid. Den indigoblå tumormassen mellom organene, på diafragma og innsiden av bukhuleveggen ble fjernet og veid alene. Den relative tumorbyrden i hver mus ble beregnet ved å dividere tumormassevekt med total *situs*-vekt.

2. Eksempel 2

Humanisering av det murine anti-L1-antistoffet L1_9.3

For å humanisere det murine anti-L1-antistoffet L1_9.3 ble genene av human ν -kappa 1 (humk1) og variabel tungkjede-familie III (humIII) benyttet som akseptorsekvenser. Nummereringssystemet brukt heri for disse genene er hentet fra Wu og Kabat (Kabat, E. A, Wu, T. T., Perry, HM, Gottesman, KS and Foeller, C (1992) Sequences of proteins of immunological interest, Diane Books Publishing company). De murine L1_9.3-antistoff lett- og tungkjedeaminosyresekvensene ble oppstilt mot aminosyresekvensene i henholdsvis humk1 lettkjede og humIII tungkjede. To humaniserte L1_9.3-antistoffer (L1_9.3Hu og L1_9.3Hu3) ble generert ved å erstatte de seks CDR-ene i det humane antistoffet med de korresponderende CDR-ene fra det murine L1_9.3-antistoffet.

Lokasjoner for de seks komplementaritetsbestemmende regionene (CDR)

Sløyfe	Kabat-nummereringsskjema
LCDR1	L24--L34
LCDR2	L50--L56
LCDR3	L89--L97
HCDR1	H31--H35B
HCDR2	H50--H65
HCDR3	H93--H101

Et antall strukturrester av det murine L1_9.3-antistoffet ble overført til de humaniserte L1_9.3-antistoffene:

5 Versjon 1 (L1_9.3Hu) humanisert antistoff – tungkjederest nummer 6, 23, 27, 30, 43, 49, 71, 73, 76, 78 og 94, og lettkjederest nummer 100 ble overført fra det murine L1_9.3-antistoffet, og lettkjederest nummer 73 ble erstattet med det korresponderende (Phe) funnet på denne posisjonen i den humane REI-antistoff-lettkjeden.

10 Versjon 2 (L1_9.3Hu3) humanisert antistoff – tungkjederest nummer 6, 23, 27, 30, 71, 73 og 94, og lettkjederest nummer 100 ble overført fra det murine L1_9.3-antistoffet.

15 DNA-sekvenser som koder for enkeltkjedet variabelt fragment (scFv)-analoger av det murine L1_9.3-antistoffet og de to humaniserte versjonene av dette antistoffet (L1_9.3Hu og L1_9.3Hu3) for uttrykking i *E. coli*, ble så generert. Alle disse scFv-ene inneholder den samme linker (TSGPGDGGKGGPGKGGEGTKGTGPGG). scFv-genene ble syntetisert av GeneArt AG, Tyskland.

20 Antistoff lettkjede- og tungkjede-DNA-sekvensene brukt til å konstruere de humaniserte antistoffene er tilveiebrakt i henholdsvis figur 8a og 8b.

Figur 9a–9c tilveiebringer aminosyresekvensene av henholdsvis det murine L1_9.3 scFv og de humaniserte L1_9.3Hu og L1_9.3Hu3 scFv-ene.

25

3. Eksempel 3

Kloning av DNA som koder for L1_9.3, L1-9.3Hu og L1-9.3Hu3 scFv-ene, inn i E.coli periplasmisk uttrykking-vektorer og transformasjon av E. coli med disse vektorene.

30

Periplasmisk uttrykking av scFv-er er gunstig av flere grunner. For det første lekker slike scFv-er inn i den bakterielle supernatanten, og derfra kan de enkelt analyseres for binding til deres beslektede antigen (L1-cancerantigenet i dette

tilfellet). For det andre muliggjør periplasmisk uttrykking rensing av løselige aktive scFv-er.

5 DNA-sekvensene som koder for L1_9.3, L1-9.3Hu og L1_9.3Hu3 scFv-ene som syntetisert av GeneArt AG, Tyskland, ble ikke tilført i en *E. coli* periplasmisk uttrykkingsvektor. Derfor ble disse DNA-sekvensene klonet inn i en *E. coli* periplasmisk uttrykkingsvektor ved bruk av de følgende fremgangsmåtene.

10 DNA-et som koder for de syntetiserte scFv-ene, ble PCR-fremstilt med de følgende primerparene ved bruk av standard PCR-betingelser og reagenser:

scFv	Primerpar
L1-9.3	Yol811 og Yol812
L1-9.3Hu	Yol813 og Yol814
L1_9.3Hu3	Yol813 og Yol814

Primersekvensene er vist nedenfor.

Yol811 AGCCGGCCATGGCCGATATTCAGATGACCCAGAC

15 Yol812 TCTATGCAGCGGCGGCACCGCCGCTGCTCACGGTAACGCTG

Yol813 AGCCGGCCATGGCCGATATTCAGATGACCCAGAG

Yol814 TCTATGCAGCGGCGGCACCGCCGCTGCTCACGGTAACCAGGGTG

20 PCR-produktene ble kjørt på en 1,6 % agarosegel og bånd med den riktige størrelsen eksidert og renset. PCR-produktene ble dobbelfordøyd med *Nco1*- og *Not1*-restriksjonsenzymmer under standard betingelser etterfulgt av ny rensing. PCR-produktene ble ligert inn i en IPTG-indusibel periplasmisk uttrykkingsvektor som inneholdt:

- 25
- en pelB-ledersekvens for å rette de kodede polypeptidene til periplasmaet der denne ledersekvensen så spaltet av
 - *Nco1/Not1*-kloningssteder
 - det humane antistoffet kappa konstantkjederegion

De ligerte vektorene ble transformert til *E. coli* TG1-celler og utplatet på av 2xTY agar (Bacto Trypton 16 g/l, gjærekstrakt 10 g/l, 15 g/l bactoagar og NaCl 5g/L) supplementert med 100 µg/ml ampicillin og 2 % glukose. DNA- og aminosyresekvensene til de uttrykte partiene av L1_9.3, L1-9.3Hu og L1_9.3Hu3 scFv-konstruksjoner er vist i henholdsvis figur 10a, 10b og 10c.

4. Eksempel 4

Uttrykking av L1_9.3, L1-9.3Hu og L1_9.3Hu3 enkeltkjedeantistoffer i *E. coli*

Polypeptidene som uttrykkes av disse vektorene, inkluderer det humane antistoffet c kappa konstantregion fusjonert til den C-terminale enden av scFv-ene. Disse c kappa konstantkjede-inneholdende konstruksjonene er omtalt heri som enkeltkjedeantistoffer.

Åtte *E. coli*-kloner for hver enkeltkjedeantistoffkonstruksjon, L1_9.3, L1_9.3Hu og L1_9Hu3 (24 kloner totalt) ble valgt i separate brønner i en 96-brønnsplate som inneholder 300 µl med 2xTY (Bacto Trypton 16 g/l, gjærekstrakt 10 g/l og NaCl 5 g/l) supplementert med 100 µg/ml ampicillin og 2 % glukose. Hver brønn har et volum på 1 ml. Kulturene ble dyrket med risting (200 rpm) ved 37 °C inntil kulturene nådde en OD₆₀₀ på ca. 0,5. 96-brønnsplatene ble så rotert ved 3200 rpm i 10 min, og supernatanten ble aspirert og kassert. Bakteriepelletene ble resuspendert i fersk 2XTY 400 µl supplementert med 100 µg/ml ampicillin og 1mM IPTG for å indusere uttrykking av enkeltkjedeantistoffene. Kulturene ble ristet ved 200 rpm over natten ved 25 °C.

Neste dag ble 96-brønnsplaten rotert ved 3200 rpm i 10 min for å pelletere cellene. Supernatanten som inneholdt de uttrykte enkeltkjede-L1-antistoffene, ble beholdt for ELISA-analyse.

5. Eksempel 5

ELISA-assay av binding av L1_9.3, L1-9.3Hu og L1_9.3Hu3 scFv-ene til humant L1-cancerantigen

5

Denne ELISA-assayen ble utført for å bekrefte at humaniseringsprosessen ikke hadde ført til et tap av antistoff som binder til L1-cancerantigenet, og for å identifisere hvilke av de valgte klonene som uttrykte enkeltkjedeantistoffkonstruksjonene på riktig måte.

10

Tre rader av en 96-brønnsplate ble belagt med 100 µl L1-antigen som omfatter det ekstracellulære domenet til L1-proteinet fusjonert til et Fc-fragment (5 µg/ml) i PBS i 1 time ved romtemperatur. Ytterligere tre rader ble belagt med streptavidin (5 µg/ml) i PBS som en kontroll.

15

Brønnene ble vasket tre ganger med 370 µl med PBS og blokkert med 3 % melkepulver i PBS i 1 time ved romtemperatur.

50 µl av hver bakterielle supernatant over natten ble blandet med 50 µl med 6 % melkepulver i PBS i 1 time.

20

Den blokkerte ELISA-platen ble vasket to ganger med PBS som beskrevet ovenfor, og de blokkerte supernatantene som inneholder enkeltkjedeantistoff, ble tilsatt og inkubert i 1 hp ved romtemperatur.

25

96-brønnsplaten ble vasket fire ganger med PBS 0,1 % tween etterfulgt av tilsetning av 100 µl med anti-humant kappa lettkjeder bundet og fritt HRP-antistoff-konjugat (Sigma A7164) 1:5000 fortynning i PBS 1 % BSA. Konjugatet ble inkubert i 1 time ved romtemperatur etterfulgt av fem vaskinger med PBS 0,1 % tween.

30

ELISA-en ble utviklet ved tilsetningen av TMB 2-Component Microwell Peroxidase Substrate Kit (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc., USA) i henhold til produsentens protokoll. Et bilde av ELISA-platen er vist i figur 4. Minst fire L1-bindingskloner er observert for hver av tre enkeltkjedeantistoffversjoner. Disse L1-bindende enkeltkjedeantistoffklonene binder ikke til streptavidin.

35

Figur 11 viser bindingen av L1_9.3, L1-9.3Hu og L1_9.3Hu3 scFv-ene til det humane L1-cancerantigenet. Rad A, B og C er belagt med L1, og rad D, E og F er belagt med streptavidin. Den blå fargen i brønnene indikerer binding av det individuelle scFv til L1 på platen. Mangelen på farge i de streptavidinbelagte radene viser at enkeltkjedeantistoffene spesifikt binder til L1.

6. Eksempel 6

Bestemmelse av bindingsaffinitet

Museantistoff L1-9.3 og humanisert antistoff L1-hu3 ble analysert ved Biacore-analyse (Biacore AB, Uppsala, Sverige) for å bestemme bindingskinetikk.

En BIAcore CM5 sensorbrikke ble aktivert med EDC/NHS og rensert rekombinant L1-Fc ekstracellulært fragment (515 µg/ml i PBS) ble koblet til CM5-sensorbrikken til mellom 200 og 3000 RU. De resterende aktive stedene ble blokkert med etanolamin/HCl. Antistoffbinding ble målt ved å tilsette antistoff ved konsentrasjoner fra 6 til 3333 nM ved en strømningsrate på 10 µl/min ved bruk av Kinject-funksjonen. Brikken ble regenerert med 10 mM glycin pH 2,0 med 500 mM NaCl for å fjerne de bundne antistoffene.

Bindingskurvene ble tilpasset en Langmuir-bindingsmodell ved bruk av BIAevaluation-programvare (Biacore AB, Uppsala, Sverige). Bestemte KD-verdier er vist i tabell 2.

Tabell 2

Antistoff	L1-9.3	L1-hu3
Ka [1/Ms]	$2,6 \times 10^5$	$8,0 \times 10^5$
Kd [1/s]	$2,2 \times 10^{-5}$	$6,5 \times 10^{-5}$
KD [M]	$8,5 \times 10^{-11}$	$8,1 \times 10^{-11}$

Tabell 2: Den humaniserte varianten L1-hu3 viser en lignende høy målaaffinitet som morantistoffet L1-9.3.

7. Eksempel 7

Antistoffbinding til PBMC-er og cancerceller

5

PBMC ble oppnådd ved densitetsgradientsentrifugering fra EDTA-fullblod fra friske humane donorer. Dyrkede OVMZ-tumorceller ble høstet ved trypsinasjon. 1×10^5 celler/brønn (75 μ l) ble utsådd i FACS-rør. Fortynninger av L1-9.3 mAb ble preparert i kulturmedium med 10 mM EDTA og 75 μ l/brønn av L1-mAb-
 10 fortynning ble tilsatt, til PBMC-er og OVMZ-celler for å resultere i endelige konsentrasjoner mellom $6,6 \times 10^{-13}$ til $6,6 \times 10^{-8}$ mol. Deretter ble cellene inkubert over natten (~ 24 h) ved 37 °C / 5 % CO₂ i en inkubator. Cellene ble vasket direkte i FACS-rør med 2 ml FACS-buffer etterfulgt av sentrifugering ved
 15 300 g / 5 min / 4 °C. Supernatanten ble fjernet ved pipettering. For farging ble et PE-merket anti-muse sekundært antistoff fra esel (Dako) tilsatt i et volum på 150 μ l/brønn etterfulgt av inkubasjon i 30 min ved 4 °C. Vasketrinn ble gjentatt som ovenfor, og cellene ble fiksert i 200 μ l PBS / 1 % formaldehyd. Gjennomsnittlig fluorescens i prøve ble så målt ved FACS-analyse.

20

Som vist i figur 13 viser L1-9.3 mAb en sterkt redusert affinitet til L1 på PBMC sammenlignet med tumor L1. L1-9.3-binding til PBMC ble detektert i det nanomolare området (stiplet linje), mens binding til tumorceller kunne observeres ved pikomolare konsentrasjoner (heltrukken linje). B)
 25 Dissosiasjonskonstantene K_D ble estimert fra regresjonskurver ved bruk av konsentrasjonen ved halvmaksimal binding. K_D av L1-9.3 på PBMC var minst 400 ganger lavere enn på tumorceller.

8. Eksempel 8

30

Bestemmelse av cytokinfrisetting

PBMC ble oppnådd ved densitetsgradientsentrifugering fra citratfullblod fra friske humane donorer. Celler ble resuspendert i RPMI 1640 / 5 % humant serum / 5 ml NEAA / 5 ml L-Glutamin / 5ml Natrium-Pyruvat. 1×10^5 celler per

100 µl ble utsådd i rundbunnede 96-brønnsplater. I et andre trinn ble 100 µl medium inneholdende LPS (10 ng/ml), L1-9.3 mAb (20 µg/ml), OKT3 mAb (ebioscience) (75 ng/ml) eller Ionomycin/PMA (1 µg/ml / 5 ng/ml) tilsatt tre ganger etterfulgt av en inkubasjon i 24 h ved 37 °C, 5 % CO₂. Som negativ kontroll ble ubehandlet PBMC brukt. Etter 24 h ble nivåene av cytokinenes interferongamma- og tumornekrosefaktor målt ved FACS-analyse ved bruk av CBA-Cytokin-Flex-Sets (BD) i henhold til produsentens informasjon.

De resulterende cytokinnivåene er vist i figur 14. I motsetning til OKT3 mAb, Ionomycin/PMA og LPS, økte ikke L1-9.3 signifikant TNF- eller IFN-gamma-frisettingen ved PBMC-er.

9. Eksempel 9

T-celleproliferasjonsassay

PBMC ble oppnådd ved densitetsgradientsentrifugering fra citratfullblod fra to friske humane donorer. 1×10^5 celler per brønn ble utsådd i flatbunnede 96-brønnsplater. I et andre trinn ble 100 µl medium inneholdende enten L1-9.3 mAb (20 µg/ml) og OKT3 (ebioscience, 75 ng/ml) eller L1-9.3 mAb (20 µg/ml) eller OKT3 (75 ng/ml) tilsatt tre ganger. Etter 1 h ble de to siste supplementert med henholdsvis OKT3 eller L1-9.3. For å utelukke enhver antistoffrelatert aktivering ble PBMC med eller uten L1-9.3 inkubert under fravær av OKT3. Etter en inkubasjon i 24 h ved 37 °C ble 5 % CO₂ T-celleproliferasjon vurdert ved bruk av en BrdU-inkorporeringsassay (Roche) i henhold til produsentens informasjon.

Det kan konkluderes fra resultatene vist i figur 15 at L1-9.3 mAb verken induserer T-celleproliferasjon eller hemmer OKT3-indusert T-celleproliferasjon.

10. Eksempel 10

Glykosyleringsavhengighet for antistoffbinding

5 2×10^6 SKOV3ip-celler ble utsådd i en 10 cm petriskål og inkubert i 24 h ved
37 °C, 5 % CO₂. Etter 24 h ble cellene vasket med PBS og lysert med 500 µl M-
PER-reagens (Pierce) i henhold til protokollen beskrevet i Seize Classic
Mammalian Immunoprecipitation Kit (Pierce). SkOv3ip-cellelysat ble
deglykosylert som beskrevet i *Enzymatic CarboRelease Kit* (QA_Bio). Kort fortalt
10 ble 2,5 µl denatureringsoppløsning tilsatt til 35 µl cellelysat. Prøven ble inkubert i
en termoblokk ved 100 °C i 5 min og så avkjølt på is. Til slutt ble 2,5 µl Triton-X
og 1 µl av hver glykosidase inneholdt i *Enzymatic CarboRelease Kit* (QA_Bio)
(PGNase F, O-Glykosidase, Sialidase, β-Galaktosidase, Glukoaminidase) tilsatt i
henhold til produsentens protokoll etterfulgt av en inkubasjon ved 37 °C i 3 h.
15 Glykosylert og deglykosylert ble utsatt for SDS PAGE og etterfølgende Western
blotting. Western blots ble inkubert med ulike L1-antistoffer avhengig av deres
fargeytelse. Konsentrasjoner på 1 µg/ml (9.3, 11A og 14.10), 5 µg/ml (35.9)
eller 10 µg/ml (OV52.24, OV543.18, 38.12, OV549.20) ble brukt. L1-
antistoffbinding til western blot ble detektert med HRP-merket anti-museantistoff
20 (Dianova).

Som vist i figur 16 kan de testede anti-L1-antistoffene deles inn i tre klasser
med hensyn til deres glykosyleringsavhengighet: Første klasse (upåvirket av
glykosylering): L1-9.3. Andre klasse (binding i WB ble negativt påvirket av
deglykosylering): 11A, 14.10, OV52.24 og OV549.20. Tredje klasse (binding i
25 WB ble positivt påvirket av deglykosylering): 35.9 og 38.12.

11. Eksempel 11

Biodistribusjon av L1-9.3 hos kanin

30 En hunnkanin (White Himalayan) ble injisert to ganger med L1-9.3 (0 h, 24 h)
via den intravenøse appliseringsruten med en dose på 10 mg/kg. 1 kontrolldyr
mottok et sammenlignbart volum med PBS. Dyrene ble obdusert 72 h etter den
35 første appliseringen. Organer ble fiksert i 4 % bufret formalin og lagt ned i

parafin. Histologiske plater ble preparert og immunhistokjemi ble utført. Vevsseksjoner av det L1-9.3-behandlede dyret og kontrolldyret ble farget med et anti-museantistoff for å detektere binding av L1-9.3 etter intravenøs applisering. Signaler ble visualisert ved DAB (Sigma). To ulike deteksjonssystemer, konvensjonell Avidin/Biotin Complex-metode eller tyramidsignalamplifikasjonssystem CSA II-metode (Dako) ble brukt, hvilket muliggjorde grov estimering av mengden in vivo bundet L1-9.3. Den konvensjonelle Avidin/Biotin Complex-metoden (Vector Laboratories) kan detektere L1-9.3-konsentrasjoner på 50 ng/ml eller høyere, mens det biotinfrie tyramidsignalamplifikasjonssystemet CSA II (Dako) har en deteksjonsgrense på 5 ng/ml. For å bestemme L1-uttrykkingsmønsteret ble vev fra kontrolldyret inkubert med primært antistoff L1-9.3 og med deteksjonsantistoff. Til ABC-metoden ble et biotinyllert anti-museantistoff (Dianova, fortynning 1:3000) brukt som deteksjonsantistoff, for CSA ble metoden utført i henhold til produsentens protokoll.

Figur 17 viser den in vivo bindingen av intravenøst applisert L1-9.3 til nyrens oppsamlingskanaler. In vivo binding kunne bare detekteres ved bruk av amplifikasjonssystemet CSA (fig. 17A), mens ved bruk av den konvensjonelle ABC-metoden var ikke noe signal synlig (fig. 17B). Følgelig ble L1-9.3 detektert i et område på 30–300 pmol i vevet (L1-9.3-konsentrasjon er formodentlig høyere enn 5 ng/ml og under 50 ng/ml). Negativ kontroll viste ikke farging, følgelig kan uspesifikk farging ekskluderes (fig. figur 17C). Fargemønsteret til in vivo bundet L1-9.3 (fig. 17A) samsvarer med L1-uttrykkingsmønsteret i nyren ved direktefarging av vevsseksjoner med L1-9.3 (fig. 17D). Det kan konkluderes at intravenøst administrert L1-9.3-antistoff kan ekstravasere til perifert vev.

12. Eksempel 12

Funksjon til humaniserte former av L1 9.3 mAb hos nakenmus

Vi undersøkte om den humaniserte formen av mAb L1 9.3 også kunne hemme tumorveksten til eggstokkarsinom in vivo. Først analyserte vi de to humaniserte formene av L1 9.3 sin binding til den valgte cellelinjen. Derfor ble det utført strømningscytometri på SKOV3ip pcDNA3.1 luciferaseceller. (Fig. 18). Begge

mAb-er viste sterk binding til tumorcellelinjen og ga lignende bindingsresultater som det native L1 9.3 mAb.

SKOV3ip pcDNA3.1 luciferaseceller ble injisert inn i mus med immunsvikt 24 h før start av terapien. Humaniserte antistoffer (300 µg) eller PBS ble injisert tre ganger per uke intraperitonealt. For å detektere tumorveksten in vivo ble musene avbildet en gang i uken ved bruk av Xenogen IVIS 200-systemet. Musene ble bedøvet og injisert med Luciferin D, etterfulgt av detektering av lysemisjonen som produseres under luciferaseaktivitet i tumorcellene. Under tidsforløpet detekterte vi en langsommere tumorvekst i gruppen med mus som var behandlet med humanisert mAb sammenlignet med kontrollen. På dag 33 ble de siste bildedataene tatt. Bilderresultatene ga et redusert tumorvolum på ca. 80 % ved bruk av hu3 mAb og ca. 50 % for chiL1 9.3. Begge resultatene var sterkt signifikante (fig. 19). Etter 36 dager ble musene avlivet og tumormassen ble bestemt. I begge gruppene behandlet med humanisert anti-L1 mAb-er ble det målt en vesentlig redusert tumormasse sammenlignet med PBS-gruppen (fig 20 (A, B)).

13. Eksempel 13

Oppheving av kjemoresistens ved behandling med anti-L1CAM monoklonalt antistoff 9.3 ble testet som beskrevet i WO 2008/046529, eksempel 3 (se også fig. 17e i WO 2008/046529). Resultatene er vist i figur 21 og 22. Det kunne demonstreres at det monoklonale antistoffet 9.3 opphever kjemoresistens. Dets effekt synes å være sterkere enn effektene til antistoffet 11A testet i WO 2008/046529.

Tabell 1

mAb	FACS	Western blot	IP	L1-Fc	Invasjon	fosfo-Erk	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	tumorvekst
L1-9.3	+++	+++	+++	+++	-60 %	-50 %	2.6E+05	2.2E-05	8.5E-11	-60 %
L1-11A	+++	+++	+++	+++	-50 %	-40 %	1.0E+05	4.0E-06	4.0E-11	-40 %
L1-14.10	+	++	+	+++	-40 %	-40 %	1.4E+04	1.0E-06	7.1E-11	-30 %
L1-38.12	+	+++	+	+++	0	0	3.7E+04	2.0E-06	5.4E-11	
L1-35.9	+	+++	+	+++	0	0	4.0E+04	1.2E-05	3.0E-10	
L1-N15.17	++	-	++	++	0	0	5.3E+04	1.0E-03	1.9E-08	
L1-1D12.22	-	-	+	++	0	-20 %	2.3E+04	1.0E-04	4.3E-09	
L1-1D17.3	-	-	+	++	0	0	2.3E+04	1.0E-04	4.3E-09	
L1-1D64.8	-	+++	+	+++	0	0	8.5E+04	1.5E-04	1.8E-09	
L1-1D74.8	-	+++	+	+++	-10 %	0	3.0E+04	2.0E-03	6.7E-08	

Patentkrav

1. Anti-L1 monoklonalt antistoff

5 i) som kan binde til den samme L1-epitopen som gjenkjennes av det monoklonale antistoffet 9.3, fremstilt ved hybridomcellen deponert under DSMZ ACC2841 og som binder L1 med en affinitet (KD) på minst 10^{-10} , eller

ii) **karakterisert ved at** dets komplementaritetsbestemmende regioner (CDR-er) har de følgende sekvensene: LCDR1: RASQDISNYLN, LCDR2: YTSRLHS, LCDR3: QQGNTLPWT, HCDR1: RYWML, HCDR2: EINPRNDRTNYNEKFKT, og HCDR3: GGGYAMDY,

10 og som binder L1 med en affinitet (KD) på minst 10^{-10} , eller

iii) et monoklonalt antistoff, fremstilt ved hybridomcellen deponert under DSMZ ACC2841.

15 **2.** Det anti-L1 monoklonale antistoffet ifølge krav 1 i), hvori epitopen er innenfor det første immunglobulinlignende domenet til L1.

3. Humanisert antistoff omfattende de ikke-humane CDR-ene til et monoklonalt antistoff ifølge krav 1 eller 2, og en strukturregion (FR) fra et humant immunglobulinmolekyl, særlig omfattende sekvensen til L1_9.3hu eller L1_9.3hu3 som vist i figur 8 a) og b).

20

4. Antistoffet ifølge hvilke som helst av kravene 1 til 3, bundet til et aktivt stoff, fortrinnsvis et toksin, et cytokin, en nanopartikkel eller en radionuklid.

25 **5.** Hybridomcelle

(i) som fremstiller det monoklonale antistoffet ifølge hvilke som helst av kravene 1 eller 2, eller

(ii) deponert under DSMZ ACC2841.

30 **6.** Antistoffet ifølge hvilke som helst av kravene 1 til 4 for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av en tumorigen sykdom,

a) fortrinnsvis hos en pasient som tidligere er behandlet med et kjemoterapeutisk legemiddel eller med stråleterapi,

mer foretrukket hvori pasienten er minst delvis resistent mot behandlingen med det kjemoterapeutiske legemiddelet eller med stråleterapi, eller

b) fortrinnsvis hos en pasient som er minst delvis resistent mot behandling med et gitt kjemoterapeutisk legemiddel eller med stråleterapi, eller

5 c) fortrinnsvis hvori antistoffet administreres i kombinasjon med et kjemoterapeutisk legemiddel eller med stråleterapi, mer foretrukket hvori det kjemoterapeutiske legemiddelet eller stråleterapien administreres før anti-L1-antistoffet.

10 **7.** Antistoffet ifølge hvilke som helst av kravene 1 til 4 for anvendelse i en fremgangsmåte for sensibilisering av tumorceller hos en pasient for behandling med et kjemoterapeutisk legemiddel eller med stråleterapi, spesielt hvori cellene er minst delvis resistente mot behandlingen med det kjemoterapeutiske legemiddelet eller mot stråleterapi,

15 enda mer spesielt hvori pasienten etter sensibilisering med anti-L1-antistoffet videre behandles med det kjemoterapeutiske legemiddelet eller med stråleterapi.

8. Antistoffet ifølge hvilke som helst av kravene 1 til 4 for anvendelsen av hvilke som helst av kravene 6 til 7, hvori tumorcellene eller den tumorigene sykdommen er av en type valgt fra gruppen som består av astrocytom, oligodendrogliom, meningiom, nevrofibrom, glioblastom, ependymom, schwannom, nevrofibrosarkom, medulloblastom, melanom, bukspyttkjertelkreft, prostatakarsinom, hode- og nakkekraft, brystkreft, lungekreft, eggstokkreft, endometriekreft, nyrekraft, nevroblastomer, plateepitelkarsinomer,

20 medulloblastomer, hepatom, tykktarmskreft og mesoteliom- og epidermiskarsinom, eller,

25 hvori tumorcellene er fra en epitelial tumor eller den tumorigene sykdommen er en epitelial tumor, spesielt hvori den epiteliale tumoren er bykspyttkjertelkreft, tykktarmskreft, eggstokkreft eller endometriekreft.

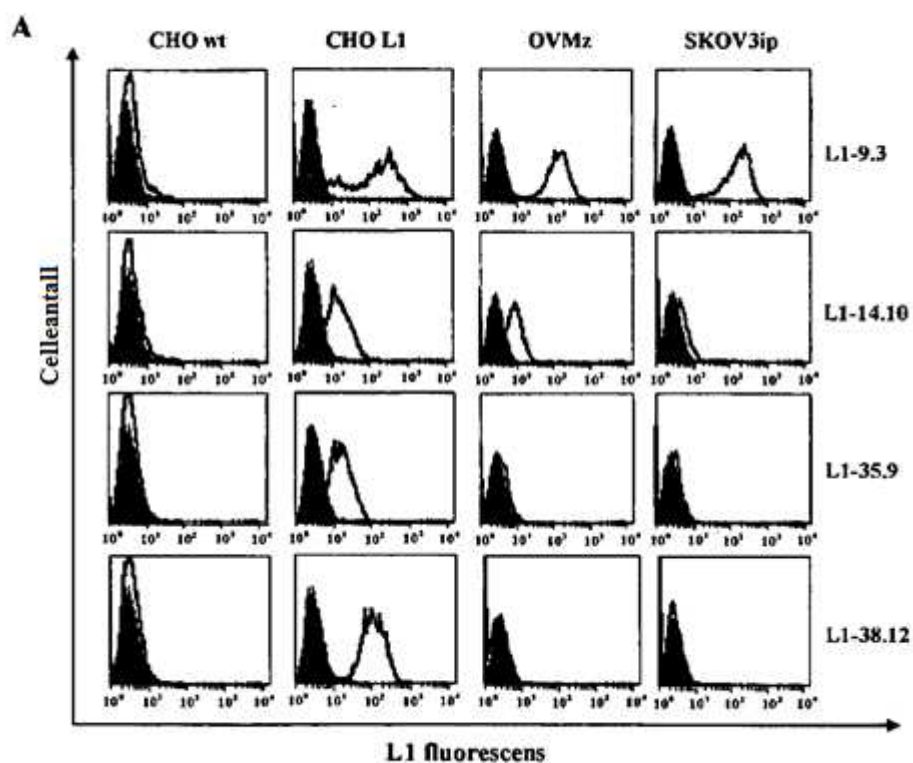
30 **9.** Antistoffet ifølge hvilke som helst av kravene 1 til 4 for anvendelsen av hvilke som helst av kravene 7 til 8, hvori det kjemoterapeutiske legemiddelet er et DNA-skadelig middel, fortrinnsvis valgt fra gruppen som består av aktinomycin-D, mitomycin C, cisplatin, doksorubicin, etoposid, verapamil, podofyllotoksin, 5-FU, taksaner, fortrinnsvis paklitaksel og karboplatin, eller hvori stråleterapien er

35

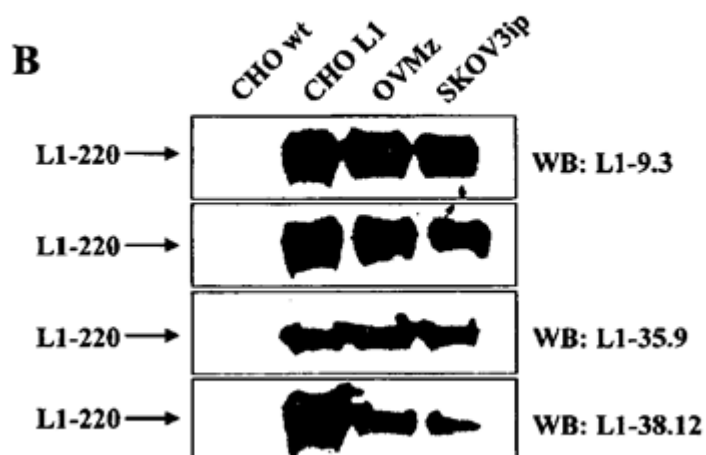
valgt fra gruppen som består av røntgenstråling, UV-stråling, γ -bestråling, α - eller β -bestråling, og mikrobølger.

- 5 **10.** Farmasøytisk sammensetning, omfattende antistoffet ifølge hvilke som helst av kravene 1 til 4.

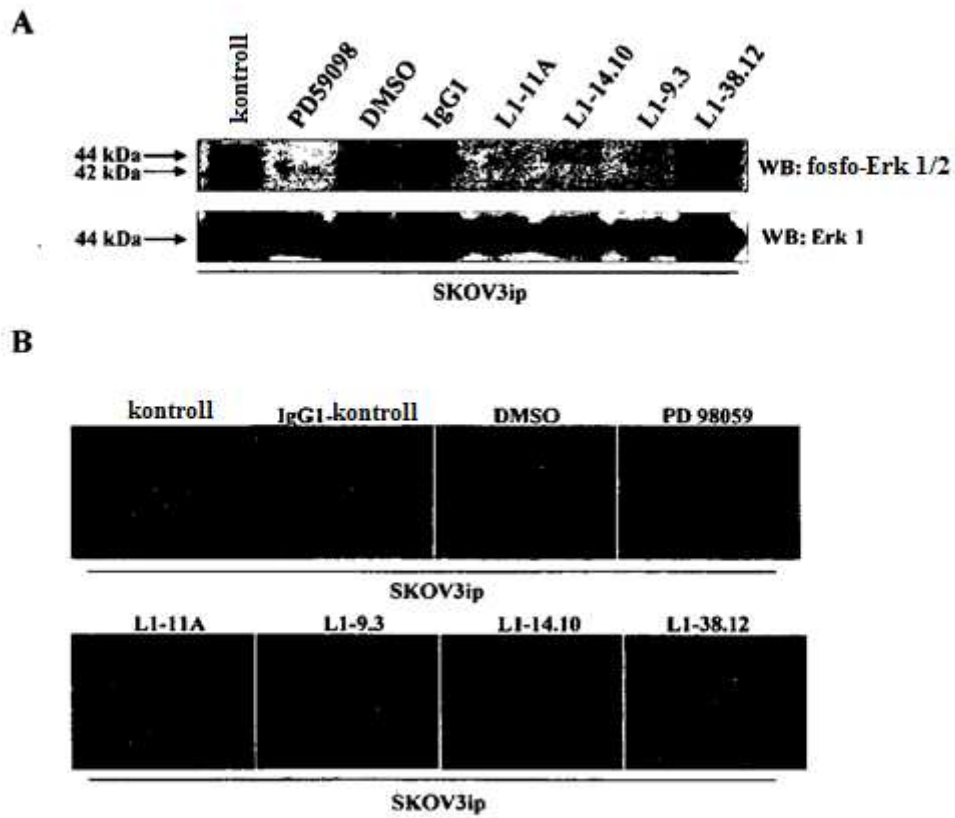
Figur 1



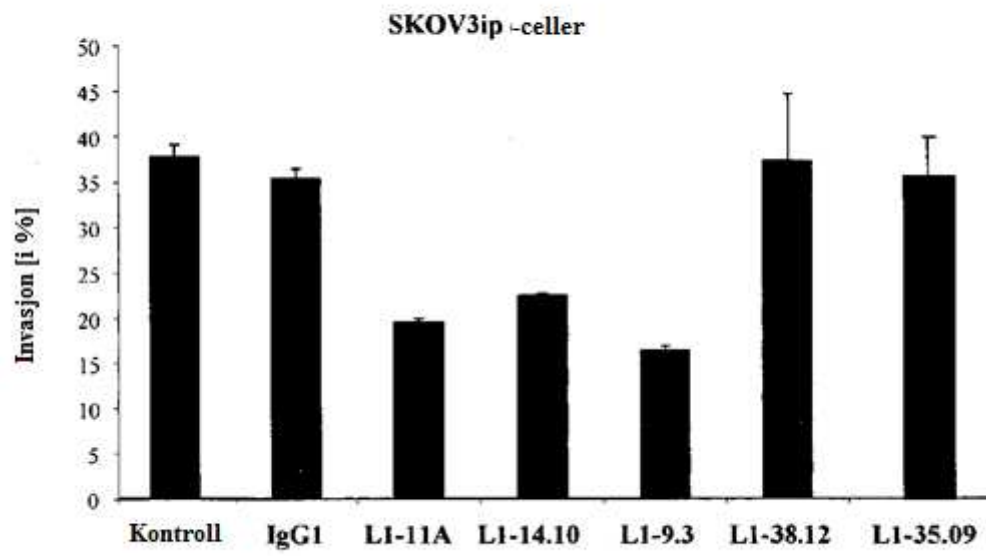
Figur 1



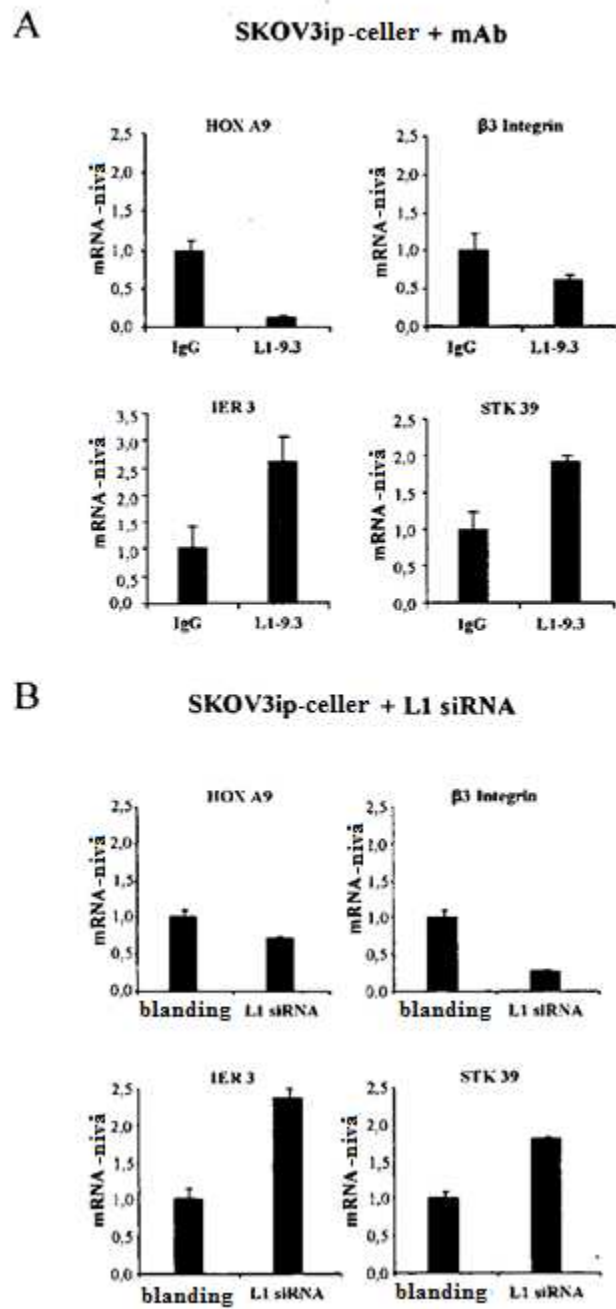
Figur 2



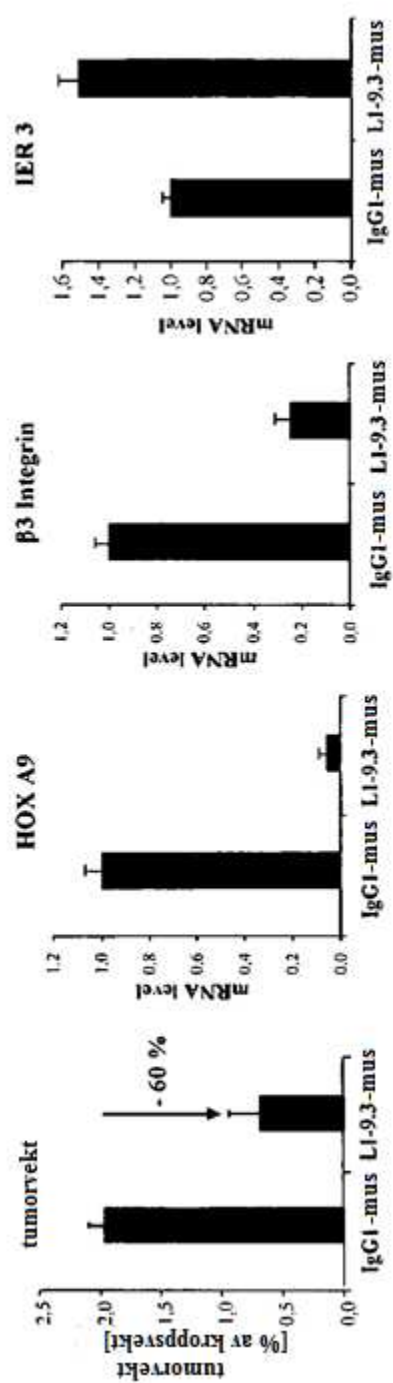
Figur 3



Figur 4

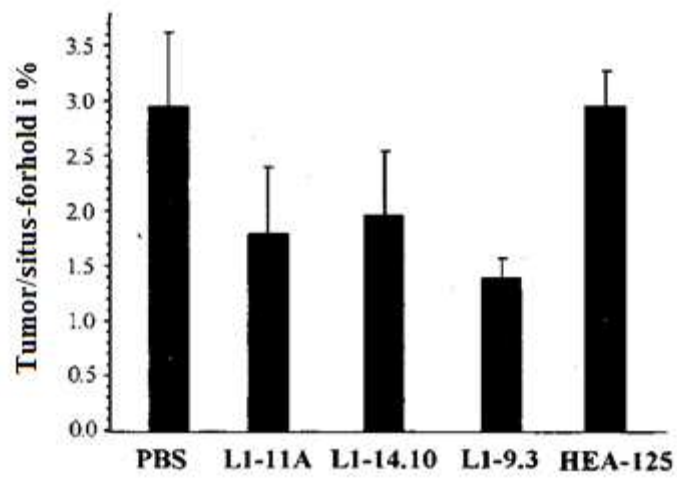


Figur 4

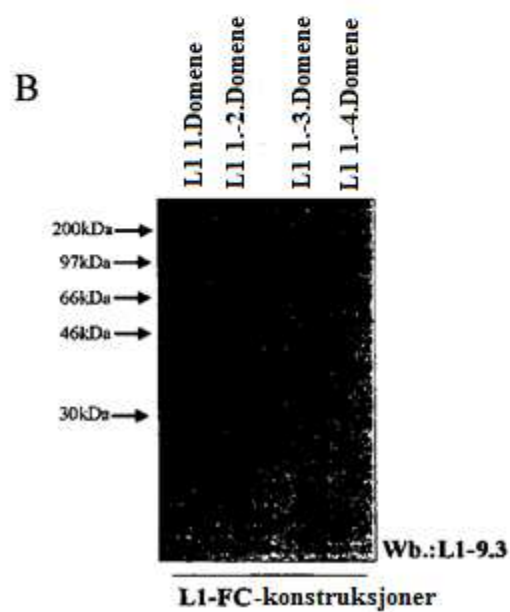
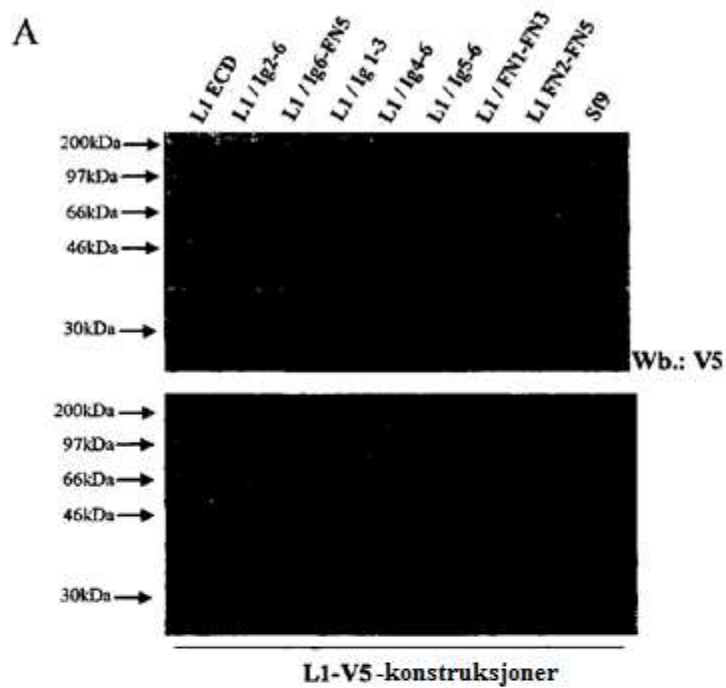


C

Figur 5

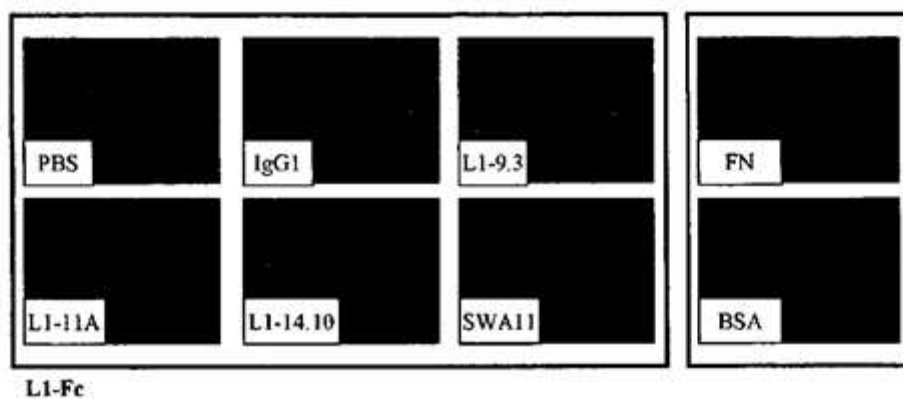


Figur 6

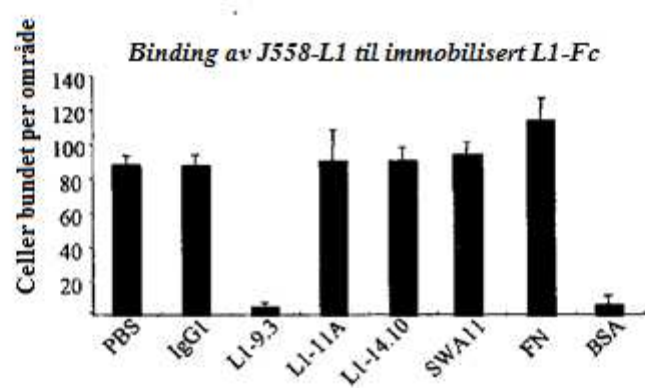


Figur 7

A



B



Figur 9**a)****L1_9.3 scFv**

DIQMTQTSSLSAFLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTI
 SNLEQEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGKLEIKRTSGPGDGGKGGPGKGPGEETKGTGPGGQVQLQQPGAELVKS
 GASVNLSCRASGYTFTRYWMLWVRQRPNGLEWVGEINPRNDRNTYNEKFKTKATLTVDSSSTAYMQLTSLTSE
 DSAVYFCALGGGYAMDYWGQGTSTVTVSS

b)**L1_9.3Hu**

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTI
 SSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGKLEIKRTSGPGDGGKGGPGKGPGEETKGTGPGGEVQLVQSGGGLVQS
 GGSRLRLSCRASGYTFTRYWMLWVRQRPNGLEWVGEINPRNDRNTYNEKFKTRFTISVDRSKNTAYLQMDSLRAE
 DTAVYFCALGGGYAMDYWGQGTSTVTVSS

c)**L1_9.3Hu3**

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTI
 SSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGKLEIKRTSGPGDGGKGGPGKGPGEETKGTGPGGEVQLVQSGGGLVQS
 GGSRLRLSCRASGYTFTRYWMLWVRQRPNGLEWVAEINPRNDRNTYNEKFKTRFTISVDRSKNTLYLQMDSLRAE
 DTAVYFCALGGGYAMDYWGQGTSTVTVSS

Figur 10

a)

L1-9.3 murint eneltkjedeantistoff

```

      NdeI
1  ACATATGAAA TACCTATTGC CTACGGGCAGC CGCTGGATTG TTATTACTCG
   TGTATACITT ATGGATAACG GATGCCGTCG GCGACCTAAC AATAATGAGC
      SfiI
      NcoI
51  CGGCCCGAGC GGCATGGCC GATATTGAGA TGACCCAGAC CACGAGCAGC
   GCGGGGTCCG CCGGTACCGG CTATAAGTC7 ACTGGGTCTG GTGCTGCTCG
   L S A F L G D R V T I S C R A S Q
101 CTGAGCGCGT TTCTGGGCGA TCGTGTGACC ATTAGCTGCC GTGGGAGCCA
   GACTCGCGCA AAGACCCGCT AGCACACTGG TAATCGAGCG CACGCTCGGT
   D I S N Y L N W Y Q Q K F D G T V
151 GGATATTAGC AACTATCTGA ACTGGTATCA GCAGAAACCG GATGGCACCG
   CCTATAATCG TTGATAGACT TGACCATAGT CGTCTTTGGC CTACCGTGGC
   K L L I Y Y T S R L H S G V P S
201 TGAACCTGCT GATTATTAT ACCAGCCGTC TGCCATAGCG GTGCCGAGC
   ACTTTGACGA CTAAATAATA TGGTCGGCAG ACGTATCGCC ACACCGCTCG
   R F S G S G S G T D Y S L T I S N
251 CGTTTATAGC GCAGCGGTAG CCGCACCGAT TATAGCTCA CCATTTCTAA
   GCAAAATCGC CGTGGCCATC GCGCTGGCTA ATATCGGACT GGTAAAGATT
   L E Q E D F A T Y F C Q Q G N T L
301 CCGTGAACAG GAAGATTTTG CGACCTATTT TTGCCAGCAG GGCAGACCG
   GACCTTGTG CTCTAAAC GCTGGATAAA AACGTCGTC CCGTTGTGCG
   P W T F G G G T K L E I K R T S
351 TGCCGTGAGC CTTTGGCGGT GGCACCAAC TGAATATTAA ACGTACTAGT
   ACGGCACTCG GAAACGCCA CCGTGCTTG ACGTTAATT TGCATGATCA
   G P G D G G K G G P G K G P G G E
401 GGTCCGGCGC ATGCGGTAA AGCGCGTCCG GGCAGAGGTC CCGTGGCGCA
   CCAGGCCGCG TACCGCCATT TCCGCCAGGC CCGTTTCAG GCGCACCGCT
      SmaI
      XmaI
      AuaI
      PstI
451 AGGCACAAA GGCCTGSGC CCGGGGGTCA GGTTCAGCTG CAGCAGCCGG
   TCCGTGGITT CCGTGACCG GCGCCCGAGT CCAAGTCGAC GTCGTCGGCC
   A E L V K S G A S V N L S C R A
501 GTCCGGAAGT GGTGAAAGC GCGCGGAGCG TGAACCTGAG CTCTCCTCGC
   CACGCTTGA CCACTTTTCG CCGCGCTCGC ACTTGGACTC GACAGCAGCG
   S G Y T F T R Y W M L W V R Q R P
551 AGCGGCTATA CCTTACCG TTATTGGATG CTGTGGGTGC GTCAGCGTCC
   TCGCCGATAT GGAATGSGC AATAACCTAC GACACCCAGC CAGTCCGAGG
   G H G L E W V G E I N P R N D R T
601 GGGCCAGCGC CTGGATSGG TGGGCGAAAT TAATCCGCGT AACGATCGTA
   CCGCGTCCG GACCTTACCC ACCCGCTTTA ATTAGCGGCA TTCTAGCAT
   N Y N E K F K T K A T L T V D R
651 CCAACTATAA CGAAAAATC AAAACCAAAG CGACCCGTAC CCGTGCATCGT
   GGTGATATT GCTTTTAAAG TTTTGGTTTC CCGGGGACTG GCACCTAGCA
   S S S T A Y M Q L T S L T S E D S
701 AGCAGCAGCA CCGCGTATAT GCAGCTGAGC AGCCTGACCT CTGAAGATAG
   TCGTGTGCTG GCGCATATA CGTCGACTGC TCGGACTGGA GACTTCTATC
      BshII
751 A V Y F C A L G G G Y A M D Y W G
   CGCGGTGTAT TTCTCGCGCG TGGCGCGTGG CTATGCGATG GATTATTGGG
   GCGCCACATA AAGACGCGCG ACCCGCCAGC GATAGGCTAC CTAAATACCC
      NotI
801 Q G T S V T V S S G G A A A A P
   GCCAGGGCAC CAGCGTTACC GTGAGCAGCG GCGGTGCGGC CGCTGCACCA
   CGGTCCCGTG GTCGCAATGG CACTCGTCGC CCGCACCGCG CCGACGTGGT
   S V F I F P P S D E Q L K S G T A
851 TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC
   AGACAGAAGT AGAAGGCGCG TAGACTACTC GTCRACTTTA GACCTTGAGC
   S V V C L L N N F Y P R E A K V Q
901 CTCTGTGTGT TGCTGTCTGA ATAATTCTA TCCAGAGAG GCCAAGTAC
   GAGACACAC ACCGACGACT TATTGAGCAT AGGCTCTCTC CCGTTTCATG
   W K V D N A L Q S G N S Q E S V

```

Figur 10 a) forts.

```

951 AGTGGAGGGT GGATAACGCC CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTGTG
   TCACCTTCCA CCTATTGCGG GAGGTTAGCC CAT7GAGGGT CTTCTCACAG

```

```

      T E Q D S K D S T Y S L S S T L T .
1001 ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACTAC AGCCTCAGCA GCACCCTGAC
      TGTCTCGTCC TGTGTTCCCT GTCGTGGATG TCGGAGTCGT CGTGGGACTG
      · L S K A D Y E K H K V Y A C E V T ·
1051 GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC TGCGAAGTCA
      CGACTCGTTT CGTCTGATGC TCTTTGTGTT TCAGATGCGG ACGCTTCAGT
      · H Q G L S S P V T K S F N R G E
1101 CCCATCAGGG CCTGAGTTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CCGCGGAGAG
      GGGTAGTCCC GGA CTCAAGC GGGCAGTGT TCTCGAAGT GGC GCCTCTC
      S H H H H H H * *
1151 TCACACCACC ACCACCACCA CTAGTAAT
      AGTGTGGTGG TGGTGGTGGT GATCATT

```

Figur 10

b)

L1-9.3Hu humanisert enkeltkjedeantistoff

NdeI
 M K Y L L P T A A A G L L L L A
 1 ACATATGAAA TACCTATTGC CTACCGCAGC CGCTGGATTG TTATTACTCG
 TGTATACCTT ATGGATAMCG GATGCCGTCG GCGACCTAAG AATAATGAGC
 SfiI

NcoI
 A Q P A N A D I Q M T Q S P S S
 51 CGGCCCCAGCC GGCATGCCC GATATTGAGA TGACCCAGAG CCGAGCAGC
 GCGGGGTCCG CCGGTACCGG CTATAAGTCT ACTGGGTCTC GGGCTCGTCG
 L S A S V G D R V T I T C R A S Q
 101 CTGAGCCCGA GCGTGGGTGA TCGTGTGACC ATTACCTGCC GTGCGAGCCA
 GACTCGCGCT CGCACCCACT AGCACACTGG TAATGGACGG CACGCTCGGT
 D I S N Y L N W Y Q Q K P G K A P
 151 GGATATTAGC AACTATCTGA ACTGGTATCA GCAGAAACCG GCGAAAGCGC
 CCTATAATCG TTGATAGACT TGACCATAGT CGTCTTTGGC CCGTTTCGGC
 K L L I Y Y T S R L H S G V P S
 201 CGAACTGCT GATTTATTAT ACCAGCCGTC TGCATAGCGG TGTGCCGAGC
 GCTTTGACCA CTAAATAATA TGGTCGGCAG ACCTATCGCC ACACGGCTCG
 R F S G S C S G T D Y T F T I S S
 251 CGTTTTAGCG GCAGCGGTAG CCGCACCGAT TATACCTTTA CCATTAGCAG
 GCAAAATCGC CGTCGCCATC GCGTGGCTA ATATGGAAAT GGTAAATCGTC
 PstI
 L O P E D F A T Y F C Q Q G N T L
 301 CCTGCAGCCG GAAGATTTTG CGACCTATTT TTGCCAGCAG GCGAACACCG
 CGACGTCGCC CTTCATAAAC GCTGGATAAA AACGGTCGTC CCGTTGTGGC
 P W T F G G G T K L E I K R T S
 351 TGGCTGGGAC CTTTGGCGGT GGCACCAAAC TGGAAATTAA ACCTACTAGT
 ACGGCACTCG GAAACGCCCA CCGTGGTTTG ACCTTTAATT TGCATGATCA
 G P G D G G K G G P G K G P G G E
 401 GGTCCGGCGG ATGGCGGTAA AGGCGGTCCG GCGAAAGGTC CCGGTGGCGA
 CCAGGCCCGC TACCGCCATT TCCGCCAGGC CCGTTTCCAG GCGCACCGCT
 SmaI
 XmaI
 AuaI
 G T N G T G P G G E V Q L V Q S G
 451 AGCACCAAAA GGCACCTGGC CCGGGGGTGA AGTTCAGCTG GTGCAGAGCG
 TCGGTGGTTT CCGTGACCCG GCGCCCACT TCAAGTCGAC CACGCTCGCC
 G G L V Q S G G S L R L S C R A
 501 GCGGTGGTCT GGTTCAGAGC GGTGGCAGCC TGGCTCTGAG CTGCTCGTGG
 CGCCACCCAGA CCAAGTCTCG CCACCGTCGG ACGCAGACTC GACAGCAGCG
 S G Y T F T R Y W M L N V R Q R P
 551 AGCGGCTATA CCTCACCCG TTATTGGATG CTGTGGGTGC GTCAGCGTCC
 TCGCCGATAT GGAAGTGGGC AATAAECTAC GACACCCAGC CAGTCCGAGG
 G H G L E W V G E I N E R N D R T
 601 GGGCCACGGC CTGCAATGGG TGGCGCAAAAT TAATCCCGCT AACCATCGTA
 CCGGTGCGCG GACCTTACCC ACCCGCTTTA ATTAGGCGCA TTGCTAGCAT
 N Y N E K F K T R F T I S V D A
 651 CCAACTATAA CAAAAAATTT AAACCCCGCT TCACCATTAG CCGTGGATCGT
 GGTGTATATT GCTTTTAAAT TTTTGGGCGA AGTGGTAATC GCACCTAGCA
 PstI
 S K S T A Y L Q N D S L R A E D T
 701 AGCAAAAGCA CCGCGTATCT GCAGATGGAT AGCCTGGGTG CGGAAGATAC
 TCGTTTTCTG GCGCATAGA CGTCTACCTA TCGGACGAC GCTTCTATG
 BssHII
 A V Y F C A L G G G Y A M D Y W G
 751 CCGGGTGTAT TTTTGGCGCG TGGCGGTGG CTATGCGATG GATTATTGGG
 GCGCCACATA AAACGCGCGC ACCCGCCACC GATACGCTAC CTAATAACCC
 NotI
 Q G T L V T V S S G G A A A A P
 801 GCCAGGGCAC CCTGGTTACC GTGAGCAGCG GCGGTGGGGC CGCTGCACCA
 CCGTCCCGTG GGACCAATGG CACTCGTCGC CGCCACGCGG GCGACGTGGT
 S V F I E P P S D E O L K S G T A
 851 TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAACCTG

Figur 10 b) forts.

AGACAGAAGT AGAAGGGCGG TAGACTACTC GTCAACTTTA GACCTTGACG
 S V V C L L N N F Y P R E A K V Q

```

901 CTCTGTTGTG TGCCTGCTGA ATAACCTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC
GAGACAACAC ACGGACGACT TATTGAAGAT AGGGTCTCTC CGGTTTCATG
· W K V D N A L Q S G N S Q E S V
951 AGTGGAGAGT GGATAACGCC CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTGTC
TCACCTTCCA CCTATTGCGG GAGGTTAGCC CATTGAGGGT CCTCTCACAG
T E Q D S K D S T Y S L S S T L T ·
1001 ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC AGCCTCAGCA GCACCTGAC
TGTCTCGTCC TGTCTGTCCT GTCGTGGATG TCGGAGTCGT CGTGGGACTG
· L S K A D Y E K H K V Y A C E V T ·
1051 GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC TCGGAAGTCA
CGACTCGTTT CGTCTGATGC TCTTTGTGTT TCAGATGCGG ACGCTTCAGT
· H Q G L S S P V T K S F N R G E
1101 CCCATCAGGG CCTGAGTTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CCGCGGAGAG
GGGTAGTCCC GGACTCAAGC GGGCAGTGTT TCTCGAAGTT GCGGCTCTC
S H H H H H H * *
1151 TCACACCACC ACCACCACCA CTAGTAATT
AGTGTGGTGG TGGTGGTGGT GATCATTAA

```

Figur 10

c)

L1-9.3Hu3 humanisert enkeltkjedeantistoff

```

      NdeI
      M K Y L L P T A A A G L L L L A
1  ACATATGAAA TACCTATTGC CTACGGCAGC CGCTGGATTG TTATTACTCG
   TGTATACTTT ATGGATAACG GATGCCGTGG GCGACCTAAC AATAATGAGC
      SfiI
      A Q P A M A D I Q M T G S P S S
51 CGGCCAGGCC GGCCATGGCC GATATTGAGA TGACCCAGAG CCCGAGCAGC
   GCGGGTCCGG CCGGTACGGG CTATAGTCT ACTGGGTCTC GGGCTCGTCC
   L S A S V G D R V T I T C R A S Q
101 CTGAGCGCGA GCGTGGGTGA TCGTGTGACC ATTACCTGDC GTGGAGCCCA
   GACTCGCGCT CGACCCCACT AGCACACTGG TAATGGAGCG CACGCTCGGT
   D I S N Y L N M Y Q Q K P G K A P
151 GGATATTAGC AACTATCTGA ACTGGTATCA GCAGAAACCG GCGAAGCGC
   CCTATAATCG TTGATAGACT TGACCATAGT CGCTTTTGGC CCGTTTCGGG
   K L L I Y Y T S R L H S G V P S
201 CGAACTGGCT GATTATTAT ACCAGCCGVC TGCATAGCGG TGTGCCGAGC
   GCTTTGACGA CTAATAATA TGGTGGGAG ACGTATCGCC ACAGGCTCG
   R F S G S G S G T D Y T L T I S S
251 CTTTTAGCG CGACGGGTAG CGGCACCGAT TATACCTGA CCATTAGCAG
   GCAAAATCGC CGTCGCCATC GCGTGGGTA ATATGGGACT GGTAAATCGTC
      PstI
      I Q P E D F A T Y F C Q Q G N T L
301 CTTGACGCGG GAAGATTITG CGACCTATTT TTGCCAGCAG GCGAACACGC
   GGACGTCCGC CTTCTAAAAC GCTGGATAAA AACGGTCCGC CCGTGTGCGG
   P N T F G G G T K L E I K R T S
351 TGCCGTGGAC CTTTGGCGGT GGCACCAAAAC TGGAAATTAA ACGTACTAGT
   ACGGCACCTG GAAACCGGCA CCGTGGTTTG ACCTTTAATT TGCTATGATCA
   G P G D G G K G G P G K G P G G S
401 GGTCCGGGCG ATGGCGGTAA AGCGGTCGG GCGAAAGGTC CCGGTGGCGA
   CGAGGCCGCG TACCGCCATT TCGCCACGCG CCGTTTCGAG GCGCACCGGT
      SmaI
      XbaI
      Aval
      G T K G T G P G G E V Q L V Q S G
451 AGGCACCAAA GGCCTGGGC CCGGGGTGA AGTTCAGCTG GTGCAGAGCG
   TCGGTGGTTT CCGTGACCGG GCGCCCACT TCAAGTCGAC CACGTCTCGC
   G G L V Q S G G S L R L S C R A
501 GCGGTGGTCT GGTTCAGAGC GGTGGCAGCC TGGCTCIGAG CTGTCTGTGG
   CGCCACGAGA CCAAGTCTCG CCACCGTCGG ACCGAGACTC GACAGCAGCG
   S G Y T F T R Y W M L W V R Q R P
551 AGCGGCTATA CCTTACCGG TTATTGGATG CTGTGGGTGC GTCAGCGTCC
   TCGCCGATAT GGAANTGGG AATAACCTAC GACACCCAGC CAGTCCGAGG
   G K G L E W V A E I N P R N D R T
601 GGGTAAGGC CTGGAATGGG TGGCGGAAT TAATCCCGT AACGATCGTA
   CCCATTTCCG GACCTTACCC ACCGCCITTA ATTAGGCGCA TTGCTAGCAT
   N Y N E K F F T R F T I S V D R
651 CCAACTATAA CGAAAAATTT AAAACCGGCT TCACCATTAG CGTGGATCGT
   GGTGATATT GCITTTTAAA TTTTGGGCGA AGTGGTAATC GCACCTAGCA
      PstI
      S K N T L Y L Q M D S L R A E D T
701 AGCAAAACAA CCCTGTATCT GCAGATGGAT AGCCTGGGTG CGGAAGATAC
   TCGTTTTTGT GGGACATAGA CGTCTACCTA TCGGACGAC GCCTTCTATG
      BssHII
      A V Y F C A L G G G Y A M D Y W G
751 CGCGGTGTAT TTTTGGCGGC TGGCGGCTGG CTATGCGATG GATTATTGGG
   GCGCCACATA AAAACGCGCG ACCCGCCACC GATACGCTAC CTAAATACCC
      NotI
      Q G T L V T V S S G A A A A P
801 GCCAGGGCAC CCGTGTATCC GTGAGCAGCG GCGTGGCGG CGCTGCACCA

```

Figur 10 c) forts.

```

CGGTCCCGTG GGACCAATGG CACTCGTCCG CGCCACGCGG GCGACGTGGT
S V F I F P P S D E Q L K S G T A

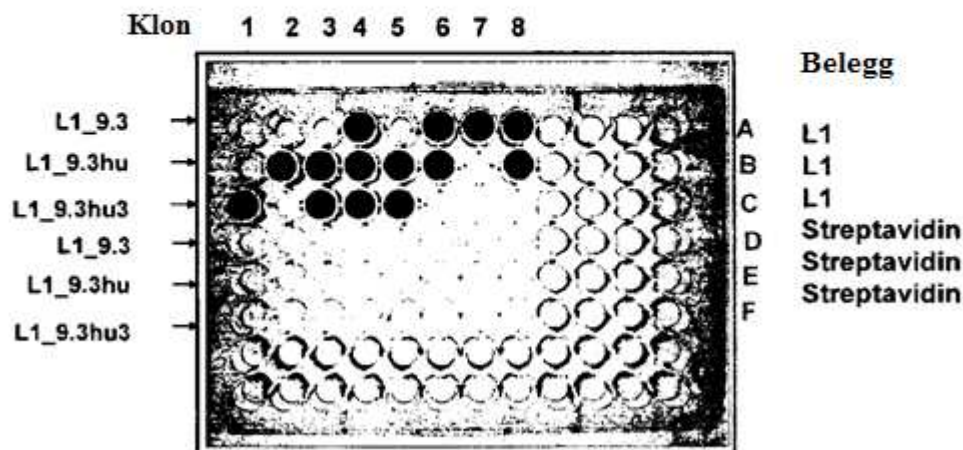
```

```

851 TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC
    AGACAGAAGT AGAAGGGCGG TAGACTACTC GTCAACTTTA GACCTTGACG
    · S V V C L L N N F Y P R E A K V Q ·
901 CTCTGTTGTG TGCCTGCTGA ATAACTTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC
    GAGACAACAC ACGGACGACT TATTGAAGAT AGGGTCTCTC CGGTTTCATG
    · W K V D N A L Q S G N S Q E S V ·
951 AGTGAAGGT GGATAACGCC CTCCAATCGG GTAATCCCA GGAGAGTGTG
    TCACCTTCCA CCTATTGCGG GAGGTAGCC CATTGAGGGT CCTCTCACAG
    T E Q D S K D S T Y S L S S T L T ·
1001 ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC AGCCTCAGCA GCACCCGTGAC
    TGTCTCGTCC TGTCGTTCCT GTCGTGGATG TCGGAGTCGT CGTGGGACTG
    · L S K A D Y E K H K V Y A C E V T ·
1051 GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC TGCGAAGTCA
    CGACTCGTTT CGTCTGATGC TCTTTGTGTT TCAGATGCGG ACGCTTCAGT
    · H Q G L S S P V T K S F N R G E ·
1101 CCCATCAGGG CCTGAGTTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CCGCGGAGAG
    GGGTAGTCCC GGACTCAAGC GGGCAGTGT TCTCGAAGTT GGCGCCTCTC
    S H H H H H H * *
1151 TCACACCACC ACCACCACCA CTAGTAATT
    AGTGTGGTGG TGGTGGTGGT GATCATTAA

```

Figur 11



Figur 12

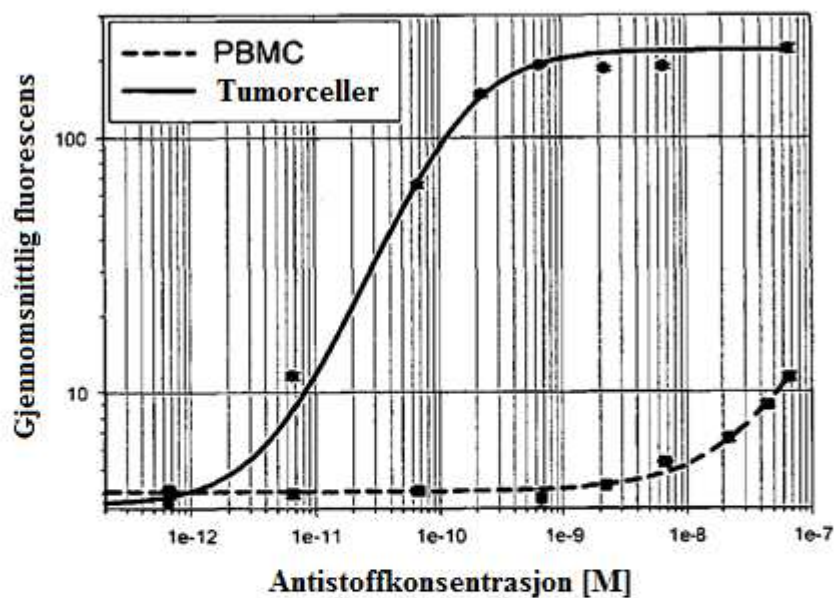
a)

GAAGAGTTAGCCTTGCAGCTGTGCTCAGCCCTAAATAGTTCCCAAAAATTTGCATGCTCTCACTTC
 CTATCTTTGGGTACTTTTTTCATATACCAGTCAGATTGTGAGCCATTGTAATTGAAGTCAAGACTCA
 GCCTGGACATGATGTCTCTGCTCAGTTCTCTGGTCTCCTGTTGCTCTGTCTTCAAGGTAAAAGT
 TACTACAATGGGAATTTTGTGTTGCACAGTGATTCTTGTGACTGGAATTTTGGAGGGGTCTTTT
 CTTTTCTGCTTAACTCTGTGGGTATTTATTGTGTCTCCACTCCTAGGTACCAGATGTGATATCCA
 GATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTTTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAG
 GGCAAGTCAGGACATTAGCAATTAATTTAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACGTGTTAAA
 CTCCTTATCTATGACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCCTCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGT
 CTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATTTTGCCACTTACTTTTGC
 CAACAGGGTAATACGCTTCCGTGGACATTCTGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGTAAA
 TAGAATCCAAAGTCTCTTTCTTCCGTGTCTATGTCTGTGGCTTCTATGTCTACAAATGATGTAT

b)

TTCAGCATCCTGATTCTGACCCAGGTGTCCCTTCTTCTCCAGCAGGAGTAGGTGCTCATCTAAT
 ATGTATCCTGCTCATGAATATGCAAATCCTCTGAATCTACATGGTAAATGTAGGTTTGTCTATATCA
 CACACAGAAAAACATGAGATCACAGTTCTCTCTACAGTTACTGAACACACAGGACCTCACCATGG
 GATGGAGCTATATCATCTCTTTTTGGTAGCAACAGCTACAGGTAAGGGGCTCACAGTAGAAGG
 CTTGAGGTCTGGCCATATACATGGGTGACAGTGACATCCACTTTGCCTTTCTTCCACAGATGTC
 CACTCCCAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTGGTGAAGTCTGGGGCTTCAGTGAAC
 CTGTCCTGCAGGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGATACTGGATGCTCTGGGTGAGGCAGAGG
 CCTGGACATGGCCTTGAGTGGGTTGGAGAGATTAACTCTGCAACGATCTATCTAATTACAATG
 AGAAATTCAAGACCAAGGCCACACTGACTGTAGACCGATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAAC
 TCACCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCCCTGGGGGGGGGCTATGCTAT
 GGACTATTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCTCTCCAGGTCT
 TAATTTTAACTTTGTTATGGAGTTTTCTGAGCATTGCAGACTAATCTTGGATATTTGTCCCTGAG
 GGAGCCGGCTGAGAGAAGTTGGGAAATAAACTGTCTAGGGATCTCAGAGCCTTAGGACAGATT
 A

Figur 13



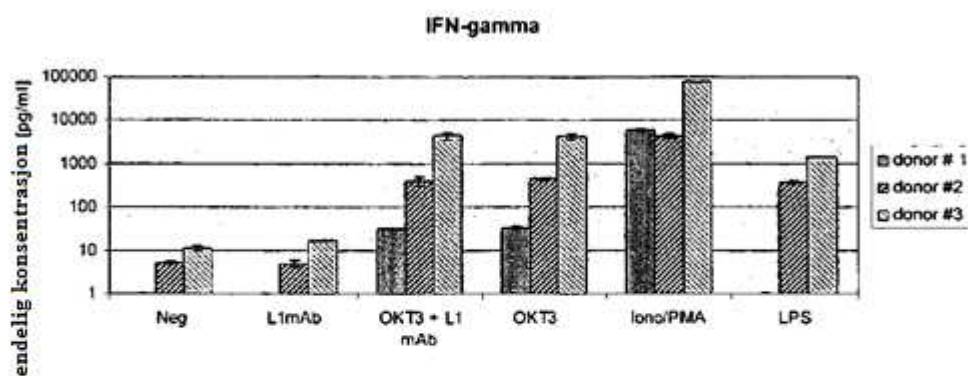
A)

B)

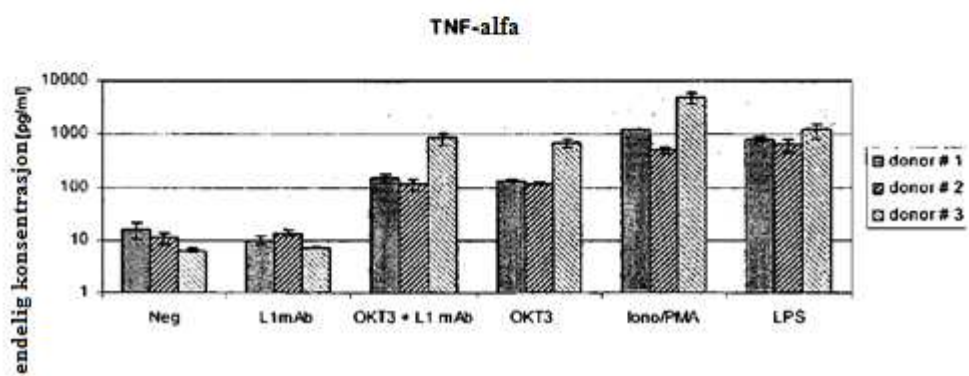
	K_D [M]
Tumor-cell	1×10^{-10}
PBMC (estimert)	$>4 \times 10^{-8}$

Figur 14

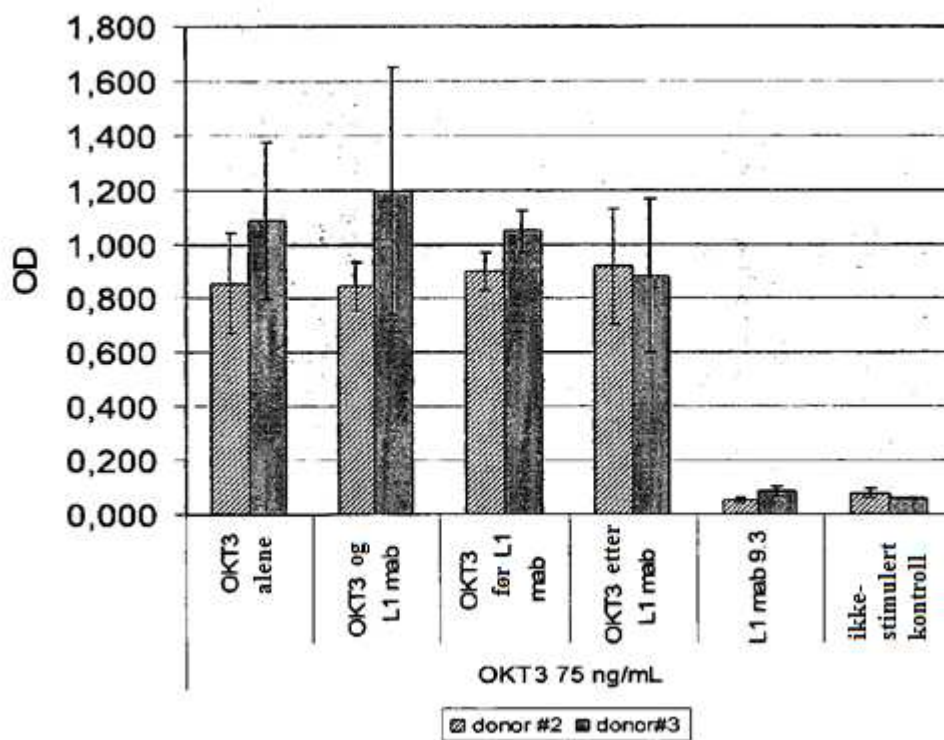
A)



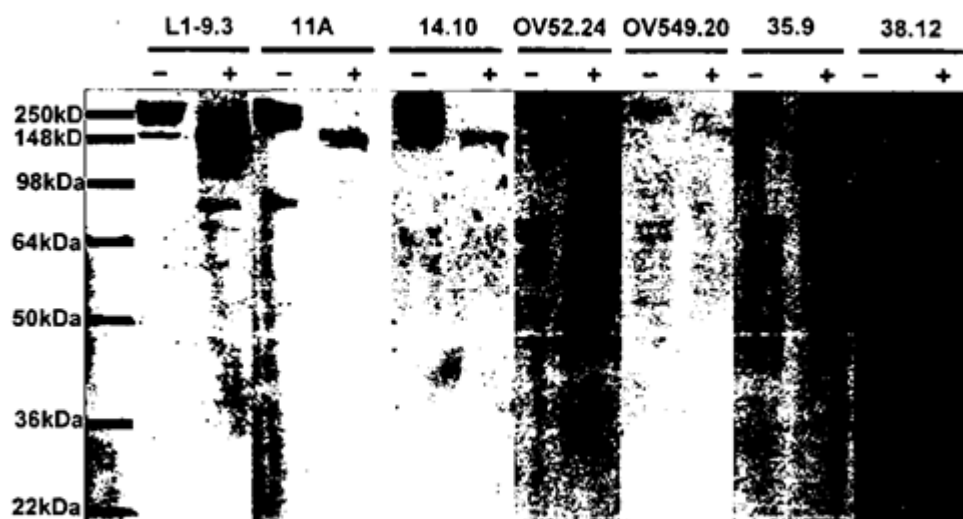
B)



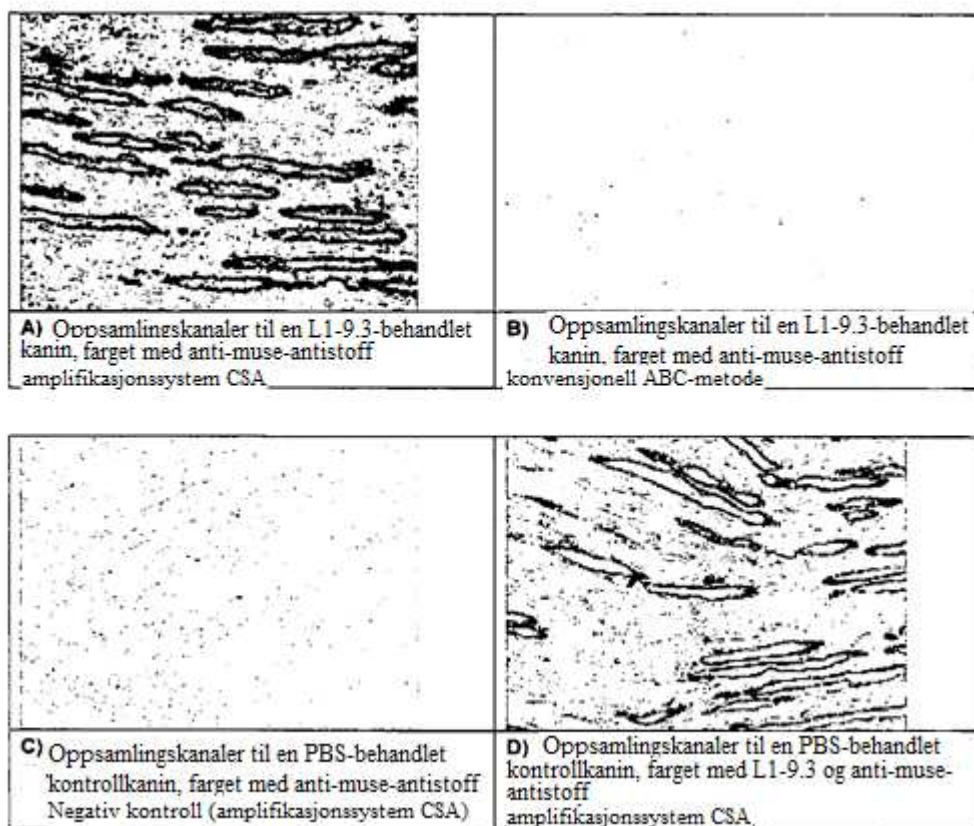
Figur 15



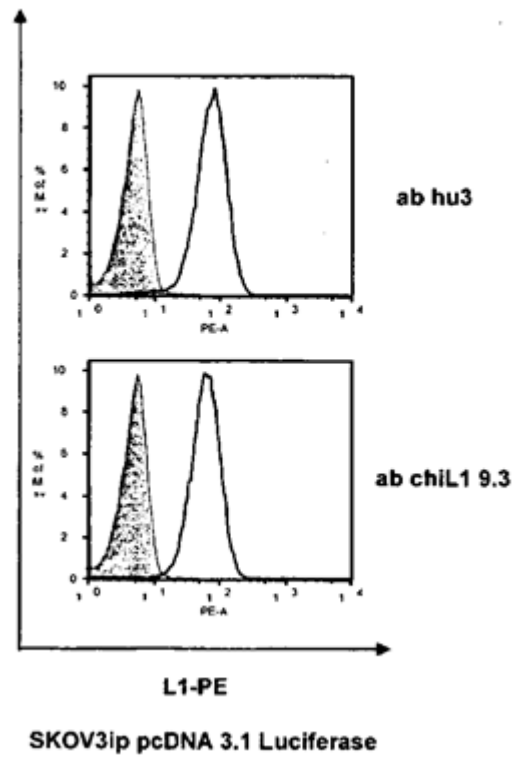
Figur 16



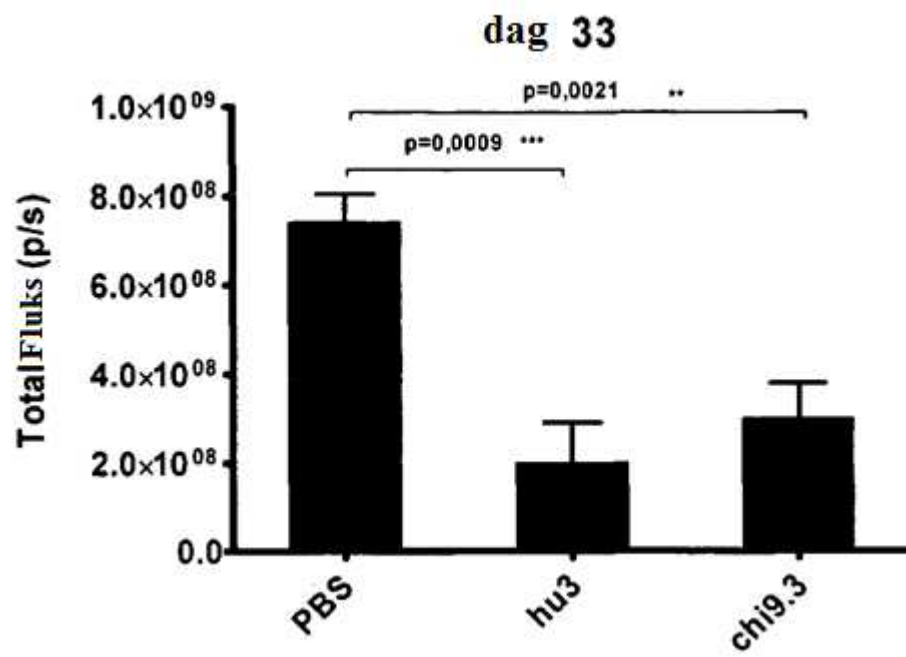
Figur 17



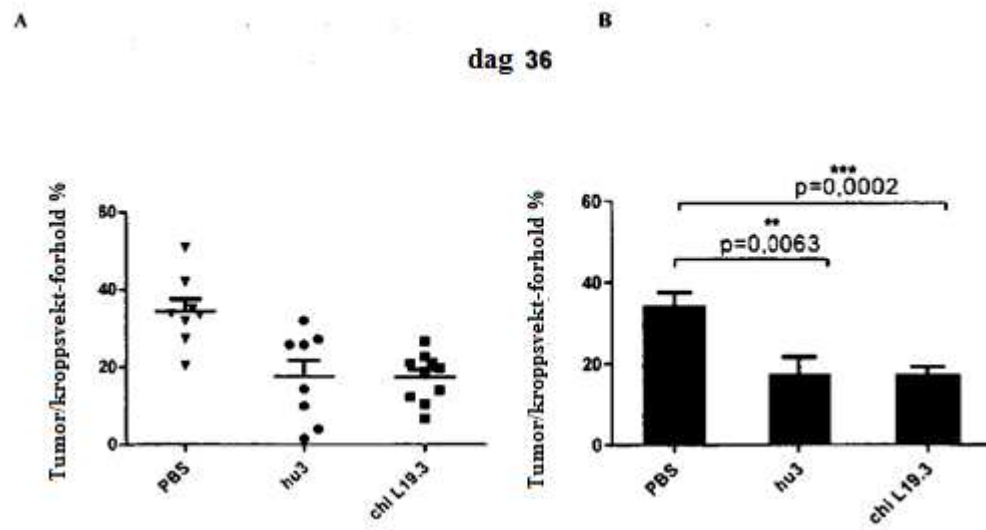
Figur 18



Figur 19

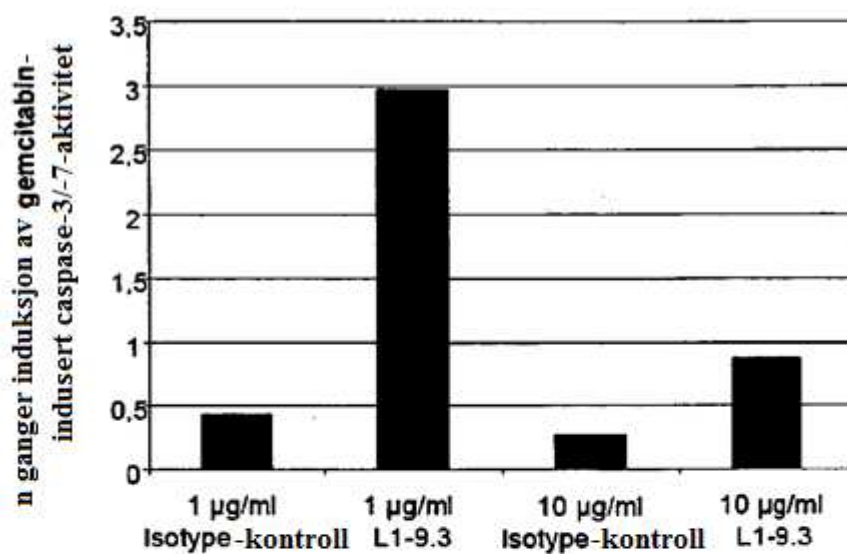


Figur 20



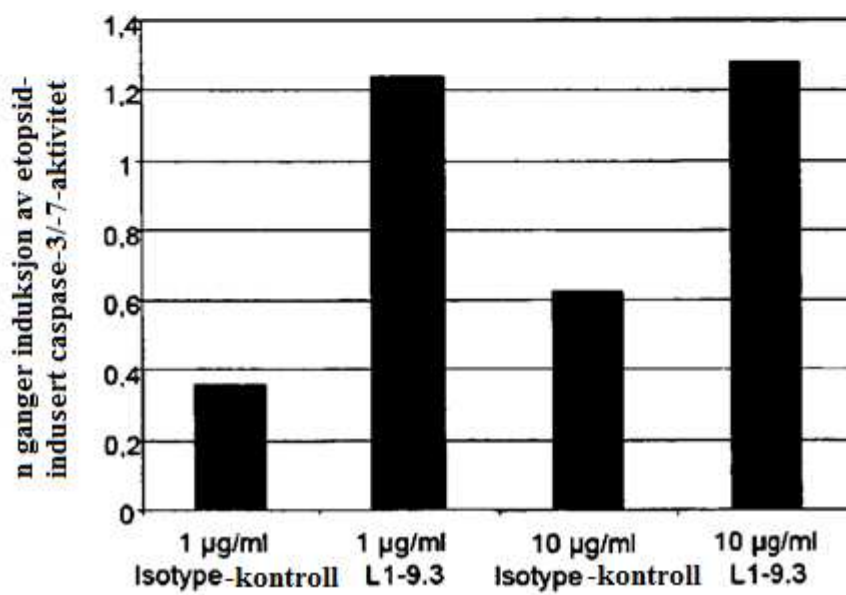
Figur 21 A

Caspase-3/-7-aktivitet:
i PT45res-celler etter stimulering med gemcitabin og L1-9.3-antistoff



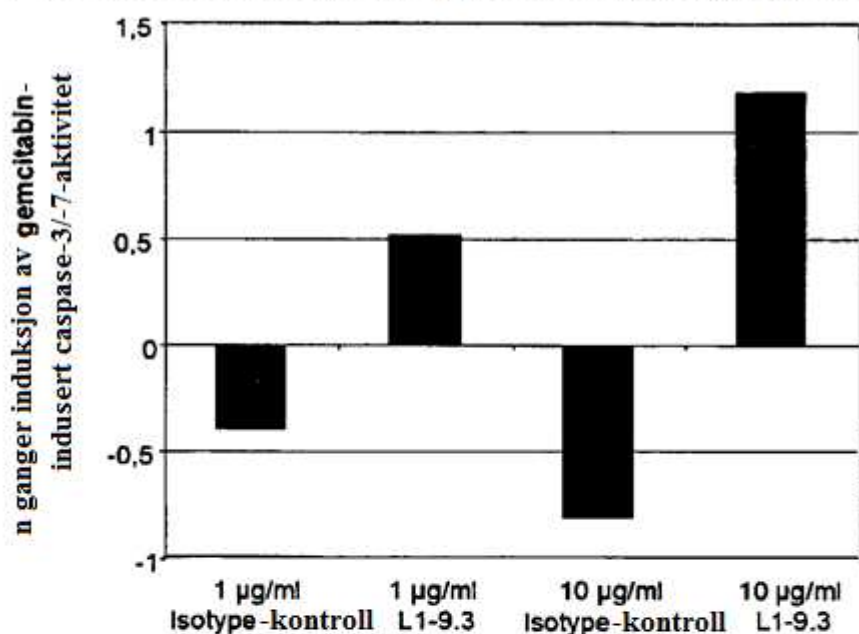
Figur 21 B

Caspase-3/-7-aktivitet:
i PT45res-celler etter stimulering med etoposid og L1-9.3-antistoff



Figur 22 A

Caspase-3/-7-aktivitet:
i Colo357-celler etter stimulering med gemcitabin og L1-9.3-antistoff



Figur 22 B

Caspase-3/-7-aktivitet:
i Colo357-celler etter stimulering med etoposid og L1-9.3-antistoff

