



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2342233 B1**

NORGE

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

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.11.17
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.06.25
(86)	Europeisk søknadsnr	09744645.4
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.10.01
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2011.07.13
(30)	Prioritet	2008.10.01, EP, 08305631 2008.10.01, US, 136772 P 2009.04.29, US, 173743 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK SM TR
	Utpekte samarbeidende stater	AL BA RS
(73)	Innehaver	Pierre Fabre Médicament, 45, Place Abel Gance, 92100 Boulogne-Billancourt, FR-Frankrike
(72)	Oppfinner	KLINGUER-HAMOUR, Christine, 73 route de chez DiossazLes Gottalles, F-74570 Groisy, FR-Frankrike GRENIR-CAUSSANEL, Véronique, 1 rue de la Vie de l'Orme, 01430 Saint Martin du Fresne, FR-Frankrike
(74)	Fullmektig	Onsagers AS, Postboks 1813 Vika, 0123 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Anti-CXCR4-antistoffer og deres anvendelse for behandlingen av kreft
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A-2004/059285 BARIBAUD FREDERIC ET AL: "Antigenically distinct conformations of CXCR4" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 75, no. 19, 1 October 2001 (2001-10-01), pages 8957-8967, XP002234668 ISSN: 0022-538X CARNEC XAVIER ET AL: "Anti-CXCR4 monoclonal antibodies recognizing overlapping epitopes differ significantly in their ability to inhibit entry of human immunodeficiency virus type 1." JOURNAL OF VIROLOGY FEB 2005, vol. 79, no. 3, February 2005 (2005-02), pages 1930-1933, XP002518542 ISSN: 0022-538X "Data sheet of monoclonal antibody MAB173- anti CXCR4" INTERNET CITATION, [Online] XP002458711 Retrieved from the Internet: URL: http://www.rndsystems.com/pdf/mab173.p df > [retrieved on 2007-11-13] REEVES J D ET AL: "The second extracellular loop of CXCR4 is involved in CD4-independent entry of human immunodeficiency virus type 2" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, SPENCERS WOOD, GB, vol. 79, no. 7, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 1793-1799, XP002290004 ISSN: 0022-1317 OTTAIANO ALESSANDRO ET AL: "Inhibitory effects of anti-CXCR4 antibodies on human colon cancer cells" CANCER IMMUNOLOGY AND IMMUNOTHERAPY, SPRINGER-VERLAG, BERLIN, DE, vol. 54, no. 8, 11 December 2004 (2004-12-11), pages 781-791, XP002397864

ISSN: 0340-7004

PERCHERANCIER YANN ET AL: "Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BIRMINGHAM, US, vol. 280, no. 11, 1 March 2005 (2005-03-01), pages 9895-9903, XP002511383 ISSN: 0021-9258 [retrieved on 2005-01-04]

- Foreliggende oppfinnelse vedrører nye antistoffer, spesifikt murine, monoklonale antistoffer, kimære og humaniserte, som er i stand til å binde spesifikt til kjemokinreseptorer (CXCR), i tillegg til amino- og nukleinsyresekvensene som koder for slike antistoffer. Fra ett aspekt vedrører oppfinnelsen nye antistoffer, utledede forbindelser eller funksjonelle fragmenter, som er i stand til å binde spesifikt til CXCR4 og som har sterke antitumor-aktiviteter. Oppfinnelsen omfatter også anvendelsen av slike antistoffer som et legemiddel for den preventive og/eller terapeutiske behandlingen av kreft, i tillegg til i prosedyrene eller settene som er relatert til kreftdiagnostisering. Til slutt omfatter oppfinnelsen sammensetninger som omfatter slike antistoffer i kombinasjon med eller konjugert med andre antikreft-forbindelser, slik som antistoffer, toksiner, cytotoxiske/cytostatiske midler, og anvendelsen av samme til forebyggingen og/eller behandlingen av vise kreftformer.
- Kjemokiner er små, utskilte peptider som kontrollerer migrasjonen av leukocytter langs en kjemisk gradient av ligand, kjent som kjemokingradienten, spesielt i immunreaksjoner (Zlotnick A. et al., 2000). De blir delt i to hoved-underfamilier, CC og CXC, basert på posisjonen til deres NH₂-terminale cysteinrester, og binder til G-proteinkoblede reseptorer, hvis to viktigste underfamilier er betegnet CCR og CXCR. Mer enn 50 humane kjemokiner og 18 kjemokinreseptorer har så langt blitt oppdaget.
- Mange kreftformer har et komplekst kjemokin-nettverk som påvirker immuncelleinfiltreringen av tumor, i tillegg til tumorcellevekst, overlevelse, migrasjon og angiogenese. Immunceller, endotelceller og tumorceller uttrykker selv kjemokinreseptorer og kan respondere på kjemokinggradienter. Studier av humane kreftbiopsiprøver og muse-kreftmodeller viser at kreftcelle-kjemokinreseptor-uttrykking er assosiert med økt metastasekapasitet. Maligne celler fra ulike krefttyper har ulike profiler for kjemokinreseptoruttrykking, men kjemokinreseptor-4 (CXCR4) er den vanligste. Celler fra minst 23 ulike typer humane kreftformer av epitelopphav, mesenchymalopphav og haematopoietisk opphav uttrykker CXCR4-reseptor (Balkwill F. et al., 2004).
- Kjemokinreseptor-4 (også kjent som fusin, CD184, LESTR eller HUMSTR) eksisterer i to isoformer omfattende 352 eller 360 aminosyrer. Rest Asn11 er glykosylert, rest Tyr21 er modifisert ved addisjon av en sulfatgruppe og Cys109 og 186 er bundet med en disulfidbro på den ekstracellulære delen av reseptoren (Juarez J. et al., 2004).
- Denne reseptoren blir uttrykt i ulike typer normalt vev, naive, ikke-hukommelse-T-celler, regulatoriske T-celler, B-celler, nøytrofiler, endotelceller, primære monocytter, dendrittceller, naturlige dreperceller, CD34+ hematopoietiske stamceller og ved et lavt nivå i hjerte, kolon, lever og hjerne. CXCR4 spiller en nøkkelrolle i leukocytraffikking, B-celle-lymfopoiese og –myelopoiese.
- CXCR4-reseptor er overuttrykt i et stort antall kreftformer inkludert men ikke begrenset til kolon (Ottaiano A. et al., 2004), bryst (Kato M. et al., 2003), prostata

(Sun Y.X. et al., 2003), lunge [småcellet og ikke-småcellet karsinom (Phillips R.J. et al., 2003)], ovarial (Scotton C.J. et al., 2002), pankreas (Koshiba T. et al., 2000), nyre, hjerne (Barbero S. et al., 2002), glioblastom og lymfomer.

- Den unike liganden til CXCR4-reseptor som så langt er beskrevet er
- 5 Stromalcelleavledet faktor-1 (SDF-1) eller CXCL12. SDF-1 utskilles i store mengder i lymfeknute, benmarg, lever, lunge og i mindre grad i nyrer, hjerne og hud. CXCR4 gjenkjennes også av et antagonistisk kjemokin, det virale makrofag-inflammatoriske protein-II (vMIP-II) som kodes for av humant herpesvirus type III.
- 10 CXCR4/SDF-1-aksen spiller en nøkkelrolle i kreft og er direkte implisert i migrasjon, invasjon som fører til metastaser. Faktisk uttrykker kreftceller CXCR4-reseptor, de migrerer og går inn i den systemiske sirkulasjonen. Deretter blir kreftceller stoppet i vaskulære leier i organer som produserer høye nivåer av SDF-1 der de prolifererer, induserer angiogenese og danner metastatiske tumorer (Murphy P.M., 2001). Denne aksen er også involvert i celleproliferasjon via aktivering av
- 15 Ekstracellulær-signal-Regulert Kinase (ERK)-veien (Barbero S. et al., 2003) og angiogenese (Romagnani P. 2004). Faktisk fremmer CXCR4-reseptor og dens ligand SDF-1 åpenbart angiogenese ved å stimulere VEGF-A-uttrykking som i sin tur øker uttrykking av CXCR4/SDF-1 (Bachelder R.E. et al., 2002). Det er også kjent at tumorassosierte makrofager (TAM) akkumuleres i hypoksiske områder i
- 20 tumorer og blir stimulert til å samarbeide med tumorceller og fremme angiogenese. Det ble observert at hypoksi oppregulerte selektiv uttrykking av CXCR4 i ulike celletyper inkludert TAM (Mantovani A. et al., 2004). Det har nylig blitt vist at CXCR4/SDF-1-aksen regulerer trafikkeringen/målsøkingen av CXCR4+ hematopoietiske stamceller/forløperceller (HSC) og kan spille en rolle i
- 25 neovaskularisering. Bevis tyder på at ved siden av HSC så blir funksjonelt CXCR4 også uttrykt på stamceller fra andre vev (vevstilknyttede stamceller = TCSC) slik at SDF-1 kan spille en avgjørende rolle i kjemisk lokking av CXCR4+ TCSC'er som er nødvendige for organ-/vevsregenerering men disse TCSC'ene kan også være et cellulært utgangspunkt for kreftutvikling (kreftstamcelleteori). Et stamcelleopphav
- 30 for kreft ble vist for human leukemi og nylig for flere faste tumorer slik som hjerne og bryst. Det finnes flere eksempler på CXCR4+-tumorer som kan ha opphav i normale CXCR4+-vevs-/organspesifikke stamceller slik som leukemier, hjernetumorer, småcellet lungekreft, brystkreft, hepatoblastom, ovarial- og livmorhalskreft (Kucia M. et al., 2005).
- 35 Målsøking av kreftmetastaser ved å interferere med CXCR4-reseptor ble vist in vivo ved å benytte et monoklonalt antistoff rettet mot CXCR4-reseptor (Muller A. et al., 2001). Kort forklart ble det vist at et monoklonalt antistoff rettet mot CXCR4-reseptor (Mab 173 R&D Systems) signifikant minsket antallet lymfeknutemetastaser i en ortotopisk kreftmodell (MDA-MB231) i SCID-mus. At begge funksjoner for
- 40 SDF-1 på HT-29-celler, proliferasjonen og migreringen av HT-29-cellene, kan bli inhibert med et monoklonalt antistoff anti-CXCR4, har også blitt beskrevet (Ding Y.L. et al., Chinese Journal of Surgery, 2009). En annen studie (Phillips R.J. et al.,

- 2003) viste også den avgjørende rollen til SDF-1/CXCR α -aksen i metastaser i en ortotopisk lungekarinom-modell (A549) ved å benytte polyklonale antistoffer mot SDF-1, men i denne studien var det ingen effekt verken tumorvekst eller på angiogenese. Flere andre studier beskrev også inhiberingen av enten metastase in vivo ved å benytte siRNA-duplekser av CXCR4 (Liang Z. et al., 2005) biologisk stabile CXCR4-peptidantagonister (Tamamura H. et al., 2003) eller tumorvekst in vivo ved å benytte småmolekylantagonister av CXCR4 slik som AMD 3100 (Rubin J.B. et al., 2003, DeFalco V. et al., 2007) eller Mab (WO 2004/059285 A2). Slik er CXCR4 et validert terapeutisk mål for kreftformer.
- 10 Kjemokinreseptor-2 (CXCR2), som er en annen kjemokinreseptor, er også beskrevet som et interessant mål i onkologi. Faktisk sender CXCR2 et autokrint cellevekstsignal i flere tumorcelletyper og kan også påvirke tumorvekst indirekte ved å fremme angiogenese (Tanaka T. et al., 2005).
- 15 CXCR2-kjemokinreseptoren omfatter 360 aminosyrer. Den blir uttrykt i endotelceller og spesielt under neovaskularisering. Flere kjemokiner binder CXCR2-reseptor: CXCL5, -6, -7, IL-8, GRO- α , - β og - γ som tilhørere ERL+ pro-angiogene kjemokiner. CXCR2-reseptoren deler sekvenshomologier med CXCR4-reseptoren: 37 % sekvensidentitet og 48 % sekvenshomologi. CXCR2/liganderaksen er involvert i flere tumorvekstmekanismer slik som metastaser (Singh R.K. et al., 1994) celleproliferasjon (Owen J.D. et al., 1997) og i ERL+-kjemokinmediert angiogenese (Strieter R.M. et al., 2004, Romagnani et al., 2004). Til slutt er tumorassosierte makrofager og nøytrofiler nøkkelelementer i inflammatorisk induert tumorvekst og kjemokiner slik som CXCL5, IL-8 og Gro- α setter i gang rekruttering av nøytrofiler.
- 25 Dimerisering har fremkommet som en felles mekanisme for regulering av funksjonen av G-proteinkoblede reseptorer, blant disse er kjemokinreseptorer (Wang J. og Norcross M., 2008). Homo- og heterodimerisering som respons på kjemokinbinding har blitt vist å være nødvendig for igangsettelsen og endringen av signalisering ved et antall kjemokinreseptorer. Voksende mengde bevis understøtter
- 30 konseptet om at reseptordimerer eller oligomerer sannsynligvis er den grunnleggende, funksjonelle enheten for kjemokinreseptorer. Kjemokinreseptordimerer blir funnet i fraværet av ligander og kjemokiner induserer konformasjonsendringer for reseptordimerer, CXCR4 er kjent for å danne homodimerer men også heterodimerer, f.eks. med δ -opioidreseptoren (DOR)
- 35 (Hereld D., 2008) eller CCR2 (Percherancier Y. et al., 2005). I det siste eksemplet inhiberte peptider avledet fra transmembrandomenene på CXCR4 aktivering ved å blokkere de ligandinduserte konformasjonsmessige overgangene til dimeren (Percherancier Y. et al., 2005). En annen studie viste at CXCR4-TM4-peptid, som er et syntetisk peptid i transmembranregionen til CXCR4, minsker energioverføring
- 40 mellom promotere av CXCR4-homodimerer og inhiberer SDF-1-indusert migrasjon og aktin-polymerisering i maligne celler (Wang J. et al., 2006). Senere har det også blitt beskrevet at CXCR7dannet funksjonelle heterodimerer med CXCR4 og

forsterket SDF-1-indusert signalisering (Sierro F. et al., 2007). Andre eksempler på konstitutive heterodimerer inkluderer studier som viser at CXCR1 og CXCR2 interagerer i tillegg til å danne respektive homodimerer. Ingen interaksjoner ble funnet for noen av dem med en annen GPCR (alfa(1A)-adrenoreseptor), noe som

5 indikerer spesifisiteten til interaksjonen mellom CXCR1 og CXCR2 (Wilson S. et al., 2005).

Som tidligere nevnt er CXCR4 og CXCR2 interessante tumormål. Interferering med disse reseptorene bør inhibere tumorvekst og metastaser på en svært effektiv måte, ved å minske tumorcelleproliferasjon, angiogenese, tumorcellemigrasjon og

10 invasjon, nøytrofil- og makrofagrekuttering av tumorer og ved å inhibere CXCR4-kreftstamceller.

Ett av de oppfinneriske aspektene ved foreliggende oppfinnelse er å generere et monoklonalt museantistoff som induserer konformasjonsendringer i CXCR4-dimerer. Oppfinnelsen omfatter et CXCR4-Mab 414H5 (eller fragmenter derav) som

15 er i stand til å binde og indusere konformasjonsendringer i både CXCR4-homodimerer og CXCR4/CXCR2-heterodimerer, og som har sterke antitumor-aktiviteter, både i muse-xenograft- og overlevelsesmodeller. Oppfinnelsen omfatter også en CXCR4-Mab 515H7 (eller fragment derav) som er i stand til å binde og indusere konformasjonsendringer i både CXCR4-homodimerer og CXCR4/CXCR2-

20 heterodimerer, og som har sterke antitumor-aktiviteter. Anti-CXCR4-Mab 414H5 inhiberer tumorvekst i MDA-MB-231-xenograftmodell og øker museoverlevelse i U937-modell. De induserer konformasjonsendringer på CXCR4-homodimerer, men også på CXCR4/CXCR2-heterodimerer. Denne nye egenskapen bør være av interesse for kreftterapianvendelse gitt de viktige rollene for disse to

25 kjemokinreseptorene i kreft.

Målsøking av både homo- og heterodimerene av reseptoren har allerede blitt funnet å øke terapeutisk Mab-effekt. Faktisk har det blitt vist f.eks. at en Mab (h7C19) som er rettet på både IGF-1R og insulin/IGF-1-hybridreseptorer var sterkere i inhibering av tumorvekst in vivo enn en Mab som kun er rettet på IGF-1R (Pandini G., 2007).

30 Videre er anti-CXCR4-Mab'ene 414H5 og 515H7 sovende antagonist for CXCR4, de endrer ikke basalsignal i in vitro-analyser men inhiberer signalisering indusert ved SDF-1 i ulike analyser (GTP γ S-binding, cAMP-frigjøring) og er også i stand til å inhibere SDF-1-indusert tumorcelleproliferasjon og migrering in vitro.

Molekyler som virker som enten partielle agonister eller inverse agonister oppviser

35 iboende aktivitet i fraværet av ligander. Disse typene av molekyler stabiliserer henholdsvis en høyaffinitets- eller en lavaffinitets-GPCR-tilstand, til og med i fravær av ligand, for derved å aktivere eller inhibere nedstrøms signaliseringskaskader (Galandin et al., 2007, Kenakin 2004).

I tilfellet med Mab'ene 414H5 og 515H7 så oppførte disse molekylene som sovende

40 antagonist uten noen iboende aktivitet på CXCR4-reseptor i fraværet av SDF-1. Dette farmakologiske trekket assosieres sannsynligvis med mindre skadelige

- bivirkninger sammenlignet med partielle eller inverse agonister, som allerede observert for opioidreseptorligander (Bosier and Hermans, 2007). Faktisk er den funksjonelle aktiviteten til både 414H5 og 515H7 totalt avhengig av tilstedeværelsen av SDF-1 og ingen modulering av CXCR4-reseptor vil bli
- 5 observert i vev og organer der SDF-1-ligand ikke uttrykkes, utskilt eller tilveiebrakt ved blodstrømmen. Slik er Mab'ene 414H5 og 515H7 sannsynligvis mindre toksiske sammenlignet med VXCX4-reseptorligander med positiv eller negativt virkning. I tillegg er sovende antagonister i mindretall i det farmakologiske universet (Wurch et al., 1999, Kenakin 2004).
- 10 For første gang har oppfinnerne overraskende klart å generere antistoffer som er i stand til å binde til CXCR4 men som også er i stand til å indusere konformasjonsendringer i CXCR4-homodimerene og/eller – heterodimerene. Mer spesifikt er antistoffene ifølge oppfinnelsen i stand til å indusere konformasjonsendringer i CXCR4-homodimerene men også i CXCR4/CXCR2-
- 15 heterodimerene.
- Antistoffer rettet mot CXCR4 var allerede kjent i den kjente teknikken (Carnec et al., J. Virol. 79(3):1930-1933, 2005, Reeves et al., J. Gen. Virol., 79(Pt7):1793-1799, 1998, Ottaiano et al., Cancer Immunol. Immunother., 54(8):781-791, 2005, WO 04/059285). Mer spesifikt har antistoffer med en konformasjonsavhengig binding til
- 20 CXCR4 allerede blitt tilkjennegitt (Baribaud et al., J. Virol., 75(19): 8957-8967, 2001). Imidlertid har ikke disse antistoffene blitt rapportert å være i stand til å indusere en konformasjonsendring i CXCR4-homodimerene og/eller heterodimerene.
- I den følgende beskrivelsen må flertallsuttrykket «CXCR4-dimerer» bli forstått som
- 25 å omfatte CXCR4-homodimerene og også CXCR4/CXCR2-heterodimerene.
- Det påpekes på dette stadiet at slike antistoffer aldri tidligere har blitt beskrevet i den kjente teknikken. Videre må det bli nevnt at eksistensen av CXCR4/CXCR2-heterodimerer aldri har vært beskrevet.
- En del av foreliggende beskrivelse er oppdagelsen av eksistensen av heterodimerer
- 30 dannet av CXCR4 og CXCR2.
- I et spesifikt aspekt er slik et isolert kompleks som omfatter eller består av CXCR4/CXCR2-heterodimeren tilkjennegitt her.
- CXCR4-forbindelse som er del av nevnte CXCR4/CXCR2-heterodimerkompleks er fortrinnsvis én av de to humane isoformene valgt fra gruppen som består av:
- 35 - kjemokin (C-X-C-motiv)-reseptor-4 isoform-b [Homo sapiens] som har sekvensen som vist under Genbank-aksesjonsnummer NP_003458 (SEQ ID nr. 29),
- MEGISIYTS DNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREANANFNKIFLPTIYSIIFLTGI
VGNGLVILVMGYQKKLRSM TDKYRLHLSVADLLFVITLPFWAVDAVAN
40 WYFGNFLCKAVHVIYTVNLYSSVLILAFISLDRYLAIVHATNSQRPRKLLA

EKVYVGVWIPALLLTIPDFIFANVSEADDRYICDRFYPNDLWVVVFQFQ
HIMVGLILPGIVILSCYCHISKLSHSGHQKRKALKTTVILILAFFACWLPY
YIGISIDSFILLEIKQGCEFENTVHKWISITEALAFFHCCLNPILYAFLGAKF
KTSAQHALTSVSRGSSLKILSKGKRGGHSSVSTESESSSFHSS;

5

- kjemokin (C-X-C-motiv)-reseptor-4 isoform-a [Homo sapiens] som har sekvensen gitt under Genbank-aksesjonsnummer NP_001008540 (SEQ ID nr. 30),

10

MSIPLPLLQIYTSDNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREENANFNKIFLPTIYSIIF
LTGIVGNGLVILVMGYQKKLRSMTDKYRLHLSVADLLFVITLPFWAVDA
VANWYFGNFLCKAVHVIYTVNLYSSVLILAFISLDRYLAIVHATNSQRPRK
LLAEKVYVGVWIPALLLTIPDFIFANVSEADDRYICDRFYPNDLWVVVF
QFQHIMVGLILPGIVILSCYCHISKLSHSGHQKRKALKTTVILILAFFACW
LPYYIGISIDSFILLEIKQGCEFENTVHKWISITEALAFFHCCLNPILYAFLG
AKFKTSAQHALTSVSRGSSLKILSKGKRGGHSSVSTESESSSFHSS;

15

- en alternativ transkripsjonsspleisevariant eller en naturlig variant derav som har minst 95 % identitet med én av disse b- eller a-isoformene som har SEQ ID nr. 29 eller 30, og
- et fragment derav som er i stand til å bli spesifikt gjenkjent av sin naturlige ligand stromalcelleavledetfaktor-1 (SDF-1) og som fortrinnsvis har en aminosyrelengde på minst 100, 150 og 200.

20

CXCR2-forbindelsesdel av nevnte CXCR4/CXCR2-heterodimerkompleks er fortrinnsvis valgt fra gruppen som består av:

25

- Interleukin-8-reseptor beta [Homo sapiens] som har sekvensen som er vist under Genbank-aksesjonsnummer NP_001548 (SEQ ID nr. 31),

30

MEDFNMESDSFEDFWKGEDLSNYSYSTLPPFLDAAPEPESLEINKYFV
VIIYALVFLLSLLGNSLVMLVILYSRVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLP
WAASKVNGWIFGTFLCKVVSLLKEVNFYSGILLACISVDRYLAIVHATRT
LTQKRYLVKFICLSIWGLSLLLALPVLLFRRTVYSSNVSPACYEDMGNNNTA
NWRMLLRILPQSFGFIVPLLMFCYGFTLRTLKKAHMGQKHRAMRVIFA
VVLIFLLCWLPYNLVLLADTLMRTQVIQETCERNHIDRALDATEILGILH
SCLNPLIYAFIGQKFRHGLLKILAIHGLISKDSLPKDSRPSFVGSSSGHTSTT
L;

35

- en alternativ transkripsjonsspleisevariant eller en naturlig variant derav som har minst 95 % identitet med denne interleukin-8-reseptor beta som har SEQ ID nr. 31, og
- et fragment derav som er i stand til å bli spesifikt gjenkjent av IL-8 og som fortrinnsvis har en aminosyrelengde på 100, 150 og 200,

I dette spesifikke aspektet er et isolert RNA eller DNA som koder for et polypeptid som omfatter nevnte CXCR4/CXCR2-heterodimerkompleks også tilkjennegitt.

Det er her videre tilkjennegitt en nukleinsyrekonstruksjon, fortrinnsvis en ekspresjonsvektor, slik som et plasmid, som koder for nevnte CXCR4/CXCR2-heterodimerkompleks.

Foreliggende beskrivelse omfatter ytterligere en sammensetning som omfatter minst én nukleinsyrekonstruksjon, fortrinnsvis en ekspresjonsvektor, slik som et plasmid, som koder for delen CXCR4 av CXCR4/CXCR2-heterodimerkompleks, og en andre konstruksjon, fortrinnsvis en ekspresjonsvektor, slik som et plasmid, som koder for delen CXCR2 av nevnte CXCR4/CXCR2-heterodimerkompleks.

I dette aspektet er en fremgangsmåte for fremstilling av en rekombinant vertscelle som uttrykker nevnte CXCR4/CXCR2-heterodimerkompleks tilkjennegitt her, der nevnte fremgangsmåte omfatter et trinn med transformering av nevnte vertscelle:

- a) Med en nukleinsyrekonstruksjon, fortrinnsvis en ekspresjonsvektor, slik som et plasmid, som koder for nevnte CXCR4/CXCR2-heterodimerkompleks, eller
- b) Med minst én nukleinsyrekonstruksjon, fortrinnsvis en ekspresjonsvektor, slik som et plasmid, som koder for delen CXCR4 av nevnte CXCR4/CXCR2-heterodimerkompleks, og en andre konstruksjon, fortrinnsvis en ekspresjonsvektor, slik som et plasmid, som koder for delen CXCR2 av nevnte CXCR4/CXCR2-heterodimerkompleks.

I en foretrukket utførelsesform er nevnte vertscelle en eukaryot celle, slik som en pattedyrscelle.

I en foretrukket utførelsesform koder nukleinsyrekonstruksjonen(e) som koder for nevnte CXCR4/CXCR2-heterodimerkompleks også for en første markør som er assosiert (spesifikt ved kovalent kobling) med CXCR4-sekvensen, slik som luc-markøren, og for en andre markør som er assosiert med (spesifikt ved kovalent kobling) CXCR2-sekvensen, slik som GFP-markøren (dvs., for BRET-analyse).

En fremgangsmåte for valg av en forbindelse som har en antikreftaktivitet eller som kan bli benyttet i fremstillingen av en sammensetning for behandlingen av kreft er også tilkjennegitt, der nevnte fremgangsmåte omfatter trinnene med å:

- a) Kontakte en rekombinant vertscelle som tilkjennegitt her som uttrykker nevnte CXCR4/CXCR2-heterodimerkompleks, med forbindelsen som skal testes, og
- b) Bestemme hvorvidt denne forbindelsen er i stand til å modulere, fortrinnsvis inhibere, aktiviteten til dette CXCR4/CXCR2-heterodimerkomplekset i den rekombinante vertscellen.

I et første aspekt er en gjenstand for foreliggende oppfinnelse en prosess for generering av og seleksjonen av antistoffer ifølge oppfinnelsen.

Mer spesifikt vedrører oppfinnelsen en prosess for seleksjonen av et anti-CXCR4-antistoff, eller ett av dets funksjonelle fragmenter eller derivater, som er i stand til å inhibere både ligandavhengig og liganduavhengig aktivering av CXCR4, der nevnte prosess omfatter de følgende trinnene:

- 5 i) Screening av de genererte antistoffene og seleksjon av antistoffer som er i stand til å binde spesifikt til CXCR4 og også modulere CXCR4-aktivering,
- ii) Teste de valgte antistoffene i trinn i) og velge antistoffer som er i stand til å inducere konformasjonsendring i CXCR4-homodimer, og deretter
- 10 iii) Teste de valgte antistoffene i trinn ii) og velge antistoffer som er i stand til å inducere konformasjonsendring i CXCR4/CXCR2-heterodimerer.

Med uttrykket «å modulere» er det ment en økning eller en inhibering. Fortrinnsvis må de valgte antistoffene ifølge oppfinnelsen inhibere CXCR4-aktiveringen.

- 15 Slik det ble forklart tidligere er induksjonen av konformasjonsendringer i CXCR4-dimerer et viktig aspekt ved oppfinnelsen fordi slike antistoffer vil utgjøre en reell interesse for en større populasjon av pasienter.

- 20 Genereringen av antistoffet kan bli realisert med enhver kjent fremgangsmåte for fagfolk på området, slik som f.eks. fusjon av en myelomcelle med miltceller fra immuniserte mus eller andre arter som er compatible med de valgte myelomcellene [Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497]. De immuniserte dyrene kan inkludere transgene mus med humane immunoglobulinlokus som da direkte produserer humane antistoffer. En annen mulig utførelsesform kan bestå i å benytte phage-display-teknologi for å screene biblioteker.

- 25 Screeningstrinnet i) kan bli realisert ved enhver fremgangsmåte eller prosess som er kjent av en fagmann på området. Som ikke-begrensende eksempler kan det nevnes ELISA, BIAcore, immunhistokjemi, FACS-analyse og funksjonelle screeninger. En foretrukket prosess består i en screening ved FACS-analyse på CXCR4-transfektanter og på minst en tumorcellelinje for å forsikre at de produserte antistoffene også vil være i stand til å gjenkjenne den native reseptoren på
- 30 tumorcellene. Denne prosessen vil bli beskrevet mer presist i de følgende eksemplene.

Med uttrykket «å modulere CXCR4-aktivering» er det ment å modulere minst én av aktiviteten som er avbildet i eksemplene 4, 5, 7 og 13 nedenfor:

Fortrinnsvis for å modulere:

- 35 - Den spesifikke bindingen på cellulære membraner av liganden SDF-1 på reseptoren CXCR4 (se eksempel 4), spesifikt ved konkurranse på eukaryot transformerte cellemembraner, slik som CHO-K1-membraner, som stabilt uttrykker villtype-CXCR4-reseptor,

- Den spesifikke bindingen på cellulære membraner av GTP γ S på reseptoren CXCR4 (se eksemplene 5, 17, 24), spesifikt på eukaryote transformerte cellemembraner, slik som NIH-3T3-celler, som stabilt og konstitutivt uttrykker villtype-CXCR4-membraner,
- 5 - Den CXCR4-medierte inhiberingen av cAMP-produksjon (se eksempel 7), og
- Den CXCR4-reseptormedierte mobiliseringen av intracellulære kalsiumlagre (se eksempel 13).

10 Mer foretrukket er denne moduleringen av minst én av disse aktivitetene en inhibering av aktiviteten.

I en foretrukket utførelsesform av trinnene ii) og iii) for seleksjon av prosessen ifølge oppfinnelsen består nevnte trinn ii) og iii) i å evaluere antistoffer ved hjelp av BRET-analyse på celler som henholdsvis uttrykker CXCR4-RLuc/CXCR4-YFP og CXCR4-RLuc/CXCR2-YFP, og velge antistoffer som er i stand til å inhibere minst
15 40 %, fortrinnsvis 45 %, 50 %, 55 % og mest foretrukket 60 % av BRET-signalet.

BRET-teknologien er en teknologi som er kjent for å være representativ for proteindimeriseringen [Angers et al., PNAS, 2000, 97:3684-89].

BRET-teknologien som benyttes i trinnene ii) og iii) i prosessen er velkjent for fagfolk på området og vil bli beskrevet i detalj i de følgende eksemplene. Mer
20 spesifikt er BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) en ikke-strålende energioverføring som foregår mellom en bioluminiscensdonor (Renilla Luciferase (RLuc)) og en fluorescens-akseptor, en mutant av GFP (Grønt Fluorescerende Protein) eller YFP (Gult fluorescerende protein). I foreliggende tilfelle ble EYFP (forsterket gult fluorescerende protein) benyttet. Virkeevnen til overføringen er
25 avhengig av orienteringen og avstanden mellom donoren og akseptoren. Da kan energioverføring kun forekomme dersom de to molekylerne foreligger nært hverandre (1-10 nm). Denne egenskapen blir benyttet for å generere protein-protein-interaksjonsanalyser. For å kunne studere interaksjonen mellom to partnere er faktisk den første generelt fusjonert til Renilla-luciferasen og den andre til den gule
30 mutanten av GFP. Fusjonsproteiner blir generelt, men ikke obligatorisk, uttrykt i pattedyrceller. I nærvær av det membranpermeable substrat (coelenterazin) sender RLuc ut blått lys. Dersom GFP-mutanten foreligger nærmere enn 10 nm fra RLuc kan en energioverføring forekomme og et ytterligere gult signal kan bli påvist. BRET-signalet blir målt som forholdet mellom lyset som sendes ut fra akseptoren
35 og lyset som sendes ut fra donoren. Slik vil BRET-signalet øke ettersom de to fusjonsproteinene blir brakt nærmere hverandre eller dersom en konformasjonsendring bringer RLuc og GFP-mutant nærmere.

Dersom BRET-analysen består i en foretrukket utførelsesform kan enhver fremgangsmåte som er kjent for fagfolk på området bli benyttet for å måle
40 konformasjonsendring for CXCR4-dimerer. Uten begrensning kan de følgende teknologiene bli nevnt: FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), HTRF

(Homogenous Time resolved Fluorescence), FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) eller SW-FCCS (single wavelength fluorescence cross-correlation spectroscopy).

- 5 Andre klassiske teknologier kan også bli benyttet, slik som ko-immunpresipitering, Alfa-screening, kjemisk kryssbinding, dobbelt-hybrid, affinitetskromatografi, ELISA eller Far-Western-blotting.

I et spesifikt aspekt av prosessen ifølge oppfinnelsen består trinn ii) av å evaluere antistoffer med BRET-analyse på celler som uttrykker både CXCR4-RLuc/CXCR4-YFP og velge antistoffer som er i stand til å inhibere minst 40 % av BRET-signalet.

- 10 I et annet spesifikt aspekt av prosessen ifølge oppfinnelsen består trinn iii) i å evaluere antistoffer med BRET-analyse på celler som uttrykker både CXCR4-RLuc/CXCR3-YFP og velge antistoffer som er i stand til å inhibere minst 40 % av BRET-signalet.

- 15 I et andre aspekt er en gjenstand for oppfinnelsen et isolert antistoff, eller ett av dets funksjonelle fragmenter eller derivater, som blir oppnådd med nevnte prosess. Nevnte antistoff eller ett av dets nevnte fragmenter eller derivater, er i stand til å binde spesifikt til den humane CXCR4 og, dersom nødvendig, er fortrinnsvis i stand til å inhibere den naturlige bindingen av sin ligand, der nevnte antistoff også er i stand til å indusere konformasjonsendringer i CXCR4-dimerer.

- 20 Uttrykket «funksjonelle fragmenter og derivater» vil bli definert i detalj senere i foreliggende beskrivelse.

- Det er på det rene her at beskrivelsen ikke vedrører antistoffene i naturlig form, det vil si de er ikke i sitt naturlige miljø, men at de har blitt isolert eller oppnådd ved rensing fra naturlige kilder, eller ellers oppnådd ved genetisk rekombinasjon, eller
25 ved kjemisk syntese, og at de da kan inneholde ikke-naturlige aminosyrer slik dette vil bli beskrevet senere.

- Ifølge et annet aspekt blir det mer spesifikt beskrevet et antistoff, eller ett av dets funksjonelle fragmenter eller derivater, der nevnte antistoff er kjennetegnet ved at det omfatter minst én komplementaritetsbestemmende region CDR som er valgt fra
30 CDR'er som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID nr. 1 til 12.

Mer foretrukket, ifølge et annet aspekt, så vedrører beskrivelsen et antistoff, eller ett av dets funksjonelle fragmenter eller derivater, nevnte antistoff er kjennetegnet ved at det omfatter minst én komplementaritetsbestemmende region CDR valgt fra CDR'er som omfatter aminosyresekvensene SEQ ID nr. 2, 4 eller 40 til 49.

- 35 Ifølge et første aspekt vedrører beskrivelsen et isolert antistoff, eller en avledet forbindelse eller funksjonelt fragment av samme, som omfatter minst én CDR som er valgt fra blant CDR'ene med sekvensene SEQ ID nr. 1, 2, 3, 4, 5 eller 6 eller minst én CDR hvis sekvens har minst 80 %, fortrinnsvis 85 %, 90 %, 95 % og 98 % identitet etter optimal sammenstilling med sekvensene SEQ ID nr. 1, 2, 3, 4, 5 eller
40 6.

Ifølge et annet aspekt vedrører beskrivelsen et isolert antistoff, eller en avledet forbindelse eller funksjonelt fragment av den samme, som omfatter minst én CDR som er valgt blant CDR'ene ifølge sekvensene SEQ ID nr. 40, 2, 41, 42, 5 eller 43, eller minst én CDR hvis sekvens har minst 80 %, fortrinnsvis 85 %, 90 %, 95 % og 98 % identitet ved optimal sammenstilling med sekvensene SEQ ID nr. 40, 2, 41, 42, 5 eller 43.

Et «funksjonelt» fragment av et antistoff betyr spesifikt et antistofffragment slik som fragmenter Fv, scFv (sc= enkeltkjede), Fab, f(ab')₂, Fab', scFv-Fc eller dialegemer eller ethvert fragment hvis halveringstid har blitt økt. Slike funksjonelle fragmenter vil bli beskrevet i detalj senere i foreliggende beskrivelse.

En «utledet/avledet forbindelse» eller «derivat» av et antistoff betyr spesifikt et bindingsprotein sammensatt av et peptidskjellett og minst én av CDR'ene fra det opprinnelige antistoffet for å kunne opprettholde dens evne til å gjenkjenne CXCR4. Slike avlede/utledede forbindelser som er velkjente for en fagmann på området vil bli beskrevet i mer detalj senere i foreliggende beskrivelse.

Mer foretrukket omfatter oppfinnelsen antistoffene, funksjonelle fragmenter, ifølge foreliggende oppfinnelse, det vil si kimære eller humaniserte, som er oppnådd ved genetisk rekombinasjon eller kjemisk syntese.

Ifølge en foretrukket utførelsesform er antistoffet ifølge oppfinnelsen, eller dets avledede forbindelser eller funksjonelle fragmenter, kjennetegnet ved at det består av et monoklonalt antistoff.

«Monoklonalt antistoff» er forstått å skulle bety et antistoff som fremkommer fra en nesten homogen antistoffpopulasjon. Mer spesifikt er de individuelle antistoffene i en populasjon identiske bortsett fra noen få mulige naturlig forekommende mutasjoner som kan bli funnet i minimale andeler. Med andre ord består monoklonale antistoffer av et homogent antistoff som fremkommer fra dyrkingen av en enkelt celleklon (f.eks. en hybridoma, en eukaryot vertscelle transfektert med et DNA-molekyl som koder for det homogene antistoffet, en prokaryot vertscelle transfektert med et DNA-molekyl som koder for det homogene antistoffet, osv.) og er generelt kjennetegnet ved tungkjeder fra én og kun én klasse og underklasse, og lettkjeder av kun én type. Monoklonale antistoffer er svært spesifikke og er rettet mot et enkelt antigen. I tillegg, i motsetning til preparater med polyklonale antistoffer som typisk inkluderer ulike antistoffer rettet mot ulike determinanter, eller epitoper, så er hvert monoklonale antistoff rettet mot en enkelt epitop eller antigen.

Mer spesifikt er antistoffet, eller dets utlede forbindelser eller funksjonelle fragmenter, kjennetegnet ved at det omfatter en lettkjede som omfatter minst én CDR valgt blant CDR'ene med aminosyresekvenser ifølge SEQ ID nr. 2 eller 3, eller minst én CDR hvis sekvens har minst 80 %, fortrinnsvis 85 %, 90 %, 95 % og 98 % identitet etter optimal sammenstilling med sekvensene ifølge SEQ ID nr. 2 eller 3, eller det omfatter en tungkjede som omfatter minst én CDR valgt blant

CDR'ene med aminosyresekvensene SEQ ID nr. 4, 5 eller 6, eller minst én CDR hvis sekvens har minst 80 %, fortrinnsvis 85 %, 90 %, 95 % og 98 % identitet etter optimal sammenstilling med sekvensene SEQ ID nr. 4, 5 eller 6.

- 5 Ifølge en annen utførelsesform er antistoffene, eller én av deres utledede forbindelser eller funksjonelle fragmenter, kjennetegnet ved at de omfatter en lettkjede som omfatter minst én av de tre CDR'ene med sekvensene SEQ ID nr. 1, 2 eller 3, eller minst én sekvens med minst 80 %, fortrinnsvis 85 %, 90 %, 95 % og 98 % identitet etter optimal sammenstilling med sekvensene SEQ ID nr. 1, 2 eller 3.

- 10 På en foretrukket måte er antistoffene, eller én av deres utledede forbindelser eller funksjonelle fragmenter, kjennetegnet ved at de omfatter en lettkjede som omfatter de følgende tre CDR'ene, henholdsvis CDR-L1, CDR-L2 og CDR-L3, de:

- CDR-L1 omfatter sekvensen SEQ ID nr. 1 eller 9, eller en sekvens med minst 80 % identitet etter optimal sammenstilling med sekvensen SEQ ID nr. 1 eller 9,
- 15 - CDR-L2 omfatter sekvensen SEQ ID nr. 2 eller 10, eller en sekvens med minst 80 % identitet etter optimal sammenstilling med sekvensen 2 eller 10,
- CDR-L3 omfatter sekvensen SEQ ID nr. 3, eller en sekvens med minst 80 % identitet etter optimal sammenstilling med sekvensen SEQ ID nr. 3.

- 20 Ifølge en spesifikk utførelsesform er antistoffene, eller én av deres avledede forbindelser eller funksjonelle fragmenter, kjennetegnet ved at de omfatter en lettkjede som omfatter CDR-L1 med sekvensen SEQ ID nr. 1, CDR-L2 med sekvensen SEQ ID nr. 2 og CDR-L3 med sekvensen SEQ ID nr. 3.

- 25 Ifølge en annen spesifikk utførelsesform er antistoffene, eller én av deres avledede forbindelser eller funksjonelle fragmenter, kjennetegnet ved at de omfatter en lettkjede som omfatter CDR-L1 med sekvensen SEQ ID nr. 9, CDR-L2 med sekvensen SEQ ID nr. 10 og CDR-L3 med sekvensen SEQ ID nr. 3.

- 30 Mer spesifikt er antistoffene, eller én av deres avledede forbindelser eller funksjonelle fragmenter, kjennetegnet ved at de omfatter en tungkjede som omfatter minst én av de tre CDR'ene med sekvensene SEQ ID nr. 4, 5 eller 6, eller minst én sekvens med minst 80 %, fortrinnsvis 85 %, 90 %, 95 % og 98 % identitet etter optimal sammenstilling med sekvensene ifølge SEQ ID nr. 4, 5 eller 6.

Enda mer foretrukket er antistoffene, eller én av deres avledede forbindelser eller funksjonelle fragmenter, kjennetegnet ved at de omfatter en tungkjede som omfatter de følgende tre CDR'ene, henholdsvis CDR-H1, CDR-H2 og CDR-H3, der:

- 35 - CDR-H1 omfatter sekvensen ifølge SEQ ID nr. 4, 7 eller 11 eller en sekvens med minst 80 % identitet etter optimal sammenstilling med sekvensene ifølge SEQ ID nr. 4, 7 eller 11,

- CDR-H2 omfatter sekvensen ifølge SEQ ID nr. 5 eller 12, eller en sekvens med minst 80 % identitet etter optimal sammenstilling med sekvensene ifølge SEQ ID nr. 5 eller 12, og
- CDR-H3 omfatter sekvensen ifølge SEQ ID nr. 6 eller 8, eller en sekvens med minst 80 % identitet etter optimal sammenstilling med sekvensene ifølge SEQ ID nr. 6 eller 8.

Ifølge en spesifikk utførelsesform er antistoffene, eller én av deres utledede forbindelser eller funksjonelle fragmenter, kjennetegnet ved at de omfatter en tungkjede som omfatter CDR-H1 ifølge sekvensen SEQ ID nr. 7, CDR-H2 med sekvensen ifølge SEQ ID nr. 5 og CDR-H3 med sekvensen ifølge SEQ ID nr. 8.

Ifølge en annen spesifikk utførelsesform er antistoffene, eller én av deres utledede forbindelser eller funksjonelle fragmenter, kjennetegnet ved at de omfatter en tungkjede som omfatter CDR-H1 med sekvensen SEQ ID nr. 11, CDR-H2 med sekvensen SEQ ID nr. 12 og CDR-H3 med sekvensen SEQ ID nr. 6.

Mer spesifikt er antistoffet, eller én av dets avledede forbindelser eller funksjonelle fragmenter, kjennetegnet ved at det omfatter en lett kjede som omfatter minst én CDR valgt blant CDR'ene med aminosyresekvenser SEQ ID nr. 40, 2 eller 41 eller minst én CDR hvis sekvens har minst 80 %, fortrinnsvis 85 %, 90 %, 95 % og 98 % identitet etter optimal sammenstilling med sekvensene SEQ ID nr. 40, 2 eller 41, eller det omfatter en tungkjede som omfatter minst én CDR valgt blant CDR'ene med aminosyresekvenser SEQ ID nr. 42, 5 eller 43, eller minst én CDR hvis sekvens har minst 80 %, fortrinnsvis 85 %, 90 %, 95 % og 98 % identitet etter optimal sammenstilling med sekvensene ifølge SEQ ID nr. 42, 5 eller 43.

Ifølge en annen utførelsesform er antistoffet, eller én av dets avledede forbindelser eller funksjonelle fragmenter, kjennetegnet ved at det omfatter en lett kjede som omfatter minst én av CDR'ene med sekvensene SEQ ID nr. 40, 2 eller 41, eller minst én sekvens med minst 80 %, fortrinnsvis 85 %, 90 %, 95 % og 98 % identitet etter optimal sammenstilling med sekvensene ifølge SEQ ID nr. 40, 2 eller 41.

På en foretrukket måte er antistoffene, eller én av dets avledede forbindelser eller funksjonelle fragmenter, kjennetegnet ved at det omfatter en lett kjede som omfatter de følgende tre CDR'ene, henholdsvis CDR-L1, CDR-L2 og CDR-L3, der:

- CDR-L1 omfatter sekvensen SEQ ID nr. 40 eller 46, eller en sekvens med minst 80 % identitet etter optimal sammenstilling med sekvensene SEQ ID nr. 40 eller 46,
- CDR-L2 omfatter sekvensen SEQ ID nr. 2 eller 47, eller en sekvens med minst 80 % identitet etter optimal sammenstilling med sekvensene SEQ ID nr. 2 eller 47, og
- CDR-L3 omfatter sekvensen SEQ ID nr. 41, eller en sekvens med minst 80 % identitet etter optimal sammenstilling med sekvensen SEQ ID nr. 41.

Ifølge en spesifikk utførelsesform er antistoffene, eller én av deres avledede forbindelser eller funksjonelle fragmenter, kjennetegnet ved at de omfatter en lettkjede som omfatter CDR-L1 med sekvensen SEQ ID nr. 49, CDR-L2 med sekvensen SEQ ID nr. 2 og CDR-L3 med sekvensen SEQ ID nr. 41.

- 5 Ifølge en annen spesifikk utførelsesform er antistoffene, eller én av deres avledede forbindelser eller funksjonelle fragmenter, kjennetegnet ved at de omfatter en lettkjede som omfatter CDR-L1 med sekvensen SEQ ID nr. 46, CDR-L2 med sekvensen SEQ ID nr. 47 og CDR-L3 med sekvensen SEQ ID nr. 41.

- 10 Mer spesifikt er antistoffene, eller én av deres avledede forbindelser eller funksjonelle fragmenter, kjennetegnet ved at de omfatter en tungkjede som omfatter minst én av de tre CDR'ene med sekvensene SEQ ID nr. 42, 5 eller 43, eller minst én sekvens med minst 80 %, fortrinnsvis 85 %, 90 %, 95 % og 98 % identitet etter optimal sammenstilling med sekvensene ifølge SEQ ID nr. 42, 5 eller 43.

- 15 Enda mer foretrukket er antistoffene, eller én av deres avledede forbindelser eller funksjonelle fragmenter, kjennetegnet ved at de omfatter en tungkjede som omfatter de følgende tre CDR'ene, henholdsvis CDR-H1, CDR-H2 og CDR-H3, der

- CDR-H1 omfatter sekvensen SEQ ID nr. 42, 44 eller 48, eller en sekvens med minst 80 % identitet etter optimal sammenstilling med sekvensen SEQ ID nr. 42, 44 eller 48,
 - 20 - CDR-H2 omfatter sekvensen SEQ ID nr. 5 eller 49, eller en sekvens med minst 80 % identitet etter optimal sammenstilling med sekvensen SEQ ID nr. 5 eller 49, og
 - CDR-H3 omfatter sekvensen SEQ ID nr. 45 eller 43, eller en sekvens med minst 80 % identitet etter optimal sammenstilling med sekvensen SEQ ID nr. 45 eller 43.
- 25

Ifølge en særskilt utførelsesform er antistoffer eller en av deres avledede forbindelser eller funksjonelle fragmenter karakterisert ved at de omfatter en tung kjede som omfatter CDR-H1'et av sekvensen SEQ ID nr. 44, CDR-H2'et av sekvensen SEQ ID nr. 5 og CDR-H3'et av sekvensen SEQ ID nr. 45.

- 30 Ifølge en annen særskilt utførelsesform er antistoffer, eller en av deres avledede forbindelser eller funksjonelle fragmenter karakterisert ved at de omfatter en tung kjede som omfatter CDR-H1'et av sekvensen SEQ ID nr. 48, CDR-H2'et av sekvensen SEQ ID nr. 49 og CDR-H3'et av sekvensen SEQ ID nr. 43.

- 35 I foreliggende beskrivelse kan uttrykkene «polypeptider», «polypeptidsekvenser», «peptider» og «proteiner bundet til antistoffforbindelser eller deres sekvenser» benyttes om hverandre.

- 40 I en første utførelsesform betyr komplementaritetsbestemmende region, eller CDR, hypervariabelregionene på de tunge og lette kjedene på immunoglobuliner som definert av Kabat et al., (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5.ed., US Department of Health and Human Services, NIH, 1991, og senere

utgaver). Det finnes tre tungkjede-CDR'er og tre lettkjede-CDR'er. Her blir uttrykkene «CDR» og «CDR'er» benyttet for å indikere, avhengig av tilfellet én eller flere eller til og med alle regionene som inneholder hoveddelen av aminosyrerestene som er ansvarlige for antistoffets bindingsaffinitet for antigenet eller epitopen det gjenkjenner.

I en andre utførelsesform er det med CDR-regioner eller CDR('er) ment å skulle indikere hypervariabelregionene til de tunge og lette kjedene på immunoglobulinene som definert ved IMGT.

Den unike IMGT-nummereringen har blitt definert for å sammenligne variabeldomenene uansett antigenreseptor, kjedetypen, eller arten [Lefranc M.-P., Immunology Today 19, 509 (1997) / Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999) / Lefranc M.-P., Pommié C., Ruiz M., Giudicelli V., Foulquier E., Truong L., Thouvenin-Contet V., og Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]. I den unike IMGT-nummereringen har de konserverte aminosyrene alltid den samme posisjonen, f.eks. cystein 23 (1st-CYS), tryptofan 41 (CONSERVED-TRP), hydrofob aminosyre 89, cystein 104 (2nd-CYS), fenylalanin eller tryptofan 118 (J-PHE eller J-TRP). Den unike IMGT-nummereringen tilveiebringer en standardisert begrensning av rammeverksregionene (FR1-IMGT: posisjoner 1 til 26, FR2-IMGT: 39 til 55, FR3-IMGT: 66 til 104 og FR4-IMGT: 118 til 128) og av de komplementaritetsbestemmende regionene: CDR1-IMGT: 27 til 38, CDR2-IMGT: 56 til 65, CDR3-IMGT: 105 til 117. Fordi hull representerer ikke-okkuperte posisjoner så blir CDR-IMGT-lengdene (vist mellom parenteser og separert med prikker, f.eks. [8.8.13] avgjørende informasjon. Den unike IMGT-nummereringen blir benyttet i grafiske 2D-representasjoner betegnet som IMGT Colliers de Perles [Ruiz M. og Lefranc M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002) / Kaas Q. og Lefranc M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)] og i 3D-struktur i IMGT/3Dstructure-DB [Kaas Q., Ruiz M. og Lefranc M.-P., T celle receptor and MHC structural data, Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)].

Tre tungkjede-CDR'er og tre lettkjede-CDR'er eksisterer. Uttrykket CDR eller CDR'er blir her benyttet for å indikere, i overensstemmelse med tilfellet, én av disse regionene eller flere, eller til og med det hele av disse regionene som inneholder hovedandelen av aminosyrerestene som er ansvarlige for bindingen ved affinitet av antistoffet for antigenet eller epitopen som det gjenkjenner.

For å gjøre det klarere er det slik at i den følgende beskrivelsen, og mer spesifikt i tabellene 2 og 3, så vil CDR'ene bli definert ved IMGT-nummerering, Kabat-nummerering og ved vanlig nummerering.

Vanlig nummerering omgrupperer restene som er del av hver CDR som er felles for CDR'ene som definert ved IMGT- og Kabat-nummereringssystemene.

IMGT-nummereringssystemet definerer CDR'ene i overensstemmelse med IMGT-systemet som definert ovenfor mens Kabat-nummereringssystemet definerer CDR'ene i overensstemmelse med Kabat-systemet som definert ovenfor.

Mer spesifikt består CDR-L1 av SEQ ID nr. 1 (**QSLYNSRTRKNY**) i det vanlige og IMGT-nummereringssystemet og av SEQ ID nr. 9 (**KSSQSLYNSRTRKNYLA**) i Kabat-nummereringssystemet.

5 Vedrørende CDR-L2 består den av SEQ ID nr. 2 (**WAS**) i det vanlige og i IMGT-nummereringssystemet og av SEQ ID nr. 10 (**WASTRES**) i Kabat-nummereringssystemet.

CDR-L3 består av SEQ ID nr. 3 (**KQSYNLRT**) i hvert av de tre nummereringssystemene.

10 For tungkjeden består CDR-H1 av SEQ ID nr. 4 (**TDYY**) i det vanlige nummereringssystemet, av SEQ ID nr. 7 (**GFTFTDYY**) i IMGT-systemet og av SEQ ID nr. 11 (**TDYYMS**) i Kabat-nummereringssystemet.

CDR-H2 består av SEQ ID nr. 5 (**IRNKANGYTT**) i det vanlige og i IMGT-systemet og av SEQ ID nr. 12 (**FIRNKANGYTTEYSASVKG**) i Kabat-systemet.

15 Til slutt består CDR-H3 av SEQ ID nr. 6 (**DIPGFAY**) i det vanlige og i Kabat-systemet og av SEQ ID nr. 8 (**ARDIPGFAY**) i IMGT-systemet.

Mer spesifikt består CDR-L1 av SEQ ID nr. 40 (**QSLFNSRTRKNY**) i det vanlige og i IMGT-systemet og av SEQ ID nr. 46 (**KSSQSLFNSRTRKNYLA**) i Kabat-nummereringssystemet.

20 Vedrørende CDR-L2 består den av SEQ ID nr. 2 (**WAS**) i det vanlige og i IMGT-systemet og av SEQ ID nr. 47 (**WASARDS**) i Kabat-systemet.

CDR-L3 består av SEQ ID nr. 41 (**MQSFNLRT**) for hvert av de tre systemene

For tungkjeden består CDR-H1 av SEQ ID nr. 42 (**DNV**) i det vanlige systemet, av SEQ ID nr. 44 (**GFTFTDNY**) i IMGT-systemet og av SEQ ID nr. 48 (**DNVMS**) i Kabat-systemet.

25 CDR-H2 består av SEQ ID nr. 5 (**IRNKANGYTT**) i det vanlige og i IMGT-systemet og av SEQ ID nr. 49 (**FIRNKANGYTTDYSASVRG**) i Kabat-systemet.

Til slutt består CDR-H3 av SEQ ID nr. 43 (**DVGSNYFDY**) i det vanlige og Kabat-systemet og av SEQ ID nr. 45 (**ARDVGSNYFDY**) i IMGT-systemet.

30 Som benyttet her betyr «prosentvis identitet» mellom to sekvenser med nukleinsyrer eller aminosyrer prosentandelen av identiske nukleotider eller aminosyrerester mellom de to sekvensene som skal sammenlignes, oppnådd etter optimal sammenstilling, der denne prosentandelen er rent statistisk og der forskjellene mellom de to sekvensene er fordelt tilfeldig langs deres lengde. Sammenligningen av to nukleinsyre- eller aminosyresekvenser blir tradisjonelt utført ved å
35 sammenligne sekvensene etter å ha sammenstilt dem optimalt, der nevnte sammenligning er i stand til å bli utført ved segment eller ved å benytte et «sammenstillingsvindu». Optimal sammenstilling av sekvensene for sammenligning kan i tillegg til sammenligning for hånd bli utført ved hjelp av den lokale homologicalgoritmen til Smith og Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], ved

hjelp av den lokale homologialgoritmen til Neddelman og Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], ved hjelp av similaritetssøkefremgangsmåten til Pearson og Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444] eller ved hjelp av dataprogramvare som benytter disse algoritmene (GAP, BESTFIT, FASTA og TFASTA i the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, eller med sammenligningsprogramvaren BLAST NR eller BLAST P).

Den prosentvise identiteten mellom to nukleinsyre- eller aminosyresekvenser blir bestemt ved å sammenligne de to optimalt sammenstilte sekvensene der nukleinsyre- eller aminosyresekvensene som skal sammenlignes kan ha addisjoner eller delesjoner sammenlignet med referansesekvensen for optimal sammenstilling mellom de to sekvensene. Prosentvis identitet blir beregnet ved å bestemme antallet posisjoner der aminosyre, nukleotidet eller resten er identisk mellom de to sekvensene, fortrinnsvis mellom de to komplette sekvensene, dele antallet identiske posisjoner på det totale antallet posisjoner i sammenligningsvinduet og multiplisere resultatet med 100 for å oppnå den prosentvise identiteten mellom de to sekvensene.

F.eks. kan BLAST-programmet, «BLAST 2 sequences» (Tatusova et al., «Blast 2 sequences – a new tool for comparing protein and nucleotide sequences», FEMS Microbiol., 1999, Lett. 174:247-250) som er tilgjengelig på nettstedet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gotf/bl2.htm> bli benyttet med de gitte parameterne (det vil si «open gap penalty»: 5, og «extension gap penalty»: 2, der den valgte matriksen f.eks. er «BLOSUM 62»-matriksen som blir foreslått av programmet), der den prosentvise identiteten mellom de to sekvensene som skal sammenlignes blir beregnet direkte av programmet.

For aminosyresekvensen som oppviser minst 80 %, fortrinnsvis 85 %, 90 %, 95 % og 98 % identitet med en referanseaminosyresekvens inkluderer foretrukne eksempler de som inneholder referansesekvensen, visse modifiseringer, det vil si en delesjon, addisjon eller substitusjon av minst én aminosyre, trunkering eller forlengning. I tilfellet med substitusjon av én eller flere konsekutive eller ikke-konsekutive aminosyrer så er substitusjoner foretrukket der de substituerte aminosyrene blir erstattet med «ekvivalente» aminosyrer. Her er uttrykket «ekvivalente aminosyrer» ment å skulle indikere enhver aminosyre som sannsynligvis kan substitueres med én av de strukturelle aminosyrene uten å modifisere de biologiske aktivitetene til de tilsvarende antistoffene og for de spesifikke eksemplene som er definert nedenfor.

Ekvivalente aminosyrer kan enten bli bestemt ved deres strukturelle homologi med aminosyrene som de er substituert med eller ut fra resultatene av sammenligningstester for biologisk aktivitet mellom de ulike antistoffene som det er sannsynlig vil bli generert.

Som et ikke-begrensende eksempel oppsummerer tabell 1 nedenfor de mulige substitusjonene som skal utføres uten å føre til en signifikant modifisering av den biologiske aktiviteten til det tilsvarende modifiserte antistoffet, der inverse substitusjoner naturligvis er mulig ved de samme betingelsene.

Tabell 1

Opprinnelig rest	Substitusjon(er)
Ala (A)	Val. Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val. Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

5 Fagfolk på området kjenner til at i teknikkens stand så blir den største variabiliteten (lende og sammensetning) mellom de seks CDR'ene funnet på de tre tungkjede-
 CDR'ene, og mer spesifikt på CDR-H3 på denne tungkjeden. Dermed er det klart at
 CDR'ene med de foretrukne karakteristikaene på antistoffene som er tilkjennegitt
 her, eller for én av deres avledede forbindelser eller funksjonelle derivater, vil være
 de tre CDR'ene på tungkjeden, dvs., for 414H5 CDR'ene som henholdsvis er kodet
 10 for av sekvenser SEQ ID nr. 7, 5, 8 og 11, 12, 6, definert i overensstemmelse med
 IMGT og Kabat, og for 515H7 CDR'ene som henholdsvis er kodet for av
 sekvensene SEQ ID nr. 44, 5, 45 og 48, 49 43, definert i overensstemmelse med

IMGT og Kabat. Enda mer foretrukket CDR'en tilsvarende CDR-H3 kodet for av sekvensen SEQ ID nr. 8 eller 6 for 414H5 og 45 eller 43 for 515H7.

Foreliggende oppfinnelse vedrører et murint antistoff, eller avledede forbindelser eller funksjonelle fragmenter, som omfatter

- 5 En annen utførelsesform av oppfinnelsen tilkjenner et antistoff, eller dets funksjonelle fragmenter, som omfatter:

- 10 en lettjede som omfatter de følgende tre CDR'ene: CDR-L1 med sekvensen ifølge SEQ ID nr. 1, CDR-L2 med sekvensen ifølge SEQ ID nr. 2, CDR-L3 med sekvensen ifølge SEQ ID nr. 3, og
en tungjede som omfatter de følgende tre CDR'ene: CDR-H1 med sekvens SEQ ID nr. 4, CDR-H2 med sekvens SEQ ID nr. 5 og CDR-H3 med sekvens SEQ ID nr. 6.

Et antistoff, eller et funksjonelt fragment av samme, ifølge oppfinnelsen er kjennetegnet ved at det omfatter:

- 15 - En lettjede som omfatter CDR-L1 med sekvensen SEQ ID nr. 1, CDR-L2 med sekvensen SEQ ID nr. 2 og CDR-L3 med sekvensen SEQ ID nr. 3, og
- En tungjede som omfatter CDR-H1 med sekvensen SEQ ID nr. 7, CDR-H2 med sekvensen SEQ ID nr. 5 og CDR-H3 med sekvensen SEQ ID nr. 8.

- 20 I en annen utførelsesform er et antistoff, eller et funksjonelt fragment av samme, ifølge oppfinnelsen, kjennetegnet ved at det omfatter:

- En lettjede som omfatter CDR-L1 med sekvensen SEQ ID nr. 9, CDR-L2 med sekvensen SEQ ID nr. 10 og CDR-L3 med sekvensen SEQ ID nr. 3, og
- En tungjede som omfatter CDR-H1 med sekvensen SEQ ID nr. 11, CDR-H2 med sekvensen SEQ ID nr. 12 og CDR-H3 med sekvensen SEQ ID nr. 6.

- 25 Ifølge nok en annen utførelsesform er antistoffet ifølge oppfinnelsen, eller dets funksjonelle fragmenter, kjennetegnet ved at det omfatter en lettjedesequens som omfatter aminosyresequensen SEQ ID nr. 13 og ved at det omfatter en tungjedesequens som omfatter aminosyresequensen SEQ ID nr. 14.

- 30 En annen utførelsesform av oppfinnelsen tilkjenner et antistoff, eller dets funksjonelle fragmenter, som omfatter

en lettjede som omfatter de følgende tre CDR'ene: CDR-L1 med sekvensen SEQ ID nr. 40, CDR-L2 med sekvensen SEQ ID nr. 2 og CDR-L3 med sekvensen SEQ ID nr. 41, eller av en sekvens med minst 80 %, fortrinnsvis 85 %, 90 %, 95 % og 98 % identitet etter optimal sammenstilling med sekvensen SEQ ID nr. 41, og

- 35 en tungjede som omfatter de følgende tre CDR'ene: CDR-H1 med sekvensen SEQ ID nr. 42, CDR-H2 med sekvensen SEQ ID nr. 5 og CDR-H3 med sekvensen SEQ ID nr. 43.

Et antistoff eller et funksjonelt fragment av samme ifølge oppfinnelsen er kjennetegnet ved at det omfatter:

- en lettkjede som omfatter CDR-L1 med sekvensen SEQ ID nr. 40, CDR-L2 med sekvensen SEQ ID nr. 2 og CDR-L3 med sekvensen SEQ ID nr. 41, og
- en tungkjedesequens som omfatter CDR-H1 med sekvensen SEQ ID nr. 44, CDR-H2 med sekvensen SEQ ID nr. 5 og CDR-H3 med sekvensen SEQ ID nr. 45.

I en annen utførelsesform er et antistoff eller funksjonelt fragment av samme ifølge oppfinnelsen kjennetegnet ved at det omfatter:

- en lettkjede som omfatter CDR-L1 med sekvensen SEQ ID nr. 46, CDR-L2 med sekvensen SEQ ID nr. 47 og CDR-L3 med sekvensen SEQ ID nr. 41, og
- en tungkjedesequens som omfatter CDR-H1 med sekvensen SEQ ID nr. 48, CDR-H2 med sekvensen SEQ ID nr. 49 og CDR-H3 med sekvensen SEQ ID nr. 43.

Ifølge nok en annen utførelsesform er antistoffet ifølge oppfinnelsen, eller dets funksjonelle fragmenter, kjennetegnet ved at det omfatter en lettkjedesequens som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID nr. 50 og at det omfatter tungkjedesequensen som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID nr. 51.

Slik det fremgår ovenfor omfatter foreliggende beskrivelse også enhver forbindelse som er avledet fra et antistoff som beskrevet i oppfinnelsen.

Mer spesifikt blir det her tilkjennegitt et antistoff, eller dets avledede forbindelser eller funksjonelle fragmenter, som er kjennetegnet ved at nevnte avledede forbindelse består av et bindingsprotein som omfatter et peptidrammeverk på hvilket det er transplantert minst én CDR på en slik måte at alle eller deler av paratopgjenkjenningsegenskapene for det opprinnelige antistoffet bevares.

Én eller flere sekvenser blant de seks CDR-sekvensene beskrevet her kan også foreligge på de ulike immunoglobulinprotein-rammeverkene. I dette tilfellet gjør proteinsekvensen det mulig å gjendanne et proteinskjellet som er fordelaktig for de transplanterte CDR'ene, for å gjøre dem i stand til å bevare deres paratopantigen-gjenkjenningsegenskaper.

Generelt kjenner en fagmann på området til hvordan han bestemmer typen proteinrammeverk på hvilken det kan transplanteres minst én av CDR'ene som fremkommer fra det opprinnelige antistoffet. Mer spesifikt er det kjent at for å bli valgt så må et slikt rammeverk imøtekomme flest mulig av kriteriene som følger (Skerra A.J., Mol. Regogn., 2000, 13:167-187):

- god fylogeni konservering,
- kjent tredimensjonal struktur (som f.eks. ved hjelp av krystallografi, NMR-spektroskopi eller enhver annen teknikk som er kjent for en fagmann på området),
- liten størrelse,
- få eller ingen post-transkripsjonelle modifikasjoner og/eller

- enkel å produsere, uttrykke og rense.

Opphavet til slike proteinrammeverk kan være, men er ikke begrenset til, strukturene som er valgt blant: fibronektin og fortrinnsvis Fibronektin type III domene 10, lipokalin, antikalinalin (Skerra A., J. Biotechnol, 2001, 74 (4):257. -75),
 5 protein-Z som oppstår fra domene-B til protein A fra *Staphylococcus aureus*, thioredoxin A eller proteiner med et gjentatt motiv som "ankyrin repeat" (Kohl et al. PNAS, 2003, vol. 100, nr 4,. 1700-1705), den "armadillo repeat", den "leucinrike repeat" og "tetratricopeptide repeat".

10 Rammeverk avledet fra toksiner slik som, for eksempel giftstoffer fra skorpioner, insekter, planter, bløtdyr, etc., og proteininhibitorene av neuronal NO-syntase (PIN) bør også nevnes.

Et eksempel, på ingen måte begrensende, på slike hybridkonstruksjoner, er innsettingen av CDR-H1 (tungkjede) fra en antiCD4-antistoff, nemlig 13B8.2, i én av løkkene i PIN, der det nye bindingsprotein som oppnås slik bevarer de samme
 15 bindingsegenskaper som det opprinnelige antistoffet (BES et al. Biochem. Biophys. Res Commun., 2006, 343 (1), 334-344). På en rent illustrerende basis kan poding av CDR-H3 (tungkjede) fra et anti-lysozym VHH-antistoff på en av løkkene av neocarzinostatin (Nicaise et al, Protein Science, 2004, 13 (7):. 1882-1891) også nevnes.

20 Til slutt, som beskrevet ovenfor, kan slike peptidrammeverk omfatter fra en til seks CDR'er som oppstår fra det opprinnelige antistoffet. Fortrinnsvis, men uten å være et krav, kan en person med kunnskap innenfor fagområdet vil velge minst én CDR fra den tunge kjeden, idet sistnevnte er kjent for å være hovedansvarlig for spesifisiteten av antistoffet. Valg av én eller flere relevante CDR'er er åpenbart for
 25 en person med kunnskap innenfor fagområdet, som vil deretter velge egnede kjente teknikker (Bes et al. FEBS bokstaver 508, 2001, 67-74).

Også beskrevet heri er en fremgangsmåte for utvelgelse av en forbindelse avledet fra et antistoff i henhold til oppfinnelsen, idet den avledede forbindelsen er i stand
 30 til å inhibere in vitro og / eller in vivo veksten av tumorceller, og den avledede forbindelsen omfattende et peptid-rammeverk på hvilket det er podet i det minste én antistoff-CDR, karakterisert ved at den omfatter følgende trinn :

- a) plassering i kontakt in vitro av en forbindelse sammensatt av et peptidrammeverk på hvilket det er podet minst én antistoff-CDR med en
 35 biologisk prøve inneholdende tumorceller som er i stand til å vokse og ved betingelser som tillater disse cellene å vokse, og
- b) seleksjon av nevnte forbindelse dersom nevnte forbindelse er i stand til å inhibere veksten av disse tumorcellene, og kjennetegnet ved at minst én podet CDR er valgt blant de følgende CDR'ene:

- CDR med sekvens SEQ ID nr. 1, 9, 40, 46 eller en sekvens med minst 80 %, fortrinnsvis 85 %, 90 %, 95 % og 98 % identitet eter optimal sammenstilling med sekvensen SEQ ID nr. 1, 9, 40, 46,
- 5 - CDR med sekvens SEQ ID nr. 2, 10, 47 eller en sekvens med minst 80 %, fortrinnsvis 85 %, 90 %, 95 % og 98 % identitet eter optimal sammenstilling med sekvensen SEQ ID nr. 2, 10, 47,
- CDR med sekvens SEQ ID nr. 3, 41 eller en sekvens med minst 80 %, fortrinnsvis 85 %, 90 %, 95 % og 98 % identitet eter optimal sammenstilling med sekvensen SEQ ID nr. 3, 41,
- 10 - CDR med sekvens SEQ ID nr. 4, 7, 11, 42, 44, 48 eller en sekvens med minst 80 %, fortrinnsvis 85 %, 90 %, 95 % og 98 % identitet eter optimal sammenstilling med sekvensen SEQ ID nr. 4, 7, 11, 42, 44, 48,
- CDR med sekvens SEQ ID nr. 5, 12, 49 eller en sekvens med minst 80 %, fortrinnsvis 85 %, 90 %, 95 % og 98 % identitet eter optimal sammenstilling med sekvensen SEQ ID nr. 5, 12, 49, og
- 15 - CDR med sekvens SEQ ID nr. 6, 8, 43, 45 eller en sekvens med minst 80 %, fortrinnsvis 85 %, 90 %, 95 % og 98 % identitet eter optimal sammenstilling med sekvensen SEQ ID nr. 6, 8, 43, 45.

20 Ifølge en foretrukket måte kan fremgangsmåten i trinn a) inkludere å plassere i kontakt in vitro en forbindelse som omfatter et peptid-rammeverk på hvilket det er podet minst to eller tre antistoff-CDR'er.

Ifølge en enda mer foretrukket måte av denne fremgangsmåten er peptid-rammeverket valgt blant rammeverkene eller bindingsproteinene hvis strukturer ble nevnt ovenfor.

25 Foreliggende beskrivelse vedrører slik et antistoff, eller dets avledede forbindelser eller funksjonelle fragmenter, kjennetegnet ved at peptid-rammeverket er valgt blant proteiner som er a) fylogent godt preserverte, b) av robust oppbygning, c) med en velkjent molekylær 3-D-organisering, d) av liten størrelse og/eller e) som omfatter regioner som kan bli modifisert ved delesjon og/eller innsetting uten å modifisere

30 stabilitetsegenskaper.

Ifølge en foretrukket utførelsesform er nevnte antistoff, eller dets avledede forbindelser eller funksjonelle fragmenter, kjennetegnet ved at nevnte peptid-rammeverk er valgt blant i) rammeverk som kommer fra fibronectin, fortrinnsvis fibronectin type-3-domene-10, lipokalin, antikalin, protein-Z som kommer fra domene-B i protein-A i *Staphylococcus aureus*, tioredoksin-A eller proteiner med et

35 gjentatt motiv slik som «ankyrin-repetisjonen» (Kohl *et al.*, PNAS, 2003, vol. 100, No. 4, 1700–1705), «armadillo-repetisjonen», den «leucinrike repetisjonen» og «tetratrikopeptid-repetisjonen» eller iii) proteininhibitorer av neuronal NO-syntase (PIN).

Et annet aspekt av oppfinnelsen vedrører de funksjonelle fragmentene av antistoffet beskrevet ovenfor.

Mer spesifikt er oppfinnelsen rettet på et antistoff, eller dets funksjonelle fragmenter, kjennetegnet ved at nevnte funksjonelle fragment er valgt blant
5 fragmentene Fv, Fab, (Fab')₂, Fab', scFv, scFv-Fc og dialegemer, eller ethvert fragment hvis halveringstid har blitt økt, slik som PEGylerte fragmenter.

Slike funksjonelle fragmenter av antistoffet ifølge oppfinnelsen består f.eks. av fragmentene Fv, scFV (sc=enkeltkjede), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc eller
10 dialegemer, eller ethvert fragment hvis halveringstid har blitt økt ved kjemisk modifisering, slik som ved addisjonen av polyalkylenglykol slik som polyetylenglykol (PEGylering) (PEGylerte fragmenter blir referert til som Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG og Fab'-PEG) eller ved inkorporering i et liposom, mikrosfærer eller PLGA, der nevnte fragmenter innehar minst én av de
15 karakteristiske CDR'ene ifølge oppfinnelsen som spesielt er i stand til på en generell måte å utøve aktivitet, til og med partiell, for antistoffet som det er oppstått fra.

Fortrinnsvis vil nevnte funksjonelle fragmenter omfatte eller inkludere en partiell sekvens av den variable tungkjeden eller lettkjeden av antistoffet som de er avledet fra, der nevnte partielle sekvens er tilstrekkelig til å opprettholde den samme
20 bindingsspesifisiteten som antistoffet det er utledet fra og tilstrekkelig affinitet, fortrinnsvis minst likt med 1/100, mer foretrukket minst 1/10 av affiniteten til antistoffet som det er utledet fra.

Et slikt funksjonelt fragment vil inneholde minst fem aminosyrer, fortrinnsvis 6, 7, 8, 10, 15, 25, 50 eller 100 konsekutive aminosyrer av sekvensen til antistoffet som
25 det er utledet fra.

Fortrinnsvis vil disse funksjonelle fragmentene være av typene Fv, Fab, (Fab')₂, Fab', scFv, scFv-Fc eller dialegemer, som generelt har den samme bindingsspesifisiteten som antistoffet de stammer fra. Ifølge foreliggende
30 oppfinnelse kan fragmenter av antistoffet ifølge oppfinnelsen bli oppnådd fra antistoffene beskrevet ovenfor ved hjelp av fremgangsmåter slik som enzymfordøying, inkludert pepsin eller papain o/eller ved kløyving av disulfidbroene ved kjemisk reduksjon. Antistofffragmentene kan også bli oppnådd ved rekombinante, genetiske teknikker som også er kjent for fagfolk på området eller ved peptidsyntese ved hjelp av f.eks. automatiske peptidsyntetiserere slik som
35 de som selges av Applied BioSystems osv.

For mer klarhet oppsummerer tabell 2 nedenfor de ulike aminosyresekvensene som tilsvarer antistoffet ifølge oppfinnelsen.

Tabell 2 (der Mu. = murin og Ch. = kimær)

Antistoff	CDR-nummerering	Tungkjede	LETTKJEDE	SEQ ID NR.
414H5	Vanlig		CDR-L1	1
			CDR-L2	2
			CDR-L3	3
		CDR-H1		4
		CDR-H2		5
		CDR-H3		6
	IMGT		CDR-L1	1
			CDR-L2	2
			CDR-L3	3
		CDR-H1		7
		CDR-H2		5
		CDR-H3		8
	Kabat		CDR-L1	9
			CDR-L2	10
			CDR-L3	3
		CDR-H1		11
		CDR-H2		12
		CDR-H3		6
			Mu. variabeldomene	13
		Mu. variabeldomene		14
			Ch. variabeldomene	64
		Ch. variabeldomene		65
515H7	Vanlig		CDR-L1	40
			CDR-L2	2
			CDR-L3	41
		CDR-H1		42
		CDR-H2		5
		CDR-H3		43
	IMGT		CDR-L1	40
			CDR-L2	2
			CDR-L3	41
		CDR-H1		44
		CDR-H2		5
		CDR-H3		45
	Kabat		CDR-L1	46
			CDR-L2	47
			CDR-L3	41
		CDR-H1		48
		CDR-H2		49
		CDR-H3		43
			Mu. variabeldomene	50
		Mu. variabeldomene		51
			Ch. variabeldomene	66
		Ch. variabeldomene		67

Et annet spesifikt aspekt av foreliggende oppfinnelse vedrører et kimært antistoff, eller dets funksjonelle fragmenter, kjennetegnet ved at nevnte antistoff også omfatter lett kjede- og tungkjedekonstantregioner som er avledet fra et antistoff av en art som er heterolog med mus, spesielt menneske.

- 5 Nok et annet spesifikt aspekt av foreliggende oppfinnelse vedrører et humanisert antistoff, eller dets funksjonelle fragmenter, kjennetegnet ved at konstantregionene på lett kjeden og tungkjeden som er avledet fra humant antistoff henholdsvis er lambda- eller kappa-regionen og gamma1-, gamma-2- eller gamma-4-regionen.

- 10 Ifølge et annet aspekt vedrører oppfinnelsen et murine hybridom som er i stand til å skille ut et monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen, spesifikt hybridomet av murint opphav som er rapportert til den franske samlingen av mikroorganismekulturer (CNCM, Institut Pasteur, Paris, Frankrike) 22.oktober 2007 under nummer I-3860. Nevnte hybridom ble oppnådd ved fusjonen av splenocytter fra immuniserte Balb/C-mus og celler fra myelomcellelinjene Sp 2/O-Ag 14.

- 15 Det monoklonale antistoffet som her refereres til som 414H5, eller dets funksjonelle fragmenter, kjennetegnet ved at nevnte antistoff blir utskilt fra hybridomet som bel innsendt til CNCM 22.oktober 2007 under nummer I-3860, danner åpenbart en del av foreliggende oppfinnelse.

- 20 Ifølge et annet aspekt vedrører oppfinnelsen et murint hybridom som er i stand til å skille ut et monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen, nemlig hybridomet av murint opphav registrert hos the French collection for microorganism cultures (CNCM, Pasteur-instituttet, Paris, Frankrike) den 25.juni 2008 under nummer I-4019. Nevnte hybridom ble oppnådd ved fusjon av Balb/C-immuniserte mude-splenocytter og celler fra Sp2/O-Ag-14-myelomcellelinjen.

- 25 Det monoklonale antistoffet som her refereres til som 515H7 eller dets funksjonelle fragmenter, som er kjennetegnet ved at nevnte antistoff blir utskilt av hybridomet registrert hos CNCM 25.juni 2008 under nummer I-4019 danner åpenbart en del av foreliggende oppfinnelse.

Antistoffet ifølge oppfinnelsen omfatter kimære eller humaniserte antistoffer.

- 30 Et kimært antistoff er ett som inneholder en naturlig variabelregion (lett kjede og tungkjede) avledet fra et antistoff av en gitt type i kombinasjon med konstantregioner på lett kjeden og tungkjeden fra et antistoff av en type som er heterolog med nevnte gitte type.

- 35 Antistoffene, eller kimære fragmenter av de samme, kan bli fremstilt ved å benytte rekombinante genteknikker. Det kimære antistoffet kan f.eks. bli fremstilt ved å klonere rekombinant DNA inneholdende en promoter og en sekvens som koder for variabelregionen til et ikke-humant, monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen, det vil si murint, og en sekvens som koder for konstantregionen til det humane antistoffet. Et kimært antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse som er kodet for av
40 ett slikt rekombinant gen kan f.eks. være en muse-human-kimær, der spesifisiteten

til antistoffet er bestemt ved variabelregionen som er utledet fra det murine DNA og dens isotype er bestemt ved konstantregionen som er utledet fra humant DNA. Referer til Verhoeyn et al., (BioEssays, 8:74, 1988) for fremgangsmåter for fremstilling av kimære antistoffer.

- 5 I et annet aspekt beskriver oppfinnelsen et antistoff eller et funksjonelt fragment av samme, som består i et kimært antistoff

I en spesifikk utførelsesform omfatter det kimære antistoffet, eller et funksjonelt fragment av det samme, ifølge oppfinnelsen en lettkjedesequens som omfatter aminosyresequensen SEQ ID nr. 64 og entungkjedesequens som omfatter
10 aminosyresequensen ifølge SEQ ID nr. 65.

I en annen foretrukket utførelsesform omfatter det kimære antistoffet, eller en avledet forbindelse eller funksjonelt fragment av samme ifølge oppfinnelsen en lettkjedesequens som omfatter aminosyresequensen SEQ ID nr. 66, og en tungkjedesequens som omfatter aminosyresequensen SEQ ID nr. 67.

- 15 «Humaniserte antistoffer betyr et antistoff som inneholder CDR-regioner som er avledet fra et antistoff av ikke-humant opphav, der de andre delene av antistoffmolekylet er avledet fra ett (eller flere) humane antistoffer. I tillegg kan noen av rammeverkssegmentrestene (kalt FR) være modifisert for å opprettholde bindingsaffinitet (Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986; Verhoeyen et al.,
20 Science, 239:1534-1536, 1988; Riechmann et al., Nature, 332:323-327, 1988).

De humaniserte antistoffene ifølge oppfinnelsen eller fragmenter av samme kan bli fremstilt ved teknikker som er kjente for fagfolk på området (slik som f.eks. de som er beskrevet i Singer et al., J. Immun., 150:2844-2857, 1992, Mountain et al.,
25 Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10:1-142, 1992, og Bebbington et al., Bio/Technology, 10:169-175, 1992). Slike humaniserte antistoffer er foretrukket for deres anvendelse i fremgangsmåter som involverer in vitro-diagnostiseringer eller preventiv og/eller terapeutisk behandling in vivo. Andre humaniseringsteknikker, som også er kjent for fagfolk på området, slik som f.eks. «CDR-transplanteringsteknikken» beskrevet av PDL i patentene EP 0 451 261, EP
30 0 682 040, EP 0 939 127, EP 0 566 647 eller US 5,530,101, US 6,180,370, US 5,585,089 og US 5,693,761. US-patentene 5,639,641 eller 6,054,297, 5,886,152 og 5,877,293 kan også bli sitert.

I tillegg vedrører oppfinnelsen også humaniserte antistoffer som fremkommer fra de murine antistoffene beskrevet ovenfor.

- 35 På en foretrukket måte er konstantregionene på lettkjeden og tungkjeden som er utledet fra humant antistoff henholdsvis lambda- eller kappa- og gamma-1-, gamma-2- eller gamma-4-regionen.

I utførelsesformen tilsvarende IgG1-isotype IgG1 er en ytterligere egenskap for antistoffet å oppvise effektorfunksjoner, slik som antistoffavhengig cellulær
40 cytotoksisitet (ADCC) og/eller komplement-avhengig cytotoksisitet (CDC).

Et nytt aspekt av foreliggende oppfinnelse vedrører en isolert nukleinsyre som er kjennetegnet ved at den er valgt blant de følgende nukleinsyrene (inkludert enhver degenerert genetisk kode):

- 5 - en nukleinsyre, DNA eller RNA, som koder for et antistoff, eller for et funksjonelt fragment av samme, ifølge foreliggende oppfinnelse,
- en nukleinsyre som er komplementær med en nukleinsyre som definert i a)
- en nukleinsyre med minst 18 nukleotider som under høyt stringente betingelser er i stand til å hybridisere med minst én av CDR'ene med
- 10 nukleinsyresekvenser ifølge SEQ ID nr. 15 til 26 eller 52 til 61 eller en sekvens med minst 80 %, fortrinnsvis 85 %, 90 %, 95 % og 98 % identitet etter optimal sammenstilling med sekvensene ifølge SEQ ID nr. 15 til 26 eller 52 til 61, og
- en nukleinsyre med minst 18 nukleotider som under høyt stringente betingelser er i stand til å hybridisere med minst lettkjeden med
- 15 nukleinsyresekvens SEQ ID nr. 27 eller 62 eller 68 eller 70 og/eller tungkjeden med nukleinsyresekvens SEQ ID nr. 28 eller 63 eller 69 eller 71 eller en sekvens med minst 80 %, fortrinnsvis 85 %, 90 %, 95 % og 98 % identitet etter optimal sammenstilling med sekvensene ifølge SEQ ID nr.27 og/eller 28 eller 62 og/eller 63 eller 68 og/eller 69 eller 70 og/eller 71.
- 20 Tabell 3 nedenfor oppsummerer de ulike nukleotidsekvensene som vedrører antistoffet ifølge oppfinnelsen.

Table 3

Antistoff	CDR-nummerering	Tungkjede	LETTKJEDE	SEQ ID Nr.
414H5	Common		CDR-L1	15
			CDR-L2	16
			CDR-L3	17
		CDR-H1		18
		CDR-H2		19
		CDR-H3		20
	IMGT		CDR-L1	15
			CDR-L2	16
			CDR-L3	17
		CDR-H1		21
		CDR-H2		19
		CDR-H3		22
	Kabat		CDR-L1	23
			CDR-L2	24
			CDR-L3	17
		CDR-H1		25
		CDR-H2		26
		CDR-H3		20
			Mu. variabeldomene	27
		Mu. variabeldomene		28
			Ch. variabeldomene	68
		Ch. variabeldomene		69
515H7	Common		CDR-L1	52
			CDR-L2	16
			CDR-L3	53
		CDR-H1		54
		CDR-H2		19
		CDR-H3		55
	IMGT		CDR-L1	52
			CDR-L2	16
			CDR-L3	53
		CDR-H1		56
		CDR-H2		19
		CDR-H3		57
	Kabat		CDR-L1	58
			CDR-L2	59
			CDR-L3	53
		CDR-H1		60
		CDR-H2		61
		CDR-H3		55
			Mu. Variabeldomene	62
		Mu. Variabeldomene		63
			Ch. variabeldomene	70
		Ch. variabeldomene		71

Uttrykkene «nukleinsyre», «nukleinsekvens», «nukleinsyresekvens», «polynukleotid», «oligonukleotid», «polynukleotidsekvens» og «nukleotidsekvens» blir benyttet om hverandre i foreliggende beskrivelse og betyr en presis sekvens av nukleotider, modifisert eller ikke, som definerer et fragment eller en region i en nukleinsyre, som inneholder ikke-naturlige nukleotider eller ikke, og som enten er en dobbelttrådet DNA, et enkelttrådet DNA eller transkripsjonsprodukter av nevnte DNA-molekyler.

Det bør også inkluderes her at foreliggende oppfinnelse ikke er relatert til nukleotidsekvenser i deres naturlige kromosomale miljø, dvs., i en naturlig tilstand. Sekvensene ifølge foreliggende oppfinnelse har blitt isolert og/eller rensset, dvs., de ble direkte eller indirekte prøvetatt, f.eks. ved en kopi, der deres miljø i det minste delvis har blitt modifisert. Isolerte nukleinsyrer oppnådd ved rekombinant genetikk ved hjelp av f.eks. vertsceller, eller som er oppnådd ved kjemisk syntese bør også bli nevnte her.

«Nukleinsyresekvenser som oppviser en prosentvis identitet på minst 80 %, fortrinnsvis 85 %, 90 %, 95 % og 98 %, etter optimal sammenstilling med en foretrukket sekvens» betyr nukleinsyresekvenser som oppviser, med hensyn på referanse-nukleinsyresekvensen, visse modifiseringer slik som spesielt en delesjon, en trunkering, en forlengning, en kimær fusjon og/eller en substitusjon, især punktmessig. Fortrinnsvis er disse sekvenser som koder for de samme aminosyresekvensene som referansesekvensen, der dette er relatert til degenereringen av den genetiske koden, eller komplementaritetssekvenser som sannsynlig vil hybridisere spesifikt med referansesekvensene, fortrinnsvis under høyt stringente betingelser, især de som er nevnt nedenfor.

Hybridisering under høyt stringente betingelser betyr at betingelser som er relatert til temperatur og ionestyrke er valgt på en slik måte at de tillater at hybridisering blir opprettholdt mellom to komplementære DNA-fragmenter. På en rent illustrerende basis er de høyt stringente betingelsene i hybridiseringstrinnet for formålet av å definere polynukleotidfragmentene beskrevet ovenfor fordelaktig som følger.

DNA-DNA- eller RNA-DNA-hybridisering blir utført i to trinn: (1) prehybridisering ved 42 °C i tre timer i fosfatbuffer (20 mM, pH 7,5) inneholdende 5X SSC (1X SSC tilsvarer en løsning på 0,15 M NaCl + 0,015 M natriumsitrat), 50 % formamid, 7 % natriumdodecylsulfat (SDS), 10X Denhardts, 5 % dekstransulfat og 1 % laksesperm-DNA, (2) primær hybridisering i 20 timer ved en temperatur som er avhengig av lengden av proben (dvs., 42 °C for en probe > 100 nukleotider lang) etterfulgt av to vaskinger på 20 minutter ved 20 °C i 2X SSC + 2 % SDS, én vasking i 20 minutter ved 20 °C i 0,1X SSC + 0,1 % SDS. Den siste vaskingen blir utført i 0,1X SSC + 0,1 % SDS i 30 minutter ved 60 °C for en probe >100 nukleotider lang. De høyt stringente hybridiseringsbetingelsene som er beskrevet ovenfor for et polynukleotid av definert størrelse kan bli tilpasset av en fagmann på

området for lengre eller kortere oligonukleotider, i overensstemmelse med prosedyrene som er beskrevet i Sambrook et al., (Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 3.utgave, 2001).

5 Oppfinnelsen vedrører også en vektor som omfatter en nukleinsyre som beskrevet i oppfinnelsen.

Oppfinnelsen er især rettet på klonings- og/eller ekspresjonsvektorer som inneholder en slik nukleotidsekvens.

Vektorene ifølge oppfinnelsen inneholder fortrinnsvis elementer som tillater uttrykkingen og/eller utskillingen av nukleotidsekvenser i en gitt vertscelle.

10 Vektoren må slik inneholde en promoter, translasjonsstart- og termineringssignaler, i tillegg til passende transkripsjonsreguleringsregioner. Den må være i stand til å bli opprettholdt på en stabil måte i vertscellen og kan eventuelt ha spesifikke signaler som spesifiserer utskilling av det translaterte proteinet. Disse ulike elementene er valgt og optimalisert av en fagmann på området i overensstemmelse med vertscellen

15 som benyttes. Til dette formålet kan nukleotidsekvensen bli innsatt i selvreplicherende vektorer i den valgte verten eller være integrative vektorer i den valgte verten.

Slike vektorer blir fremstilt med fremgangsmåter som typisk benyttes av fagfolk på området og de resulterende klonene kan bli introdusert i en passende vert ved hjelp

20 av standardfremgangsmåter slik som lipofeksjon, elektroporering, varmesjokk eller kjemiske fremgangsmåter.

Vektorene er f.eks. vektorer av plasmid- eller virusopphav. De blir benyttet for å transformere vertsceller for å klon og uttrykke nukleotidsekvenser ifølge oppfinnelsen.

25 Oppfinnelsen omfatter også vertsceller som er transformert med eller som omfatter en vektor som beskrevet i foreliggende oppfinnelse.

Vertscellen kan bli valgt blant prokaryote eller eukaryote systemer slik som f.eks. bakterieceller, men også gjærceller eller dyreceller. Især pattedyrceller, insekt- eller planteceller kan også bli benyttet.

30 Oppfinnelsen vedrører også dyr forskjellig fra menneske som har en transformert celle ifølge oppfinnelsen.

Et annet aspekt av oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av et antistoff ifølge oppfinnelsen, eller ett av dets funksjonelle fragmenter, som er kjennetegnet ved at nevnte fremgangsmåte omfatter de følgende trinnene:

- 35
- a) dyrkingen i et medium av og de passende dyrkningsbetingelsene for en vertscelle ifølge oppfinnelsen, og
 - b) gjenvinningen av nevnte antistoff, eller ett av dets funksjonelle fragmenter, som slik er produsert i kulturmediet eller fra nevnte dyrkede celler.

- De transformerte cellene ifølge oppfinnelsen kan anvendes i fremgangsmåter for fremstillingen av rekombinante polypeptider ifølge oppfinnelsen. Fremgangsmåter for fremstillingen av polypeptid ifølge oppfinnelsen i rekombinant form, som er kjennetegnet ved at nevnte fremgangsmåter benytter en vektor og/eller celle
- 5 transformert med en vektor ifølge oppfinnelsen, er også omfattet i foreliggende oppfinnelse. Fortrinnsvis blir en celle som er transformert med en vektor ifølge oppfinnelsen dyrket ved betingelser som tillater uttrykkingen av det tidligere nevnte polypeptidet og gjenvinning av nevnte rekombinante peptid.
- Som allerede nevnt kan vertscellen bli valgt blant prokaryote eller eukaryote
- 10 systemer. Spesifikt er det mulig å identifisere nukleotidsekvensene ifølge oppfinnelsen som fremmer utskilling i et slikt prokaryot eller eukaryot system. En vektor ifølge oppfinnelsen som bærer en slik sekvens kan slik bli benyttet fordelaktig for produksjonen av rekombinante proteiner som skal skilles ut. Faktisk vil rensingen av disse rekombinante proteinene av interesse bli fremmet ved det
- 15 faktumet at de foreligger i supernatanten i cellekulturen heller enn inne i vertscellene.
- Polypeptidene ifølge oppfinnelsen kan også bli fremstilt ved kjemisk syntese. En fagmann på området kjenner til fremgangsmåter for kjemisk syntese, slik som fastfase-teknikker (se bestemt Steward et al., 1984, Solid phase peptide synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2.utgave) eller partielle fastfase-teknikker, ved kondensering av fragmenter eller ved konvensjonell syntese i løsning.
- 20 Polypeptider som er oppnådd ved kjemisk syntese og som er i stand til å inneholde tilsvarende ikke-naturlige aminosyrer er også omfattet i oppfinnelsen.
- Antistoffene, eller de avledede forbindelsene eller de funksjonelle fragmentene av samme, som det er sannsynlig kan bli oppnådd ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er også omfattet i foreliggende oppfinnelse.
- 25 Ifølge nok et annet aspekt vedrører foreliggende beskrivelse et antistoff som beskrevet ovenfor, kjennetegnet ved at det i tillegg er i stand til å binde spesifikt til en human kjemokinfamilie-reseptor og/eller i stand til spesifikt å inhibere
- 30 signaliseringen av en slik reseptor.
- Ifølge en ny utførelsesform vedrører foreliggende beskrivelse også et antistoff, eller dets funksjonelle fragmenter, bestående av et antistoff som er bispesifikt i betydningen av at det omfatter et andre motiv som er i stand til å interagere med enhver reseptor som er implisert i utviklingen av tumorer, slik som f.eks. VEGFR, VEGF, EGFR, IGF-1R, HER2neu, HGF, cMET, FGF, tetraspaniner, integriner,
- 35 CXCR4 (annet enn antistoffet ifølge foreliggende oppfinnelse, dvs., rettet på en annen epitop), CXCR7 eller CXCR2.
- De bispesifikke eller bifunksjonelle antistoffene utgjør en andre generasjon av monoklonale antistoffer der to ulike variabelregioner blir kombinert i det samme
- 40 molekylet (Hollinger & Bohlen, 1999, Cancer and metastasis, rev. 18:411-419). Deres anvendelse ble demonstrert i både diagnostiske og terapeutiske domener

- relativt deres kapasitet til å rekruttere nye effektorfunksjoner eller målsøke flere molekyler på overflaten av tumorceller, og slike antistoffer kan bli oppnådd med kjemiske fremgangsmåter (Glennie MJ et al., 1987, J. Immunol. 139, 2367-2375, Repp R., et al., 1995, J. Hemat., 377-382) eller somatiske fremgangsmåter (Staerz U.D. og Bevan M.J., 1986, PNAS 83, 1453-1457, Suresh M.R., et al., 1986, Method Enzymol., 121:210-228) men også fortrinnsvis ved genetiske endringsteknikker som gjør det mulig å tvinge heterodimerisering og slik fremme rensingen av antistoffet som søkes (Merchand et al., 1998, Nature Biotech., 16:677-681).
- Disse bispesifikke antistoffene kan bli konstruert som hele IgG, bispesifikk Fab'2, Fab'PEG, dialegemer eller bispesifikk scFv, men også som et tetravalent, bispesifikt antistoff der to bindings seter er til stede for hvert antigen som er målsøkt (Park et al., 2000, Mol. Immunol., 37(18):1123-30) eller fragmentene av samme som beskrevet ovenfor.
- I tillegg til et økonomisk fortrinn gitt at produksjonen og administreringen av et bispesifikt antistoff er billigere enn produksjonen av to spesifikke antistoffer, så har anvendelsen av slike bispesifikke antistoffer fordelene av å redusere behandlingens toksisitet. Faktisk gjør anvendelsen av et bispesifikt antistoff det mulig å minske den totale mengden sirkulerende antistoffer og dermed eventuell toksisitet.
- I en foretrukket utførelsesform er det bispesifikke antistoffet et bivalent eller tetravalent antistoff.
- Til slutt vedrører foreliggende oppfinnelse antistoffet som er beskrevet ovenfor, eller dets avledede forbindelser eller dets funksjonelle fragmenter, for anvendelse som et legemiddel.
- Oppfinnelsen vedrører også en farmasøytisk sammensetning som omfatter som en aktiv ingrediens en forbindelse bestående av et antistoff ifølge oppfinnelsen, eller ett av dets funksjonelle fragmenter. Fortrinnsvis er nevnte antistoff tilsatt en eksipient og/eller en farmasøytisk akseptabel bærer.
- Oppfinnelsen vedrører også en sammensetning som er kjennetegnet ved at den omfatter, i tillegg, som et kombinasjonsprodukt til anvendelse på en samtidig, separert eller forlenget måte, et antitumor-antistoff forskjellig fra et antistoff rettet mot CXCR4.
- Ifølge nok en annen utførelsesform vedrører foreliggende oppfinnelse også en farmasøytisk sammensetning som beskrevet ovenfor som minst omfatter en andre antitumorforbindelse valgt blant forbindelsene som er i stand til spesifikt å inhibere tyrosinkinaseaktiviteten til reseptorer slik som IGF-IR, EGFR, HER2/neu, cMET, VEGFR eller VEGF, eller enhver annen antitumorforbindelse som er kjent for en fagmann på området.
- I et andre foretrukket aspekt av oppfinnelsen kan nevnte andre forbindelse bli valgt blant antistoffene antiEGFR, antiGF-IR, antiHER2/neu, anticMET, VEGFR, VEGF osv., isolert, eller deres funksjonelle fragmenter og utledede forbindelser, som er i

stand til å inhibere den proliferative og/eller anti-apoptotiske og/eller angiogene og/eller induktive aktiviteten til metastatisk disseminasjon som fremmes ved nevnte reseptorer.

Også passende å nevne er antiCD20-antistoffer slik som rituximab, ibritumomab
 5 eller tositumomab, antiCD33-antistoffer slik som gemtuzumab eller lintuzumab, antiCD22-antistoffer slik som epratuzumab, antiCD52-antistoffer slik som alemtuzumab, antiEpCAM-antistoffer slik som edrecolomab, Ch 17-1A eller IGN-101, antiCTP21- eller 16-antistoffer slik som Xactin, antiDNA-Ag-antistoffer slik som ¹³¹I-Cotara TNT-1, antiMUC1-antistoffer slik som pentumomab eller R1150,
 10 antiMUC18-antistoffer slik som ABX-MA1, antiGD3-antistoffer slik som mitumomab, antiECA-antistoffer slik som CeaVac eller labetuzumab, antiCA125-antistoffer slik som OvaRex, antiHLA-DR-antistoffer slik som apolizumab, antiCTLA4-antistoffer slik som MDX-010, antiPSMA-antistoffer slik som MDX-070, ¹¹¹In & ⁹⁰Y-J591, ¹⁷⁷Lu J591, J591-DM1, antiLewis Y-antistoffer slik som
 15 IGN311, antiangiogenese-antistoffer slik som AS1405 og 90YmuBC1, antiTrail-R1-antistoffer slik som TRAIL R1mAb eller TRAIL R2mAb.

En annen utførelsesform som er komplementær med oppfinnelsen består av en sammensetning som beskrevet ovenfor sammensatt av, i tillegg, som et
 20 kombinasjons- eller konjugeringsprodukt for samtidig, separat eller forlenget anvendelse, et cytotoxisk/cytostatisk middel.

«Samtidig anvendelse» betyr administreringen av begge forbindelser i sammensetningen omfattet i en enkelt doseringsform.

«Separat anvendelse» betyr administrering, samtidig, av begge forbindelser i sammensetningen, omfattet i distinkte doseringsformer.

25 «Forlenget anvendelse» betyr den suksessive administreringen av begge forbindelser i sammensetningen, som hver er omfattet i en distinkt doseringsform.

Generelt øker sammensetningen ifølge oppfinnelsen vesentlig kreftbehandlingseffektivitet. Med andre ord blir den terapeutiske effekten av antistoffet ifølge oppfinnelsen forsterket på en uventet måte ved administreringen
 30 av cytotoxisk middel. Et annet påfølgende fortrinn som fremkalles ved en sammensetning ifølge oppfinnelsen vedrører muligheten for å benytte lavere effektive doser av den aktive ingrediensen, for slik å gjøre det mulig å unngå eller redusere risikoen for fremkomsten av bivirkninger, spesielt effekten av det cytotoxiske middelet. Videre gjør denne sammensetningen det mulig å oppnå den
 35 forventede terapeutiske effekten raskere.

«Terapeutisk antikreftmiddel» eller cytotoxisk middel» betyr et stoff som når det administreres til en pasient behandler eller forebygger utviklingen av kreft hos pasienten. Ikke-begrensende eksempler på slike midler inkluderer «alkylerende»
 40 midler, antimetabolitter, antitumor-antibiotika, mitotiske inhibitorer, inhibitorer av kromatinfunksjon, antiangiogene midler, antiøstrogener, antiandrogener og immunmodulatorer.

Slike midler er f.eks. sitert i VIDAL på siden som gjelder forbindelser som er relatert til onkologi og hematologi under overskriften «Cytotoksic», de cytotoksiske forbindelsene som er sitert ved referanse til dette dokumentet er her sitert som foretrukne, cytotoksiske midler.

- 5 «Alkylerende middel» refererer til ethvert stoff som kan binde kovalent til eller som kan alkylere ethvert molekyl, fortrinnsvis en nukleinsyre (f.eks. DNA) i en celle. Eksempler på slike alkylerende midler inkluderer nitrogensenneper slik som mekloretamin, klorambucil, melfalan, klorhydrat, pipobroman, prednimustin, dinatriumfosfat eller estramustin, oksafosforiner slik som syklofosamid, altretamin, 10 trofosamid, sulfofosamid eller ifosamid, aziridiner eller etyleniminer slik som tiotepa, trietylenamin eller altretamin, nitrosoureaer slik som carmustin, streptozocin, fotemustin eller lomustin, alkylsulfonater slik som busulfan, treosulfan eller improsulfan, triazener slik som dacarbazin, eller platinakomplekser slik som cisplatin, oksaliplatin eller karboplatin.
- 15 «Antimetabolitt» referer til et stoff som blokkerer veksten og/eller cellulær metabolisme ved å interferere med visse aktiviteter, generelt DNA-syntese. Eksempler på antimetabolitter inkluderer metotreksat, 5-fluoruracil, floxuridin, 5-fluordeoksyuridin, capecitabin, cytarabin, fludarabin, cytosin-arabinosid, 6-merkaptopurin (6-MP), klordesoksyadenosin, 5-azacytidin, gemcitabin, kladrabin, 20 deoksykoformycin og pentostatin.
- «Antitumor-antibiotikum» refererer til en forbindelse som kan forhindre eller inhibere syntesen av DNA, RNA og/eller proteiner. Eksempler på slike antitumorantibiotika inkluderer doksorubicin, daunorubicin, idarubicin, valrubicin, mitoksantron, dactinomycin, mitramycin, plicamycin, mitomycin C, bleomycin og 25 procarbazin.
- «Mitotiske inhibitorer» forhindrer den normale progresjonen i cellyklusen og mitose. Generelt er mikrotubuli-inhibitorer eller «taxoider» slik som paclitaxel og docetaxel i stand til å inhibere mitose. Vinca-alkaloidene, slik som vinblastin, vincristin, vindesin og vinorelbin, er også i stand til å inhibere mitose.
- 30 «Kromatin-inhibitorer» eller «topoisomeraseinhibitorer» er stoffer som inhiberer den normale funksjoneringen til proteiner som former kromatin, slik som topoisomerase-I og -II. Eksempler på slike inhibitorer inkluderer, for topoisomerase-I, camptotecin og dens derivater, slik som irinotecan eller topotecan, for topoisomerase-II, etoposid, etoposidfosfat og teniposid.
- 35 Et «antiangiogent middel» er ethvert legemiddel, forbindelse, stoff eller middel som inhiberer veksten av blodkarene. Eksempler på antiangiogene midler inkluderer, uten å være begrensende, razoxin, marimastat, batimastat, prinomastat, tanomastat, ilomastat, CGS-27023A, halofuginon, COL-3, neovastat, BMS-275291, talidomid, CDC 501, DMXAA, L-651582, squalamin, endostatin, SU5416, SU6668, 40 interferon-alfa, EMF121974, interleukin-12, IM862, angiostatin og vitaxin.

«Antiøstrogen» eller «østrogenantagonist» refererer til ethvert stoff som minsker, antagoniserer eller inhiberer østrogenvirkning. Eksempler på slike midler er tamoxifen, toremifen, raloxifen, droloxifen, idoxyfen, anastrozol, letrozol og exemestan.

- 5 «Antiandrogen» eller «androgenantagonist» refererer til ethvert stoff som reduserer, antagoniserer eller inhiberer androgenvirkning. Eksempler på antiandrogener inkluderer flutamid, nilutamid, bicalutamid, spirinolakton, cyproteronacetat, finasterid og cimitidin.

- 10 Immunmodulatorer er stoffer som stimulerer immunsystemet. Eksempler på immunmodulatorer inkluderer interferon, interleukiner slik som aldesleukin, OCT-43, denileukin difitox eller interleukin-2, tumornekrosefaktorer slik som tasonermin, eller andre typer immunmodulatorer slik som lentinan, sizofiran, roquinimex, pidotimod, pegademase, tymopentin, poly I:C eller levamisol i kombinasjon med 5-fluoruracil.

- 15 For ytterligere detaljer kan fagmannen på området referer til manualen som er publisert av the French Association of Therapeutic Chemistry Teachers med tittelen «Therapeutic chemistry, vol.6, Antitumor drugs and perspectives in the treatment of cancer, TEC and DOC edition 2003 [på fransk]».

- 20 I en spesielt foretrukket utførelsesform er nevnte sammensetning som et kombinasjonsprodukt kjennetegnet ved at nevnte cytotoksiske middel er bundet kjemisk til nevnte antistoff for anvendelse samtidig.

I en spesielt foretrukket utførelsesform er nevnte sammensetning kjennetegnet ved at nevnte cytotoksiske/cytostatiske middel er valgt blant spindel-inhibitorene eller – stabilisatorene, fortrinnsvis vinorelbin og/eller vinflunin og/eller vincristin.

- 25 For å fremme binding mellom nevnte cytotoksiske middel og antistoffet ifølge oppfinnelsen kan spacer-molekyler bli introdusert mellom de to forbindelsene for å binde, slik som poly(alkylen)glykol-polyetylglykol eller aminosyrene, eller, i en annen utførelsesform, nevnte cytotoksiske midlers aktive derivater, på hvilke det har blitt introdusert funksjoner som er i stand til å reagere med nevnte antistoff, bli
30 benyttet. Disse bindingsteknikkene er velkjente for en fagmann på området og vil ikke bli diskutert i større detalj i foreliggende beskrivelse.

- Andre EGFR-inhibitorer inkluderer uten begrensning monoklonale antistoffer C225 og antiEGFR 22Mab (ImClone Systems Inc.), ABX-EGF (Abgenix/Cell Genesys), EMD-7200 (Merck KgaA) eller forbindelsene ZD-1834, ZD-1838 og ZD-1839
35 (AstraZeneca), PKI-166 (Novartis), PKI-166/CGP-75166 (Novartis), PTK 787 (Novartis), CP 701 (Caphalon), flunomid (Pharmacia/Sugen), CI-1033 (Warner Lambert Parke Davies), CI-1033/PD 183, 805 (Warner Lampert Parke Davies), CL-387, 785 (Wyeth-Ayerst), BBR-1611 (Boehringer Mannheim GMBH/Roche), Naamidin A (Bristol-board Myers Squibb), RC-3940-II (Pharmacia), BIBX-1382
40 (Boehringer Ingelheim), OLX-103 (Merck & Co), VRCTC-310 (Ventech Research), EGF-fusjonstoksin (Seragen Inc.), DAB-389 (Seragen/Lilgand)ZM-252808

(Imperial Cancer Research Fund), RG-50864 (INSERM), LFM-A12 (Parker Hughes Center Cancer), WHI-P97 (Parker Hughes Center Cancer), GW-282974 (Glaxo), KT-8391 (Kyowa Hakko) eller «EGFR-vaksinen» (York Medical/Centro og Immunologica Molecular).

- 5 Et annet aspekt av oppfinnelsen vedrører en sammensetning som er kjennetegnet ved at minst ett av nevnte antistoffer, eller de funksjonelle fragmentene av samme, er kombinert eller konjugert med et cellulært toksin og/eller radioisotop.

Fortrinnsvis er nevnte toksin eller nevnte radioisotop i stand til å forhindre veksten eller proliferasjonen av tumorcellen, især fullstendig å inaktivere nevnte tumorcelle.

- 10 Også foretrukket er nevnte toksin et enterobakterietoksin, især Pseudomonas-eksotoksin-A.

Radioisotopene som fortrinnsvis er kombinert med terapeutiske antistoffer er radioisotoper som sender ut gammastråler, fortrinnsvis jod¹³¹, yttrium⁹⁰, gull¹⁹⁹, palladium¹⁰⁰, kobber⁶⁷, vismut²¹⁷ og antimon²¹¹. Radioisotoper som sender ut alfa- og betastråler kan også bli benyttet i terapi.

- 15 «Toksin eller radioisotop kombinert med minst ett antistoff ifølge oppfinnelsen, eller et funksjonelt fragment av samme» refererer til ethvert middel for å gjøre det mulig å binde nevnte toksin eller nevnte radioisotop til dette minst ene antistoffet, især ved kovalent binding mellom de to forbindelsene, med eller uten
- 20 introduksjonen av bindingsmolekylet.

Eksempler på midler som tillater kjemisk (kovalent), elektrostatisk, eller ikke-kovalent binding av hele eller del av konjugatets elementer inkluderer spesielt benzoquinon, karbidiimid og mer spesifikt EDC (1-etyl-3-[3-dimetyl-aminopropyl]-karbodiimid-hydroklorid), dimaleimid, ditiobis-nitrobensosyre (DTNB), N-suksinimidyl-S-acetyl-tioacetat (SATA), brobyggende midler med én eller flere grupper, med én eller flere fenylasidgrupper, som reagerer med ultrafiolette (UV)-stråler, mest foretrukket N-[-4-(azidosalisylamino)butyl]-3'-(2'-pyridylditio)-propionamid (APDP), N-suksinimidyl-3(2-pyridylditio)-propionat (SPDP) og 6-hydrazino-nikotinamid (HYNIC).

- 30 En annen form for binding, især for radioisotoper, kan bestå i anvendelsen av bifunksjonelle ion-chelaterende midler.

Eksempler på slike chelatorer inkluderer chelatorene som er avledet fra EDTA (etylendiamintetraeddiksyre) eller DTPA (dietyltriampinpentaeddiksyre) som ble utviklet for å binde metaller, spesielt radioaktive metaller, med immunoglobuliner.

- 35 Slik kan DTPA og dens derivater bli substituert på karbonkjeden med ulike grupper for på en slik måte å øke stabiliteten og rigiditeten til ligand-metall-komplekset (Krejcarek et al., 1977, Brechbiel et al., 1991, Gansow 1991, US patent 4,831,175).

F.eks. oppviser DTPA (dietyltriampinpentaeddiksyre) og dens derivater, som lenge har blitt hyppig benyttet i legemidler og biologi enten i sin frie form eller i

40 kompleks med et metallion, den oppsiktsvekkende egenskapen å danne stabile

chelater med metallioner som kan bli koblet med proteiner av terapeutisk eller diagnostisk interesse, slik som antistoffer, for utviklingen av radio-immuno-konjugater for kreftterapi (Meases et al., 1984, Gansow et al., 1990).

- 5 Nevnte minst ene antistoff ifølge oppfinnelsen som danner nevnte konjugat er fortrinnsvis også valgt blant dets funksjonelle fragmenter, især fragmenter som har mistet sin Fc-komponent, slik som scFv-fragmenter.

Foreliggende oppfinnelse omfatter også anvendelsen av sammensetningen for fremstillingen av et legemiddel til forebyggingen eller behandlingen av kreft.

- 10 Foreliggende oppfinnelse vedrører også anvendelsen av et antistoff, eller et funksjonelt fragment av samme, fortrinnsvis humanisert, og/eller en sammensetning ifølge oppfinnelsen for fremstillingen av et legemiddel for inhibering av veksten til tumorceller. Generelt vedrører foreliggende oppfinnelse anvendelsen av et antistoff, eller et funksjonelt fragment av samme, fortrinnsvis humanisert, og/eller av en sammensetning, for fremstillingen av et legemiddel til kreftforebygging eller
15 kreftbehandling.

Foretrukne kreftformer som kan bli forebygget og/eller behandlet inkluderer prostatakreft, osteosarkom, lungekreft, brystkreft, endometriekreft, kolonkreft, multippelt myelom, ovariekreft, pankreaskreft eller enhver annen kreftform.

- 20 Oppfinnelsen vedrører også anvendelsen av et antistoff, eller en avledet forbindelse eller et funksjonelt fragment av samme, og/eller av en sammensetning som beskrevet ovenfor for fremstillingen av et legemiddel for modulering av CXCR4-aktivitet i en celle.

- Også tilkjennegitt her er anvendelsen av antistoffet som beskrevet i en diagnostisk fremgangsmåte, fortrinnsvis in vitro, av sykdommer relatert til CXCR4-uttrykkningsnivå. Fortrinnsvis vil nevnte CXCR4-proteinrelaterte sykdommer i
25 nevnte diagnostiske fremgangsmåte være kreftformer.

- Slik kan antistoffene ifølge oppfinnelsen, eller de funksjonelle fragmentene av samme, bli benyttet i en fremgangsmåte for påvisningen og/eller kvantifiseringen av CXCR4-protein i en biologisk prøve in vitro, især for diagnostiseringen av
30 sykdommer som er assosiert med unormal uttrykking med dette proteinet, slik som kreftformer, der nevnte fremgangsmåte omfatter de følgende trinn:

- a) plassere den biologiske prøven i kontakt med et antistoff ifølge oppfinnelsen, eller et funksjonelt fragment av samme,
- b) vise antigen-antistoff-komplekset som eventuelt dannes.

- 35 Slik vedrører foreliggende beskrivelse også sett eller tilbehør for implementeringen av en fremgangsmåte som beskrevet, omfattende følgende elementer:

- a) et polyklonalt eller monoklonalt antistoff ifølge oppfinnelsen,
- b) eventuelt reagenser for konstituering av mediet som er fordelaktig for immunologiske reaksjoner,

- c) eventuelt reagenser som avslører antigen-antistoff-kompleksene som produseres av den immunologiske reaksjonen.

Fordelaktig kan antistoffene eller funksjonelle fragmenter av samme bli immobilisert på en bærer, især en protein-chip.

- 5 Fordelaktig kan protein-chip'en bli benyttet i settene eller tilbehør som er nødvendig for påvisning og/eller kvantifisering av CXCR4-protein i en biologisk prøve.

10 Det må påpekes at uttrykket «biologisk prøve» her vedrører prøver tatt fra e levende organisme (især blod, vev, organ eller andre prøver tatt fra et pattedyr, især menneske) eller enhver prøve som det er sannsynlig inneholder ett slikt CXCR4-protein (slik som en prøve av celler, transformerte dersom nødvendig).

Nevnte antistoff, eller et funksjonelt fragment av samme, kan foreligge i formen av et immunokonjugat eller av et merket antistoff for å kunne oppnå et påvisbart og/eller kvantifiserbart signal.

- 15 De merkede antistoffene ifølge oppfinnelsen, eller de funksjonelle fragmentene av samme, inkluderer f.eks. antistoffkonjugater (immunokonjugater) som f.eks. kan bli kombinert med enzymer slik som peroksidase, alkalisk fosfatase, α -D-galaktosidase, glukoseoksidase, glukoseamylase, karbonanhydrase, acetylkolinesterase, lysozym, malatdehydrogenase eller glukose-6-fosfatdehydrogenase eller med et molekyl slik
20 som biotin, digoksigenin eller 5-brom-desoksyuridin. Fluorescerende merker kan også bli kombinert med antistoffene ifølge oppfinnelsen eller funksjonelle fragmenter av samme, inkludert især fluorescein og dets derivater, fluorkrom, rhodamin og dens derivater, grønt fluorescerende protein (GFP), dansyl, umbelliferon osv. I slike konjugater kan antistoffene ifølge oppfinnelsen eller
25 funksjonelle fragmenter av samme bli fremstilt ved fremgangsmåter som er kjent for fagmannen på området. De kan bli bundet med enzymer eller fluorescensmerker direkte, via en spacergruppe eller en koblingsgruppe slik som polyaldehyd, glutaraldehyd, etylendiamintetraeddiksyre (EDTA) eller
30 dietylentriaminpentaeddiksyre (DPTA), eller i nærvær av bindingsmidler slik som de som er nevnt ovenfor for terapeutiske konjugater. Konjugater som bærer fluoresceinmerker kan bli fremstilt ved reaksjon med et isotiocyanat.

- Andre konjugater kan også inkludere kjemiluminescensmerker slik som luminol og dioksetan, bioluminescensmerker slik som luciferase og luciferin, eller radioaktive merker slik som jod¹²³, jod¹²⁵, jod¹²⁶, jod¹³³, brom⁷⁷, technetium^{99m}, indium¹¹¹,
35 indium^{113m}, gallium⁶⁷, gallium⁶⁸, ruthenium⁹⁵, ruthenium⁹⁷, ruthenium¹⁰³, ruthenium¹⁰⁵, kvikksølv¹⁰⁷, kvikksølv²⁰³, rhenium^{99m}, rhenium¹⁰¹, rhenium¹⁰⁵, scandium⁴⁷, tellur^{121m}, tellur^{122m}, tellur^{125m}, thulium¹⁶⁵, thulium¹⁶⁷, thulium¹⁶⁸, fluor¹⁸, yttrium¹⁹⁹ og jod¹³¹. Eksisterende fremgangsmåter som er kjent for fagmannen på området for binding av radioisotoper til antistoffer, enten direkte
40 eller via et chelaterende middel slik som EDTA eller DTPA nevnt ovenfor, kan bli benyttet som diagnostiske radioisotoper. Nevnes bør slik merking med [¹²⁵I]Na ved

hjelp av kloramin-T-teknikken (Hunter W.M. og Greenwood F.C. (1962) Nature 194:495), merking med technetium^{99m} som beskrevet av Crockford et al (US patent 4,424,200) eller bundet via DTPA som beskrevet av Hnatowich (US patent 4,479,930).

- 5 Oppfinnelsen vedrører også anvendelsen av et antistoff ifølge oppfinnelsen for fremstillingen av et legemiddel for den spesifikke målrettingen av en forbindelse som er biologisk aktiv mot celler som uttrykker eller overuttrykker CXCR4.

I betydningen i foreliggende beskrivelse er «en biologisk aktiv forbindelse» enhver forbindelse som er i stand til å modulere, især inhibere, cellulær aktivitet, især
10 vekst, proliferasjon, transkripsjon og gen-translasjon.

Oppfinnelsen vedrører også et in vivo-diagnostisk reagens sammensatt av et antistoff ifølge oppfinnelsen, eller et funksjonelt fragment av samme, fortrinnsvis merket, især radiomerket, og dets anvendelse i medisinsk synliggjøring, især for påvisningen av kreft relatert til den cellulære uttrykkingen eller overuttrykkingen av
15 CXCR4.

Oppfinnelsen vedrører også en sammensetning som et kombinasjonsprodukt eller en anti-CXCR4/toksinkonjugat eller radioisotop, ifølge oppfinnelsen, benyttet som legemiddel.

Fortrinnsvis vil nevnte sammensetning som et kombinasjonsprodukt eller nevnte
20 konjugat være supplert med en eksipient og/eller en farmasøytisk vehikkel.

I foreliggende beskrivelse betyr «farmasøytisk vehikkel» en forbindelse, eller en kombinasjon av forbindelser, som går inn i en farmasøytisk sammensetning som ikke forårsaker sekundærreaksjoner og som f.eks. fremmer administrering av de aktive forbindelsene, øker levetiden og/eller effektiviteten i organismen, øker dens
25 løselighet i løsning eller forbedrer dens lagring. Slike farmasøytiske bærere er velkjente og vil bli tilpasset av en fagmann på området i overensstemmelse med karakteren og administreringsveien for den aktive forbindelsen som er valgt.

Fortrinnsvis vil slike forbindelser bli administrert systemisk, især intravenøst, intramuskulært, intradermalt, intraperitonealt, subkuttant eller oralt. Mer foretrukket
30 vil sammensetningen som er sammensatt av antistoffet ifølge oppfinnelsen bli administrert i flere doser fordelt likt over tid.

Deres administreringsveier, doseringsskjemaer og optimale galeniske former kan bli bestemt i overensstemmelse med kriteriene som generelt tas hensyn til når det etableres en behandling som er tilpasset en pasient, slik som f.eks. pasientens alder
35 eller kroppsvekt, alvorligheten av pasientens generelle tilstand, pasientens toleranse for behandlingen og de opplevde bivirkningene.

Slik vedrører oppfinnelsen anvendelsen av et antistoff, eller ett av dets funksjonelle fragmenter, for fremstillingen av et legemiddel for den spesifikke målrettingen av en forbindelse som er biologisk aktiv mot celler som uttrykker eller overuttrykker
40 CXCR4.

Andre karakteristika og fortrinn ved oppfinnelsen fremkommer ytterligere i beskrivelsen med eksemplene og figurene hvis forklaringer er gitt nedenfor.

Figurforklaringer

- 5 Figurene 1A og 1B viser henholdsvis CXCR4- og CXCR2-uttrykking i kreftceller ved qPCR-analyse.
- Figur 2 viser CXCR4- og CXCR2-proteinuttrykking i kreftceller ved FACS-analyse.
- Figurene 3A og 3B viser konkurransen for spesifikk [125 I]SDF1-binding ved umerket SDF-1 (figur 3A) og 414H5 og 515H7 (figur 3B) på cellulære membraner
10 på CHO-K1-celler som stabilt uttrykker humant villtype-CXCR4 (T: total binding, NS: ikke-spesifikk binding).
- Figur 4A og 4B viser moduleringen av G-proteinaktivering ved 515H7-Mab og 414H5-Mab (figur 4A) ved overvåkning av [35 S]GTP γ S-bindingsresponser på villtype.CXCR4-reseptor stabilt uttrykt i NIH-3T3-celler.
- 15 Figur 5 viser moduleringen av G-proteinaktivering ved anti-CXCR4-Mab 414H5 og 515H7 ved overvåkning av [35 S]GTP γ S-bindingsresponser på humane HeLa-tumorceller stimulert med SDF-1 (10 og 100 nM).
- Figurene 6A-6F viser moduleringen av CXCR4-reseptorassosiering med ulike interaksjonspartnere ved SDF-1 og ved 414H5 og 515H7-Mab via
20 bioluminescensresonansenergioverføring (BRET)-tilnærming i HEK293-celler (figur 6A og 6B: CXCR4:CXCR4 homodimerisering, Figur 6C og 6D: CXCR2:CXCR4 heterodimerisering og figur 6E og 6F: CXCR4-mediert rekruttering av β -arrestin).
- Figurene 7A og 7B viser inhiberingen av forskolin-stimulert cAMP-produksjon ved
25 SDF-1 og 414H5 og 515H7-Mab i NIH3T3-celler som stabilt uttrykker CXCR4-reseptor.
- Figur 8 viser moduleringen av G-proteinaktivering ved anti-CXCR4-Mab 414H5 og 515H7 ved overvåkning av [35 S]GTP γ S-bindingsresponser på konstitutivt aktiv mutant Asn¹¹⁹Ser-CXCR4-reseptor som stabilt uttrykkes i CHO-K1-celler.
- 30 Figur 9 illustrerer inhiberingen av SDF-1-indusert HeLa-celleproliferasjon ved Mab 414H5 in vitro.
- Figur 10A og 10B viser inhiberingen av SDF-1-indusert U937-cellemigrering ved CXCR4-Mab 414H5 (figur 10A) og Mab 515H7 (figur 10B) in vitro.
- Figur 11 viser inhibering av NDA-MB-231-xenograft-tumorvekst ved anti-CXCR4-
35 Mab 414H5 (A) og 515H7 (B) i Nod/Scid-mus.
- Figur 12 viser anti-CXCR4-Mab 414H5-aktiviteten i U937 Nod/Scid-museoverlevelsmodell.

Figurene 13A-13C viser den SDF-1-induserte kalsiumfrigjøringsinhiberingen ved anti-CXCR4-Mag 515H7 i CHO-CXCR4-celler (figur 13A) og MDA-MB-231 (figur 13B), U937 (figur 13C)-kreftceller.

Figur 14 viser inhiberingen av T-celle KARPAS 299 xenograft-tumor i Nod/Scid-mus ved 414H5.

Figur 15 viser aktiviteten til murin anti-CXCR4-Mab 515H7 i U937-Nod/Scid-museoverlevelsesmodell.

Figur 16 viser aktiviteten til murint anti-CXCR4-Mab m515H7 i inhibering av T-celle KARÅAS 299 xenograft-tumorekst i Nod/Scid-mus.

Figur 17 viser konkurransen for spesifikk [¹²⁵I]SDF1-binding ved murint m414H5 og m515H7-Mab og kimær c414H5 og c515H7-Mab på cellulære membraner på CHO-K1-celler som stabilt uttrykker human villtype-CXCR4 (T: total binding, NS: ikke-spesifikk binding).

Figur 18 viser moduleringen av G-proteinaktivering ved murint m414H5 og m515H7-Mab og ved kimær c414H5 og c515H7-Mab ved overvåkning av [³⁵S]GTPγS-bindingsresponser på villtype-CXCR4-reseptor stabilt uttrykt i NIH-3T3-celler stimulert med SDF-1 (10 nM).

Figur 19 viser moduleringen av G-proteinaktivering ved et murint anti-CXCR4-Mab m414H5 og m515H7 og kimær c414H5 og c515H7-Mab ved overvåkning av [³⁵S]GTPγS-bindingsresponser på HeLa-tumorceller stimulert med SDF-1 (10 nM).

Figurene 20A-20C viser moduleringen av CXCR4-reseptorassosiasjon med ulike interaksjonspartnere ved SDF-1 og ved m414H5-, c414H5-, m515H7- og c515H7-Mab via bioluminescensresonansenergioverføring (BRET)-tilnærming i HEK293-celler. (figur 20A: CXCR4:CXCR4 homodimerisering, Figur 20B: CXCR2:CXCR4 heterodimerisering og figur 20C: CXCR4-mediert rekruttering av β-arrestin).

Figurene 21A og 21B viser inhiberingen av SDF-1-indusert kalsiumfrigjøring i CHO-CXCR4-celler (figur 21A) og U937-celler (figur 21B).

Figur 22A og 22B viser inhiberingen av SDF-1-induserte U937-celle migrering ved CXCR4-Mab m414H5 og c414H5 (figur 22A) og m515H7 og c515H7 (figur 22B) in vitro.

Figur 23 viser aktiviteten til den anti-CXCR4-mimære Mab c414H5 og c515H7 i U937-Nod/Scid-museoverlevelsesmodell.

Eksempler

Eksempel 1: Uttrykking av CXCR4 og CXCR2 i kreftceller

-Q-PCR-analyse:

For å kvantifisere den relative uttrykkingen av CXCR4 og CXCR2 i ulike kreftcellelinjer ble en sanntid-RT-PCR benyttet.

- RNA-prøver ble ekstrahert fra ulike cellelinjer ved å benyttet RNeasy Mini eller Midi-protokoller (Qiagen Corporation, Frankrike). RNA-prøvene ble deretter kontrollert ved å benytte det automatiserte Experion-elektroforesesystemet (BIO-RAD Corporation, Frankrike) og viste en god kvalitet/integritet. Ett µg av hver
- 5 RNA-prøve ble konvertert til cDNA-templat ved å benytte iScript cDNA Synthesis kit (BIO-RAD Corp., Frankrike). cDNA-nivåer ble kvantifisert ved å benytte qPCR med enten TaqMan-probe for CXCR2 eller SYBERGreen for CXCR4.
- Sammenligning av prøver krever normalisering, så slik ble den interne referansen RPL0 introdusert. TaqMan-prober (benyttet til CXCR2) hadde et 5' FAM-
- 10 reportermerke og en 3' TAMRA-stoppgruppe. PCR-enzymet ble aktivert ved oppvarming i 2 minutter ved 50 °C og 10 minutter ved 95 °C. En tottrinnsprosedyre ble benyttet, 15 sekunder ved 95 °C og 1 minutt ved 62 °C i 40 eller 45 sykluser i en PCR-miks inneholdende 5 µl cDNA-templat (fortynning 1/20), 1 x qPCR Mastermix (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems Corp.,
- 15 Branchburg New Jersey, USA), 50 til 900 nM med hver primer og 50 til 100 nM probe i et totalvolum på 50 µl. Alle reaksjoner ble utført ved å benytte iCycler-instrument (BIO-RAD Corp.), Q-PCR tillot å bestemme syklusgrense (Ct). Jo mindre Ct-verdi, jo mer blir det testede genet uttrykt. Primere og probe for humant ribosomalt protein, stort, P0 var:
- 20 Forover-primer, 5'-GAAACTCTGCATTCTCGCTTCCTG-3' (SEQ ID nr. 32),
Revers-primer, 5'-AGGACTCGTTTGTACCCGTTGA-3' (SEQ ID nr. 33),
Probe, 5'-(FAM)-TGCAGATTGGCTACCCAAGTGTGCA-(TAMRA)-3' (SEQ ID nr. 34).
- Primere for human CXCR4 (kjemokinreseptor 4) var:
- 25 Forover-primer, 5'-CTCCTTCATCCTCCTGGAAATC-3' (SEQ ID nr. 35),
Revers-primer, 5'-CCAAGGAAAGCATAGAGGATGG-3' (SEQ ID nr. 36).
- Primere og prober for human CXCR2 (kjemokinreseptor 2) var:
- Forover-primer, 5'-GTGGTCATTATCTATGCCCTGG-3' (SEQ ID nr. 37),
Revers-primer, 5'-CGACCCTGCTGTATAAGATGAC-3' (SEQ ID nr. 38),
- 30 Probe, 5'-(FAM)-TATTCCTGCTGAGCCTGCTGGGAAA-(TAMRA)-3' (SEQ ID nr. 39).
- I vår sammenligningsundersøkelse ble uttrykkningen av to gener (genet som ble testet (CXCR4 eller CXCR2) og RPL0) ble kvantifisert i to ulike prøver: cellelinjen som ble testet og en referansecellelinje. Referansecellelinjen tilsvarer cellelinjen
- 35 inneholdende den laveste uttrykkningen av genet som ble kvantifisert. Sammenlignende genuttrykingsberegning ble utført ved å benytte den følgende formelen:

$$\text{Relativ genuttrykking} = (1 - E_{\text{gen}})^{-\Delta C_t(1)} / (1 + E_{\text{RPL0}})^{-\Delta C_t(2)}$$

E_{gen} = PCR-effektivitet ved å benytte primere/probe for genet som kvantifiseres

E_{RPL0} = PCR-effektivitet ved å benytte RPL0-primere/-probe

C_t = grensesyklus

5 $\Delta C_t(1) = C_{t_{\text{gen}}}(\text{cellelinje testet}) - C_{t_{\text{gen}}}(\text{referansecellelinje})$

$\Delta C_t(2) = C_{t_{\text{RPL0}}}(\text{cellelinje testet}) - C_{t_{\text{RPL0}}}(\text{referansecellelinje}).$

For hver PCR-serie ble en relativ genkvantitetsverdi beregnet, og kreftceller ble klassifisert i to grupper med hensyn på deres uttrykknivåer fra den høyeste til negativ. Alle data er vist på figurene 1A og 1B. Alle kreftceller som ble testet uttrykte CXCR4 (figur 1A) og CXCR2 bortsett fra DU145 og U-87MG for CXCR2 (figur 1B).

- *FACS-analyse:*

MDA-MB-231-, PC3- og U937-celler ble permeabiliserte og deretter inkubert med enten 10 µg/ml monoklonale anti-CXCR4-antistoffer (44717 (R&D Systems) versus sin isotype-kontroll-IgG2b (Sigma) eller 10 µg/ml monoklonale anti-CXCR2-antistoffer (anti-h-CXCR2, klon 48311, R&D Systems, Mab 331 versus sin isotype-kontroll-IgG2a). Cellene ble deretter vasket med 1% BSA/PBS/0,01 % NaN₃. Deretter ble Alexa-merkede, sekundære antistoffer tilsatt cellene og tillatt å inkuberes ved 4 °C i 20 minutter. Celler ble deretter vasket igjen to ganger. Etter den andre vaskingen ble FACS-analyse utført. Resultater av disse bindingsundersøkelsene er gitt på figur 2. slik uttrykte tumorceller slik som MDA-MB-231, PC3 og U937 både CXCR4- og CXCR2-proteiner.

Eksempel 2: Generering av monoklonale antistoffer (Mab'er) mot humant CXCR4

For å generere monoklonale antistoffer mot CXCR4 ble Balb/c-mus immunisert med rekombinante NIH3T3-celler og/eller peptider tilsvarende CXCR4-ekstracellulær N-terminale og løkker. Ved en første immuniseringen ble de 6-16 uker gamle musene immunisert én gang med antigenet i Freund's komplette adjuvans subkutan (s.c.) etterfulgt av 2 til 6 immuniseringer med antigen i ukomplett Freund's adjuvans s.c. Immunresponsen ble overvåket ved retroorbitale tapninger. Serumet ble screenet med ELISA (som beskrevet ovenfor) og mus med de høyere titerne med anti-CXCR4-antistoffer ble benyttet til fusjoner. Mus ble boostet intravenøst med antigen to dager før avlivning og fjerning av milt.

-ELISA

For å velge ut musene til produksjon av anti-CXCR4-antistoffer ble serum fra immuniserte mus testet ved ELISA. Kort fortalt ble mikrotiterplater belagt med rensert (1-41) N-terminalt peptid konjugert til BSA ved 5 µg ekvivalent peptid/ml, 100 µg/brønn inkubert ved 4 °C over natt, deretter blokkert med 250 µl/brønn med

0,5 % gelatin i PBS. Fortynninger av plasma fra CXCR4-immuniserte mus ble tilsatt hver brønn og inkubert 2 timer ved 37 °C. Platene ble vasket med PBS og deretter inkubert med et geit-anti-mus IgG-antistoff konjugert til HRP (Jackson Laboratories) i 1 time ved 37 °C. Etter vasking ble plater utviklet med TMB-substrat, reaksjonen ble stoppet 5 minutter senere ved tilsetning av 100 µl/brønn med 1M H₂SO₄. Mus som utviklet de høyeste titerne med anti-CXCR4-antistoffer ble benyttet til antistoffgenerering.

- *Generering av hybridomer som produserer Mab'er mot CXCR4*

Muse-splenocytene isolert fra Balb/c-mus som utviklet de høyeste titerne med anti-CXCR4-antistoffer ble fusjonert med PEG til en muse-myelomcellelinje Sp2/O. Celler ble platet ut ved omtrent 1x10⁵/brønn i mikrotiterplater etterfulgt av to ukers inkubering i selektivt medium inneholdende ultrakulturmedium + 2 mM L-glutamin + 1 mM natriumpyruvat + 1x HAT. Brønner ble deretter screenet med ELISA for monoklonale anti-CXCR4-IgG-antistoffer. De antistoffutskillende hybridomene ble deretter subklonet minst to ganger ved begrensingsfortynning in vitro for å generere antistoff for ytterligere analyse.

Eksempel 3: Karakterisering ved FACS-analyse av anti-CXCR4-Mab 414H5 og 515H7-bindingsspesifisitet og kreftcellelinjegjenkjenning

I dette eksperimentet ble spesifikk binding til humant CXCR4 av anti-CXCR4-Mab 414H5 og 515H7 undersøkt ved FACS-analyse.

Transfektete NIH3T3-, NIH3T3-hCXCR4-celler, MDA-MB-231-, HeLa- og U937-kreftcellelinjer ble inkubert med 10 µg/ml med monoklonalt antistoff 414H5 og 515H7. Cellene ble deretter vasket med 1 % BSA/PBS/0,01 % NaN₃. Deretter ble Alexa-merkede, sekundære antistoffer tilsatt til cellene og ble tillatt å inkubere ved 4 °C i 20 minutter. Cellene ble deretter vasket igjen to ganger. Etter den andre vasken ble FACS-analyse utført. Resultatene av disse bindingsundersøkelsene er gitt i den følgende tabell 4 som viser (Gjennomsnittlig fluorescensintensitet (MFI) oppnådd ved FACS) at anti-CXCR4-Mab 414H5 og 515H7 bandt spesifikt til human, transfektet CXCR4-NIH3T3-cellelinje mens det ikke var noen gjenkjenning av NIH3T3-opphavsceller. Disse Mab'ene var også i stand til å gjenkjenne humane kreftcellelinjer, f.eks. MDA-MB-231-brystkreftceller, promyelocytiske U937-kreftceller og HeLa-livmorhalskreftceller.

Anti-CXCR4-Mab 414H5 og 515H7 gjenkjente NIH3T3-hCXCR4-transfektant mens det ikke var noen gjenkjenning av NIH3T3-villtypeceller. Mab 414H5 og 515H7 var også i stand til å gjenkjenne kreftcellelinjer.

Tabell 4

Klon (10 µg/ml)	MFI på cellelinjer				
	NIH3T3	NIH3T3-CXCR4	MDA-MB-231	Hela	U937
414H5	21	2162	32	467	95
515H7	16	2752	239	1851	645

5 Eksempel 4: Kompetitiv binding av anti-CXCR4-Mab 414H5 og 515H7 for [¹²⁵I]SDF-1 på CHO-K1-membraner som stabilt uttrykker human CXCR4-reseptor

Denne analysen tillater å evaluere evnen til Mab 414H5 og 515H7 i å konkurrere om binding av radiomerket [¹²⁵I]SDF-1 med human CXCR4-reseptor, på enten
10 ortosteriske eller allosteriske bindingssteder.

CHO-K1-celler som stabilt og konstitutivt uttrykker human CXCR4-reseptor ble oppnådd ved transfeksjon av naive CHO-K1-celler (ATCC CCL-61) med en pattedyrekspresjonsvektor som bærer hele den kodende sekvensen for human CXCR4-reseptor (RefSeq NM_003467). Celler ble formert i komplett kulturmedium
15 (DMEM-Hams F12 supplert med 5 % føtalt kalveserum (FCS) og 500 µg/ml geneticin). Radioligandbindingseksperimenter ble utført på cellemembraner oppnådd ved mekanisk skraping av CHO/CXCR4-celler i lysisbuffer (Hepes 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM) etterfulgt av sentrifugering (10 000 g, 15 min).
[¹²⁵I]SDF-1-binding (spesifikk aktivitet: 1500 Ci/mmol) ble utført ved å benytte
20 SPA-teknologien (scintillasjonsproksimitetsanalyse – GE Healthcare). Kort forklart ble cellemembraner (30 µg/brønn) inkubert i bindingsbuffer (Hepes 20 mM, pH 7,4, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 150 mM, BSA 1 %) sammen med forbindelse for å evaluere (SDF-1 eller mAb), radioligand (1 nM) og til slutt SPA-WGA-PVT-kuler (7,3 mg/brønn). Bindingslikevekt ble nådd etter 1 time ved 25 °C. Ved
25 sentrifugering (1000 g i 10 min) ble radioaktive tellinger målt i en scintillasjonsteller (TopCount, Perkin Elmer). Ikke-spesifikk binding ble estimert i nærvær av 10 µM umerket SDF-1.

Umerket SDF-1 inhiberte dose-avhengig [¹²⁵I]SDF-1-binding med en pKi-verdi (IC₅₀ = ligandkonsentrasjon som gir 50 % inhibering av spesifikk [¹²⁵I]SDF-1-binding) på 7,75 ± 0,27 nM (n=4) (figur 3A). Under de samme eksperimentelle betingelsene konkurrerte våre anti-CXCR4-Mab'er (100 nM) effektivt om
30 [¹²⁵I]SDF-1-binding med den følgende rangorden for konkurranseeffektivitet (% inhibering av [¹²⁵I]SDF-1): 515H7 (64±3 %) 414H5 (43±4 %) (figur 3B).

Eksempel 5: Modulering av [³⁵S]GTPγS-binding på cellulære membraner som uttrykker villtype-CXCR4-reseptor ved anti_CXCR4-Mab 414H5 og 515H7

Denne funksjonelle analysen tillater overvåkning av G-proteinaktivering via human villtype-CXCR4-reseptor og dens modulering ved CXCR4-ligander og 414H5 og 515H7 Mab.

NIH3T3-celler som stabilt og konstitutivt uttrykker villtype-CXCR4-reseptor ble oppnådd som beskrevet i eksemplet ovenfor for CHO-K1-celler. HeLa (humant livmorhalskarsinom)-celler ble formert i komplett kulturmedium (EMEM supplert med 10 % FCS, 1 % L-glutamin, 2 μ bikarbonat). [³⁵S]GTPγS-binding ble utført på cellulære membraner oppnådd ved mekanisk skraping i lysisbuffer (Hepes 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM) og ytterligere sentrifugering (10 000 g, 15 min). Inkorporering og påvisning av [³⁵S]GTPγS (spesifikk aktivitet: 1000 Ci/mmol) ble utført ved å benytte SPA-teknologi (scintillasjonsproksimitetsanalyse – GE Healthcare). Kort forklart ble cellemembraner (10 μg/brønn) inkubert i bindingsbuffer (Hepes 20 mM, GDP 3 μM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) sammen med forbindelse for å evaluere (SDF-1 eller Mab av interesse), [³⁵S]GTPγS (0,2-0,4 nM) og til slutt SPA-WGA-PVT-kuler (7,3 mg/brønn). Bindingsreaksjon ble utført på 1 time ved 25 °C. Ved sentrifugering (1000 g, 10 min) ble radioaktive tellinger målt i en scintillasjonsteller (TopCount Perkin Elmer). Antagoniststyrke ble beregnet ved å benytte Cheng-Prusoff ligningen:

$$K_B = (\text{kons. Antago}) / ((EC_{50} / EC_{50}^*) - 1)$$

der EC₅₀ og EC₅₀^{*} henholdsvis er styrken til SDF-1 i fravær av og nærvær av mAb.

SDF-1 induserte en doseavhengig økning av [³⁵S]GTPγS-binding som resultatet av G-proteinaktivering ved CXCR4-reseptor. Maksimal stimulering av [³⁵S]GTPγS-binding representerer henholdsvis 167 % og 320 % over basal [³⁵S]GTPγS-binding for HeLa- og NIH3T3/CXCR4-cellemembraner. Styrken til SDF-1 var tilsvarende for begge cellelinjer og tilsvarende 41,3 ± 9,7 nM (figur 4A-4B). Ved disse eksperimentelle betingelsene var henholdsvis antagoniststyrken til Mab 414H5 og 515H7, som bestemt i NIH3T3/CXCR4-celler, 51 nM og 15 nM. Tilsvarende antagonistvirkningsevne ble observert for HeLa-celler (figur 5).

Eksempel 6: Assosiering av CXCR4 med ulike interaksjonspartnere: homo- og heterodimerisering, rekruttering av β-arrestin via en bioluminescensresonanenergioverførings (BRET)-tilnærming og effekt av Mab 414H5 og 515H7 på disse dimerene.

Denne funksjonelle analysen tillater å evaluere konformasjonsendringene induisert ved binding av SDF-1 og/eller Mab 414H5 og 515H7 til CXCR4-reseptor på nivået for CXCR4-homodimer- og CXCR2/CXCR4-heterodimerdannelse i tillegg til rekruttering av β-arrestin-2-signaliseringsproteinet.

Ekspresjonsvektorer for hver av de undersøkte interaksjonspartnerne ble konstruert som fusjonsproteiner med det tilsvarende fargestoffet (Renilla reniformis-luciferase, Rluc og gult fluorescerende protein, YFP) ved å benytte konvensjonell molekylærbiologiteknikk. To dager før utførelse av BRET-eksperimenter ble

5 HEK293-celler transient transfekterte med ekspresjonsvektorer som koder for de tilsvarende BRET-partnerne: (CXCR4/Rluc + CXCR4/YFP) for å undersøke CXCR4-homodimerisering, (CXCR4/Rluc + CXCR2:YFP) for å studere CXCR4- og CXCR2-heterodimerisering og (CXCR4/Rluc + β -arr2:YFP) for å studere CXCR4-mediert rekruttering av β -arrestin-2. Dagen etter ble celler fordelt i poly-

10 lysin-forhåndsbelagte, hvite, 96 MW-plater i komplett kulturmedium (DMEM supplert med 10 % FBS). Celler ble først dyrket ved 37 °C med 5 % CO₂ for å tillate cellefesting til platen. Celler ble deretter sultet med 200 μ l DMEM/brønn over natt. Umiddelbart før BRET-eksperiment ble DMEM fjernet og celler ble raskt vasket med PBS. Celler ble deretter inkubert i PBS i nærvær eller fravær av

15 antistoff, 10 min ved 37 °C før tilsetningen av coelenterazin H 5 μ M med eller uten SDF-1 300 nM i et sluttvolum på 50 μ l. Etter inkubering i ytterligere 10 minutter ved 37 °C ble lysemisjonsregistrering ved 485 nm og 530 nm satt i gang ved å benytte Mithras LB940 multilabel reader (Berthold) (1s/bølgelengde/brønn gjentatt 15 ganger ved romtemperatur).

20 Beregning av BRET-ratio ble utført som tidligere beskrevet (Angers et al., 2000): $((\text{emisjon}_{530\text{nm}}) - (\text{emisjon}_{485\text{nm}}) \times \text{Cf}) / (\text{emisjon}_{485\text{nm}})$, der $\text{Cf} = (\text{emisjon}_{530\text{nm}}) - (\text{emisjon}_{485\text{nm}})$ for celler som uttrykker Rluc-fusjonsproteinet alene under de samme eksperimentelle betingelsene. Forenkling av denne ligningen viser at BRET-ratio

25 tilsvarende forholdet 530/485 nm oppnådd når de to BRET-partnerne er til stede, korrigert med forholdet 530/485 nm oppnådd under de samme eksperimentelle betingelsene, når kun partneren som er fusjonert til Rluc er til stede i analysen. For lesbarhetens skyld er resultatene uttrykt i milliBRET-enheter (mBU), mBU tilsvarende BRET-ratio ganget med 1000.

SDF1 (300 nm) økte med omtrent 20 % av BRET-signalet som skyldes den romlige

30 nærheten til adaptor- og akseptorproteinene fusjonert til CXCR4-reseptoren, det er sannsynlig å indikere CXCR4/CXCR4-homodimerdannelse eller konformasjonsendringer for allerede eksisterende dimerer (figur 6A og 6B). Interessant nok minsket SDF1 (300 nM) med omtrent 24 % av BRET-signalet på grunn av den romlige nærheten til adaptor- og akseptorproteinene fusjonert til

35 CXCR2 og CXCR4, som sannsynlig også indikerer CXCR2/CXCR4-heterodimerdannelse eller konformasjonsendringer for allerede eksisterende dimerer (figur 6C og 6D). I dette siste tilfellet ser SDF-1-aktivert konformasjon av CXCR4/CXCR2 ut å være mindre fordelaktig for BRET-energioverføring. I begge tilfeller var Mab 414H5 og 515H7 i stand til å modulere SDF-1-induserte

40 konformasjonsendringer for CXCR4-homodimerer (63 % inhibering av SDF-1-indusert BRET-økning for 414H5 og 69 % inhibering av SDF-1-indusert BRET-økning for 515H7, henholdsvis figur 6A og 6B) i tillegg til for CXCR2/CXCR4-heterodimerdannelse (50 % inhibering av SDF-1-indusert BRET-minskning for

414H5 og 90 % inhibering av SDF-1-indusert BRET-minskning for 515H7, henholdsvis figur 6C og 6D). Mab 414H5 og 515H7 var også i stand til å modulere ved seg selv henholdsvis CXCR4/CXCR4 og CXCR2/CXCR4 romlig nærhet, noe som indikerer en påvirkning fra Mab 414H5 og 515H7 på både CXCR4/CXCR4-homo- og CXCR2/CXCR4-heterodimerdannelse (figur 6A, 6B, 6C og 6D).

CXCR4-aktivering ved SDF-1 (300 nM) ga en sterk rekruttering av det intracellulære signaliseringsmolekylet β -arrestin, som vist ved 233 % forsterkning av BRET-signal (figur 6E og 6F). Denne rekrutteringen ble delvis inhibert ved Mab 414H5 og 515H7 (omtrent 20 % inhibering for 414H5 og omtrent 95 % for 515H7, henholdsvis figur 6E og 6F) og viser effekten av Mab 414H5 og 515H7 på signalisering.

Eksempel 7: CXCR4-mediert inhibering av cAMP-produksjon

Denne funksjonelle analysen ble designet for å overvåke CXCR4-reseptorsignalisering på nivået for adenylat sykklaser via inhibitoriske Gi/o-proteiner.

cAMP-LANCE-prosedyren (Perkin Elmer) ble benyttet som beskrevet av leverandøren. Kort forklart ble NIH3T3-celler som stabilt og konstitutivt uttrykker villtype-CXCR4-reseptor oppnådd og dyrket som beskrevet ovenfor. Celler ble samlet ved å benytte det trypsinfrie middelet Versene og resuspendert ved en konsentrasjon på 10^6 celler/ml i n løsning inneholdende den AlexaFluor-bundne anti-cAMP Mab'en (1/100 fortykning) og forbindelse (forskolin, SDF-1 og/eller Mab 414H5 og 515H7). Ved inkubering i 30 minutter ved romtemperatur ble deteksjonsmiksen inneholdende Europium-Streptavidin (1/125 fortykning) og Biotin-cAMP (1/125 fortykning)-komplekser tilsatt. Etter inkubering i 1 time ved romtemperatur ble det resulterende FRET-signalet målt i en Mithras LB940 (Berthold) multilabel reader. Data er uttrykt enten som arbitrære fluorescensverdier eller som en relativ stimulering versus SDF-1-respons ved subtraksjon av FK-effekten.

Forskolin (FK) stimulerte doseavhengig cAMP-produksjon med en styrke på omtrent $0,3 \mu\text{M}$ i NIH3T3/CXCR4-celler (figur 7A). I det samtidige nærværet av SDF-1 minsket intracellulære cAMP-nivåer som et resultat av inhibitorisk Gi/o-proteinaktivering ved CXCR4-reseptor. Styrken til SDF-1 var $5,0 \pm 3,1 \text{ nM}$ (figur 7A). Mab 414H5 og 515H7 inhiberte effektivt den forskolinstimulerte effekten av SDF-1 (100 nM) med mer enn 60 % for 414H5 og med mer enn 80 % for 515H7 (figur 7B).

Eksempel 8: Modulering av [^{35}S]GTP γ S-binding på cellulære membraner som konstitutivt uttrykker aktiv mutant Asn 119 Ser-CXCR4-reseptor ved Mab 414H5 og 515H7

Denne funksjonelle analysen tillater overvåkning av G-proteinaktivering via en konstitutivt aktiv mutant (CAM) Asn 119 Ser-CXCR4-reseptor (se Zhang et al., 2002). Denne sensitive analysen tillater å skille mellom CXCR4-ligander basert på deres

iboende aktivitet (delvis agonist, sovende antagonist eller invers agonist). Som tidligere beskrevet av Zhang og kollegaer oppførte CXCR4-ligander slik som AMD3100 eller T40 seg henholdsvis som delvis agonist og invers agonist på CAM-CXCR4-reseptor. Identifisering av sovende antagonister kan være vanskelig fordi

5 denne klassen av molekyler må oppvise liknende affiniteter for både aktive og inaktive tilstander av CXCR4 (Wurch et al., 1999).

Introduksjon av en Asn119Ser-mutasjon i den kodende sekvensen til CXCR4-reseptor ble utført ved å benytte konvensjonelle molekylærbiologiske teknikker (QuickChange site directed mutagenesis kit, Stratagene US). CHO-K1-celler som

10 stabilt og konstitutivt uttrykker CAM-CXCR4-reseptor ble oppnådd som beskrevet i eksemplet ovenfor. [³⁵S]GTPγS-binding ble utført på cellulære membraner oppnådd ved mekanisk skraping i lysisbuffer (Hepes 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM) og ytterligere sentrifugering (10 000 g, 15 min). Inkorporering av [³⁵S]GTPγS (spesifikk aktivitet: 1000 Ci/mmol) ble utført ved å benytte SPA-teknologien

15 (scintillasjonsproksimitetsanalyse – GE Healthcare). Kort forklart ble cellemembraner (10 µg/brønn) inkubert i bindingsbuffer (Hepes 20 mM, GDP 3 µM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) sammen med forbindelse for å evaluere (SDF-1 eller mAb), [³⁵S]GTPγS (0,2-0,4 mM) og til slutt SPA-WGA-PVT-kuler (7,3 mg/brønn). Bindingsreaksjon ble utført i løpet av 1 time ved 25 °C. Etter

20 sentrifugering (1000 g, 10 min) ble radioaktive tellinger målt i en scintillasjonsteller (TopCount, Perkin Elmer).

SDF-1 (100 nM) stimulerte [³⁵S]GTPγS-binding med 130 %. Den inverse agonisten T140 inhiberte både basal (-17 %) og SDF-1-stimulert (-159 %) [³⁵S]GTPγS-binding. I motsetning til dette oppførte Mab 414H5 og 515H7 seg som en sovende

25 antagonist på CAM-CXCR4, uten å endre basal [³⁵S]GTPγS-binding (figur 8) men inhibering av SDF-1 induverte [³⁵S]GTPγS-binding (figur 8).

Eksempel 9: Inhibering av SDF-1-indusert HeLa-celleproliferasjon ved CXCR4-Mab 414H5 in vitro

30 HeLa-celler fra ATCC ble rutinemessig dyrket i EMEM-medium (Lonza Corp., Verviers, Belgia), 10 % FCS (SIGMA Corp., St.Louis, USA), 1 % L-glutamin (Invitrogen Corp., Skottland, UK), 2 % natriumbikarbonat 7,5 % løsning (Invitrogen Corp., Skottland, UK). Celler ble splittet 3 dager før proliferasjonsanalyser slik at de var konfluente.

35 - SDF-1-indusert HeLa-celleproliferasjon

HeLa-celler ble platet ut i 96 brønners vevskulturplater ved en tetthet på 1×10^4 celler/brønn i 200 µl serumfritt medium (EMEM-medium pluss 1 % L-glutamin, 2 % natriumbikarbonat, 7,5 % løsning). Tjuefire timer etter utplating ble passende

40 fortynninger av SDF-1 tilsatt til HeLa-cellene. Etter totalt 76 timer med dyrking ble celler pulset med 0,25 µCi med [³H]tymidin (Amersham Biosciences AB, Uppsala,

Sverige) i 16 timer. Omfanget av [^3H]tymidin-inkorporering i DNA ble kvantifisert ved flytende scintillasjonstelling.

Resultater ble uttrykt som proliferasjonsindeks = [gjennomsnittlig cpm for celle + SDF-1/gjennomsnittlig cpm for celler - SDF-1].

- 5 HeLa-celler ble inkubert med SDF-1 (0 til 1000 ng/ml). SDF-1 stimulerte HeLa-celleproliferasjon 1,5 til 2 ganger in vitro. Konsentrasjonen av SDF-1 for å oppnå den høyeste og reproducerbare proliferasjonsindeksen var 200 ng/ml (25 nM).

- Inhibering av SDF-1-indusert HeLa-celleproliferasjon in vitro ved CXCR4-Mab 414H5

- 10 HeLa-celler ble platet ut i 96 brønners vevskulturplater ved en tetthet på 1×10^4 celler/brønn i 200 μl serumfritt medium (EMEM-medium pluss 1 % L-glutamin, 2 % natriumbikarbonat, 7,5 % løsning). Tjuefire timer etter utplating ble passende fortynninger av CXCR4-Mab 414H5, fortynningsmedium tilsatt i triplikat til HeLa-cellene enten i nærvær av eller fravær av SDF-1 ved en sluttkonsentrasjon på 200 ng/ml (25 nM). Etter totalt 76 timer med dyrking ble celler pulset med 0,25 μCi med [^3H]tymidin (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sverige) i 16 timer. Omfanget av [^3H]tymidin-inkorporering i DNA ble kvantifisert ved flytende scintillasjonstelling.

- 20 Resultater ble uttrykt som rammet fraksjon (Fa) beregnet ved å benytte formelen $Fa = [1 - [\text{gjennomsnittlig cpm for celler inkubert med Mab} + \text{SDF-1} / \text{gjennomsnittlig cpm for celler inkubert med fortynningsmedium} + \text{SDF-1}]] \times 100$.

- 25 In vitro effekten av CXCR4-Mab 414H5 på SDF-1-indusert HeLa-celleproliferasjon var karakteristisk. HeLa-celler ble inkubert med enten 414H5 Mab eller kontroll med eller uten SDF-1 (200 ng/ml). SDF-1 stimulerte in vitro-veksten av HeLa-celler (1,5 til 2 ganger). Doserresponskurve for Mab 414H5 ble oppnådd ved å behandle celler med to gager seriefortynninger av Mab fra 0 til 1500 nM 24 timer etter celleutplating. Når celleproliferasjon ble evaluert 76 timer etter plating tilsvarte hver testede betingelse en 48 timers eksponeringstid overfor Mab eller kontroll. Resultater ble uttrykt som rammet fraksjon ved å benytte Fa-formlen beskrevet ovenfor. Resultatene (representert på figur 9) viste at CXCR4-Mab 414H5 inhiberte HeLa-celleproliferasjon in vitro.

Eksempel 10: Effekt av anti-CXR4-Mab 414H5 og 515H7 på SDF-1-induserte U937-cellermigrasjon

- 35 For å evaluere den inhiberende effekten av de monoklonale anti-CXCR4-antistoffene 414H5 og 515H7 på migrasjonsprosessen ble 100 000 U-937-celler i RPMI1640-medium supplert med 2 % FCS platet ut i det øvre kammeret i migrasjonskamre (24 brønner per plate med porestørrelse 8 μm) enten i nærvær eller fravær av SDF-1 i den nedre delen av brønnene og med eller uten Mab 414H5 og 40 515H7 i det øvre kammeret. I denne testen ble murint IgG2a og IgG2b introdusert

som isotype-kontroller. To timer etter plating ble migrerende celler talt. Resultatene vist på figur 10A for 414H5 og 10B for 515H7 viser at, som forventet, SDF-1 var i stand til å indusere en signifikant økning i U-937-cellemigrasjon. Ingen effekt ble observert når celler ble inkubert med IgG2-isotypekontrollen. I motsetning til dette, for celler inkubert med Mab'ene 414H5 og 515H7, så ble en signifikant og reproducerbar minskning i SDF-1-indusert U937-cellemigrasjon observert: 50 % med 414H5 Mab og mer enn 80 % med 515H7 Mab.

Eksempel 11: Anti-CXCR4-Mab 414H5-inhibering av MDA-MB-231-xenograft-tumorvekst i Nod/Scid-mus

Målet med disse eksperimentene var å evaluere anti-CXCR4-Mab 414H5 og 515H7 sin evne til å inhibere veksten av MDA-MB-231-xenograft i Nod/SCID-mus.

MDA-MB-231-celler fra ECACC ble rutinemessig dyrket i DMEM-medium (Invitrogen Corporation, Skottland, UK), 10 % FCS (Sigma, St. Louis MD, USA). Celler ble splittet 48 timer før transplantering slik at de var i eksponentiell vekstfase. Ti millioner MDA-MB-231-celler ble transplantert i PBS til 7 uker gamle Nod/Scid-mus (Charles River, Frankrike). Fem uker etter implantering var tumorer målbare ($34 \text{ mm}^3 < V^3 < 40 \text{ mm}^3$) og dyrene ble delt i grupper på 6 mus med sammenlignbar tumorstørrelse. Mus ble behandlet i.p. med en 2 mg/mus dose med henholdsvis Mab 414H5 og 515H7.

Deretter ble mus injisert to ganger i uken med 1 mg/dose/mus Mab 414H5 to ganger i uken eller 0,5 mg/dose/mus med Mab 515H7 tre ganger i uken. En PBS-gruppen ble introdusert som en kontrollgruppe i dette eksperimentet. Tumorvolum ble målt to ganger i uken og beregnet ved formelen $\pi/6 \times \text{lengde} \times \text{bredde} \times \text{høyde}$. Statistisk analyse ble utført ved hver måling ved å benytte en Mann-Whitney test.

I disse eksperimentene ble ingen dødelighet observert under behandling. Sammenlignet med PBS-gruppen var det en signifikant inhibering av tumorvekst mellom D7 og D39 ($p \leq 0,002$) for 414H5 Mab 1 mg/dose eller 515H7 0,5 mg/dose og det gjennomsnittlige tumorvolumet etter 5 uker med behandling ble redusert med henholdsvis 82 % og 50 % versus PBS for Mab 414H5 og 515H7 (figur 11A og 11B).

Eksempel 12: Anti-CXCR4-Mab 414H5-aktivitet i U937-museoverlevelseshetmodell.

U937-celler fra ATCC ble dyrket i RPMI 1640 medium, 10% FCS, 1% L-Glutamin. Cellene ble delt to dager før innpodningen, slik at de var i den eksponentielle vekstfase. Ti millioner U937 celler injisert i.p. til NOD / SCID hunn. To dager etter implantering, ble musene behandlet s.c. med en startdose på 2 mg 414H5 mAb / mus og deretter to ganger i uken med 1 mg av antistoff / mus. Kontrollmus fikk PBS-injeksjoner som det har vært vist i tidligere studier at ingen forskjell i

overlevelse ble observert mellom mus injisert med PBS og mus administreres med en mus IgG isotype-kontroll. Museoverlevelse ble overvåket hver dag. Resultatene er beskrevet i figur 12, viste at mus behandlet med Mab 414H5 hadde en dramatisk og betydelig økning i levetiden med T / C% på omtrent 343.

5

Eksempel 13: CXCR4-reseptormediert mobilisering av intracellulære kalsiumlagre

Denne funksjonelle analysen ble designet for å overvåke CXCR4-reseptorsignalisering via stimulering av fosfolipase-C-veien, som induserer kalsiumfrigjøring fra intracellulære lagre fra det endoplasmatiske retikulum.

CHO-K1-celler som stabilt og konstitutivt uttrykker villtype-CXCR4-reseptor ble oppnådd som beskrevet i eksemplet ovenfor. MDA-MB-231 (humant brystadenokarsinom) og U937 (humane lymfom)-celler ble formert i komplett kulturmedium, henholdsvis (DMEM supplert med 10 % FCS) og (RPMI1640 supplert med 10 % FCS, 20 mM HEPES, 1 % ikke-essensiell aminosyreløsning, 1 % natriumpyruvat, 1 % L-glutamin, 4,5 g/l glukose). Alle celletyper ble platet i svarte 96MW-plater ved en tetthet på 100 000 celler/brønn i passende kulturmedium. Celler ble sultet over natt før utførelse av eksperimentene. Celler ble påført fluorescerende kalsiumfargestoff (Fluo-4 No Wash, Washington US) i ladningsbuffer (HBSS 1x, HEPES 20 mM, Probenicidsyre 25 mM) i 30 minutter ved 37 °C etterfulgt av 30 minutter ved 25 °C. Stimulering ved SDF-1 ble utført ved direkte injeksjon i hver brønn. For antagonisme-eksperimenter ble 10 µl Mab-løsning tilsatt direkte i ladningsbufferen minst 10 minutter før SDF-1. Kinetiske fluorescensmålinger ble utført på en multimodus fluorescens-mikroplateavleser Mithras LB940 (Berthold) ved å benytte de følgende settingene: eksitasjon ved 485 nm, emisjon ved 535 nm, eksitasjonsenergi ved 10 000 arbitrære enheter. Fluorescens i hver brønn ble registrert i løpet av 0,1 sekund hvert sekund og i en periode på 20 sekunder før SDF-1-injeksjon (basalsignal). Deretter ble 20 µl SDF-1 injisert og dataregistrering fortsatte i en periode på 2 min. Hver eksperimentelle betingelse ble utført i duplikat. Verdier for hver brønn blir først korrigert ved å trekke fra den basale fluorescensen og fluorescensen som sendes ut fra en kontrollbrønn uten celler. Relative data ble uttrykt som en prosentandel av den maksimale stimuleringen oppnådd ved SDF-1 (100 nM).

SDF1 (100 nM) induserte en rask og sterk frigjøring av intracellulært kalsium i rekombinant CHO/CXCR4, mens ikke noe fluorescenssignal ble påvist i naive CHO-K1-celler. Den maksimale intensiteten nådde > 160 % over basal fluorescens og ble observert med både MDA-MB-231 og U-937 (figur 13A, 13B, 13C) selv om den maksimale fluorescensintensiteten ved SDF-1 (100 nM) var lavere (130-140 % over basal). 515H7-antistoff (133 nM) ga en sterk og nesten komplett inhibering av det SDF-1 (100 nM)-induserte kalsiumsignalet i alle tre undersøkte cellelinjer.

40

Eksempel 14: Anti-CXCR4-Mab 414H5-inhibering av T-celle KARPAS 299 xenografttumorvekst i Nod/Scid-mus

Målet med dette eksperimentet var å evaluere evnen til anti-CXCR4-Mab 414H5 i å inhibere veksten av KARPAS 299 xenograft i Nod/Scid-mus.

- 5 KARPAS 299 celler fra ECACC ble rutinemessig dyrket i RPMI-medium, 1 % L-Glu og 10 % FCS (Sigma, St.Louis MD, USA). Celler ble delt 48 timer før innpodning slik at de var i den eksponentielle vekstfasen. Fem millioner KARPAS-299-celler ble podet i PBS til 7 uker gamle Nod/Scid-mus (Charles River, Frankrike). Fem dager etter implantering var tumorer målbare ($32 \text{ mm}^3 < V^3 < 49$
- 10 mm^3) og dyr ble delt i grupper på 6 mus med sammenlignbar tumorstørrelse. Mus ble behandlet i.p. med en 2 mg/mus dose av Mab 414H5.

Deretter ble mus injisert to ganger i uken med 1 mg/dose/mus med Mab 414H5. En PBS-gruppe ble introdusert som en kontrollgruppe i dette eksperimentet.

- 15 Tumorvolum ble målt to ganger i uken og beregnet ved hjelp av formelen: $\pi/6 \times \text{lengde} \times \text{bredde} \times \text{høyde}$. Statistisk analyse ble utført ved hver måling ved å benytte Mann-Whitney test.

I dette eksperimentet ble ingen dødelighet observert under behandling.

- Sammenlignet med PBS-gruppen var det en signifikant inhibering av tumorvekst mellom D7 og D33 ($p \leq 0,002$) for 414H5-Mab 1 mg/dose og det gjennomsnittlige tumorvolumet etter 5 uker med behandling var redusert med 73 % for Mab 414H5
- 20 versus PBS (figur 14).

Eksempel 15: Anti-CXCR4 Mab 515H7-aktivitet i U937-museoverlevelsesmodell

- 25 U937-celler fra ATCC ble dyrket i RPMI 1640-medium, 10 % FCS, 1 % L-glutamin. Celler ble splittet to dager før poding slik at de var i den eksponentielle vekstfasen. 1 millioner U937-celler injisert i.p. i NOD/SCID-hunmus. To dager etter implantering ble mus behandlet s.c. med en dose på 2 mg med 515H7 Mab/mus og deretter to ganger i uken med 1 mg antistoff/mus. Kontrollmus mottok
- 30 PBS-injeksjoner fordi det har blitt vist i tidligere studier at ingen forskjell i overlevelse blir observert mellom mus injisert med PBS og mus administrert med en muse-IgG-isotypekontroll. Museoverlevelse ble overvåket hver dag.

Resultater beskrevet på figur 15 viste at mus behandlet med Mab 515H7 hadde en dramatisk og signifikant økning i livslengde med T/C % omtrent 280 for Mab

35 515H7 (figur 15).

Eksempel 16: Anti-CXCR4-Mab 515H7-inhibering av T-celle-KARPAS299-xenograft-tumorvekst i Nod/Scid-mus

Målet med dette eksperimentet var å evaluere anti-CXCR4-Mab 515H7 sin evne til å inhibere veksten for KARPAS299-xenograft i Nod/Scid-mus.

- KARPAS299-celler fra ECACC ble rutinemessig dyrket i RPMI-medium, 1 % L-Glu og 10 % FCS (Sigma, St. Louis MD, USA). Celler ble splittet 48 timer før
- 5 transplantering slik at de var i eksponentiell vekstfase. Fem millioner KARPAS299-celler ble transplantert i PBS til 7 uker gamle Nod/Scid-mus (Charles River, Frankrike). Fem dager etter implantering var tumorer målbare ($32 \text{ mm}^3 < V^3 < 49 \text{ mm}^3$) og dyr ble delt opp i grupper på 6 mus med sammenlignbar tumorstørrelse. Mus ble behandlet i.p. med en 2 mg/mus dose av Mab 515H7.
- 10 Deretter ble mus injisert to ganger i uken med 1 mg/dose/mus med Mab 515H7. En PBS-gruppe ble introdusert som en kontrollgruppe i dette eksperimentet. Tumorumfangt ble målt to ganger i uken og beregnet ved formelen $\pi/6 \times \text{lengde} \times \text{bredde} \times \text{høyde}$. Statistisk analyse ble utført ved hver måling ved å benytte en Mann-Whitney test.
- 15 I disse eksperimentene ble ingen dødelighet observert under behandling. Sammenlignet med PBS-gruppen var det en signifikant inhibering av tumorvekst mellom D7 og D33 ($p \leq 0,002$) for 515H7 1 mg/dose og det gjennomsnittlige tumorvolumet etter 5 uker med behandling ble redusert med 63 % versus PBS for Mab 515H7 (figur 16).
- 20 **Eksempel 17: Produksjon av kimær anti-CXCR4-Mab c414H5 og c515H7**
- Kimære formater av murin Mab 414H5 og 515H7 ble designet: de tilsvarer lettkjede- og tungkjedevariabeldomenet i de murine antistoffene av interesse, genetisk fusjonert til humane Ckappa- og IgG1-konstantdomener. Alle rekombinante Mab'er ble produsert ved transient transfeksjon ved å benytte
- 25 HEK293/EBNA-systemet med en pCEP4-ekspresjonsvektor (Invitrogen USA).
- De totale nukleotidsekvensene som tilsvarer variabeldomenet til Mab 414H5 og 515H7-lettkjeder og –tungkjeder ble syntetisert ved global gensyntese (Genecust, Luxembourg). De ble subklonet i en pCEP4-vektor (Invitrogen USA) som bærer helde den kodende sekvensen til konstantdomenet til enten den lette (Ckappa) eller
- 30 den tunge (CH1-hengsle-CH2-CH3) kjeden til et humant IgG1-immunoglobulin. Alle kloningstrinn ble utført i overensstemmelse med konvensjonelle molekylærbiologiske teknikker som beskrevet i the Laboratory manual (Sambrook og Russel 2001) eller i overensstemmelse med leverandørens instruksjoner. Hver genetiske konstruksjon ble fullt validert ved nukleotidsekvensering ved å benytte
- 35 Big Dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems USA) og analysert ved å benytte en 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems USA).
- Suspensjonstilpassede HEK293-EBNA-celler (Invitrogen USA) ble rutinemessig dyrket i 250 ml flasker i 50 ml serumfritt medium Excell 293 (SAFC Biosciences) supplert med 6 mM glutamin på en orbital-rister (110 rpm rotasjonshastighet).
- 40 Transient transfeksjon ble utført med 2×10^6 celler/ml ved å benytte lineært 25 kDa polyetylenimin (PE) (Polysciences) klargjort i vann ved en sluttkonsentrasjon på 1

mg/ml blandet med plasmid-DNA (sluttkonsentrasjon på 1,25 µg/ml for et forhold mellom tung- til lettkjede-plasmid på 1:1). Ved 4 timer etter transfeksjon ble kulturen fortynnet med ett volum med friskt kulturmedium for å oppnå en endelig celletetthet på 10^6 celler/ml. Dyrkingsprosess ble overvåket på basis av

5 cellelevedyktighet og Mab-produksjon. Typisk ble kulturer opprettholdt i 4 til 5 dager. Mab'er ble rensset ved å benytte en konvensjonell kromatografiltilnærming på et protein-A-harpiks (GE Healthcare USA). Alle ulike Mab'er ble produsert ved nivåer passende for funksjonelle evalueringer. Produktivitetsnivåer strekker seg typisk mellom 6 og 15 mg/ml med rensede Mab'er.

10

Eksempel 18: Karakterisering ved FACS-analyse av kimær anti-CXCR4-Mab c414H5- og c515H7-bindingsspesifisitet og kreftcellelinjegjenkjenning

I dette eksperimentet ble spesifikk binding til human CXCR4 med kimær anti-CXCR4-Mab c414H5 og c515H7 undersøkt med FACS-analyse.

15 NIH3Y3, NIH3T3-hCXCR4-transfekterte celler og MDA-MB-231-kreftcellelinje ble inkubert med 10 µg/ml med monoklonalt antistoff c414H5 og c515H7. Cellene ble deretter vasket med 1 % BSA/PBS/0,01 % NaN₃. Deretter ble Alexa-merkede, sekundære antistoffer tilsatt til cellene og ble tillatt inkubert ved 4 °C i 20 minutter. Cellene ble deretter vasket igjen to ganger. Etter den andre vaskingen ble FACS-

20 analyse utført. Resultater av disse bindingsstudiene er gitt i tabell 5 som viser (Gjennomsnittlig fluorescensintensitet (MFI) oppnådd ved FACS) at kimær anti-CXCR4-Mab c414H5 og c515H7 binder spesifikt til humane CXCR4-NIH3T3-transfektet cellelinje og gjenkjenner også humane kreftcellelinjer, f.eks. MDA-MB-231-brystkreftcellelinjer.

25

Tabell 5

Klon (10 µg/ml)	MFI på cellelinjer	
	NIH3T3-CXCR4	MDA-MB-231
c414H5	1039	Not tested
c515H7	2294	118

Eksempel 19: konkurrerende binding av murin anti-CXCR4-Mab m414H5 og m515H7 og kimær Mab c414H5 og c515H7 om [¹²⁵I]SDF-1 på CHO-K1-membraner som stabilt uttrykker human CXCR4-reseptor

30

Denne analysen tillater å evaluere evnen til murine Mab'er m414H5 og m515H7 og kimære Mab'er c414H5 og c515H7 til å konkurrere om binding av radiomerket [¹²⁵I]SDF-1 til human CXCR4-reseptor, på enten ortosteriske eller allosteriske bindingssteder.

35 CHO-K1-celler som stabilt og konstitutivt uttrykker human CXCR4-reseptor ble oppnådd ved transfeksjon av naive CHO-K1-celler (ATCC CCL-61) med en

pattedyrekspresjonsvektor som bærer hele den kodende sekvensen for human CXCR4-reseptor (RefSeq NM_003467). Celler ble formert i komplett kulturmedium (DMEM-Ham's F12 supplert med 5 % føtalt kalveserum (FCS) og 500 µg/ml geneticin). Radioligandbindingseksperimenter ble utført på cellemembraner oppnådd ved mekanisk skraping av CHO/CXCR4-celler i lysisbuffer (Hepes 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM) etterfulgt av sentrifugering (10 000 g, 15 min). [¹²⁵I]SDF-1-binding (spesifikk aktivitet: 1500 Ci/mmol) ble utført ved å benytte SPA-teknologi (scintillasjonsproksimitetsanalyse – GE Healthcare). Kort forklart ble cellemembraner (30 µg/brønn) inkubert i bindingsbuffer (Hepes 20 mM, pH 7,4, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 150 mM, BSA 1 %) sammen med forbindelse for å evaluere (SDF-1 eller mAb), radioligand /1 nM) og til slutt SPA-WGA-PVT-kuler (7,3 mg/brønn). Bindingslikevekt ble nådd etter 1 time ved 25 °C. Etter sentrifugering (1000 g i 10 min) ble radioaktive tellinger målt i en scintillasjonsteller (TopCount Perkin Elmer). Ikke-spesifikk (NS) binding ble estimert i nærværet av 10 µM umerket SDF-1.

Anti-CXCR4-Mab (100 nM) konkurrerte effektivt om [¹²⁵I]SDF-1-binding med den følgende rangeringsrekkefølgen for konkurransevirkningsevne (% inhibering av [¹²⁵I]SDF-1): m515H7 (62±10 %), c515H7 (55±4 %), m414H5 (30 ± 5 %) og c414H5 (21±10 %) (figur 17).

20

Eksempel 20: Modulering av [³⁵S]GTPγS-binding på cellulære membraner som uttrykker villtype-CXCR4-reseptor ved murin anti-CXCR4-Mab m414H5 og m515H7 og kimær Mab c414H5 og c515H7

Denne funksjonelle analysen tillater overvåkning av G-proteinaktivering via human villtype-CXCR4-reseptor og dens modulering ved murin anti-CXCR4-Mab m414H5 og m515H7 og kimær Mab c414H5 og c515H7.

NIH-3Y3-celler som stabilt og konstitutivt uttrykker villtype-CXCR4-reseptor ble oppnådd som beskrevet i eksemplet ovenfor for CHO-K1-celler. HeLa (humant livmorhalskarsinom)-celler ble oppformert i komplett kulturmedium (EMEM supplert med 10 % FCS, 1 % L-glutamin, 2 µM natriumbikarbonat). [³⁵S]GTPγS-binding ble utført på cellulære membraner oppnådd ved mekanisk skraping i lysisbuffer (Hepes 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM) og ytterligere sentrifugering (10 000 g, 15 min). Inkorporering og påvisning av [³⁵S]GTPγS (spesifikk aktivitet: 1000 Ci/mmol) ble utført ved å benytte SPA-teknologi (scintillasjonsproksimitetsanalyse – GE Healthcare). Kort forklart ble membraner (10 µg/ml) inkubert i bindingsbuffer (Hepes 20 mM, GDP 3 µM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) sammen med forbindelse for å evaluere (SDF-1 og Mab av interesse), av [³⁵S]GTPγS (0,2-0,4 nM) og til slutt SPA-WGA-PVT-kuler (7,3 mg/brønn). Bindingsreaksjon ble utført i løpet av 1 time ved 25 °C. Ved sentrifugering (1000 g i 10 min) ble radioaktive tellinger målt i en scintillasjonsteller (TopCount. Perkin Elmer). IC₅₀ ble beregnet for hver Mab.

Ved disse eksperimentelle betingelsene var IC_{50} for Mab'ene m414H5, c414H5, m515H7 og c515H7, som bestemt i NIH3T3/CXCR4-celler henholdsvis 1,6 nM, 1,1 nM, 1,9 nM og 1,5 nM (figur 18). IC_{50} for Mab'ene m414H5, c414H5, m515H7 og c515H7 bestemt ved å benytte HeLa-celler ved samme eksperimentelle betingelser var henholdsvis 0,5 nM, 0,3 nM, 0,2 nM og 0,6 nM (figur 19).

Eksempel 21: Assosiering av CXCR4 med ulike interaksjonspartnere: homo- og heterodimerisering, rekruttering av β -arrestin via bioluminescensenergioverføring (BRET)-tilnærming og effekt av murin Mab m414H5, m515H7 og kimær Mab c414H5 og c515H7 på disse dimerene

Denne funksjonelle analysen tillater evaluering av konformasjonsendringene som induseres ved binding av SDF-1 og/eller murin Mab m414H5 og m515H7 og kimær Mab c414H5 og c515H7 til CXCR4-reseptor på nivået for CXCR4-homodimerdannelse og CXCR2/CXCR4-heterodimerdannelse i tillegg til rekrutteringen av β -arrestin-2-signaliseringsprotein.

Ekspresjonsvektorer for hver av de undersøkte interaksjonspartnerne ble konstruert som fusjonsproteiner med det tilsvarende fargestoffet (Renilla reniformis-luciferase, Rluc og gult fluorescerende protein, YFP) ved å benytte konvensjonelle molekylærbiologiske teknikker. To dager før utførelse av BRET-eksperimenter ble HEK293-celler transient transfektert med ekspresjonsvektorer som koder for de tilsvarende BRET-partnerne: (CXCR4/Rluc + CXCR4/YFP) for å undersøke CXCR4-homodimerisering og (CXCR4-Rluc + CXCR2-YFP) for å studere CXCR4- og CXCR2-heterodimerisering og (CXCR4-Rluc + β -arr2-YFP) for å studere CXCR4-mediert rekruttering av β -arrestin-2. Dagen etter ble celler distribuert i poly-lysin-forhåndsbelagte, hvite 96MW-plater i komplett kulturmedium (DMEM supplert med 10 % FBS). Celler ble først dyrket ved 37 °C med 5 % CO_2 for å tillate at celler fester seg til platen. Celler ble deretter sultet med 200 μ l DMEM/brønn over natt. Umiddelbart før BRET-eksperimentet ble DMEM fjernet og celler ble raskt vasket med PBS. Celler ble deretter inkubert i PBS i nærvær av eller fravær av antistoff, 15 minutter ved 37 °C før tilsetningen av coelenterazin-H 5 μ M med eller uten SDF-1 100 nM i et sluttvolum på 50 μ l. Etter inkubering i 5 minutter ved 37 °C og ytterligere inkubering i 20 minutter ved romtemperatur kun for homo- og heterodimerer ble lysemisjonsregistrering ved 485 nm og 530 nm satt i gang ved å benytte Mithras LB940 multilabel reader (Berthold) (1s/bølgelengde/brønn gjentatt 15 ganger ved romtemperatur).

Kalibrering av BRET-ratio ble utført som tidligere beskrevet (Angers et al., 2000): $((emisjon_{530nm}) - (emisjon_{485nm}) \times Cf) / (emisjon_{485nm})$, der $Cf = (emisjon_{530nm}) - (emisjon_{485nm})$ for celler som uttrykker Rluc-fusjonsproteinet alene under de samme eksperimentelle betingelsene. Forenkling av denne ligningen viser at BRET-ratio tilsvarende forholdet 530/485 nm oppnådd når de to BRET-partnerne er til stede, korrigert med forholdet 530/485 nm oppnådd under de samme eksperimentelle betingelsene, når kun partneren som er fusjonert til Rluc er til stede i analysen. For

lesbarhetens skyld er resultatene uttrykt i milliBRET-enheter (mBU), mBU tilsvarer BRET-ratio ganget med 1000.

SDF1 (100 nM) økte med omtrent 10 % av BRET-signalet som skyldes den romlige nærheten til adaptor- og akseptorproteinene fusjonert til CXCR4-reseptoren, det er sannsynlig å indikere CXCR4/CXCR4-homodimerdannelse eller konformasjonsendringer for allerede eksisterende dimere (figur 20A). Interessant nok minsket SDF1 (100 nM) med omtrent 17 % av BRET-signalet på grunn av den romlige nærheten til adaptor- og akseptorproteinene fusjonert til CXCR2 og CXCR4, som sannsynlig også indikerer CXCR2/CXCR4-heterodimerdannelse eller konformasjonsendringer for allerede eksisterende dimere (figur 20B). I dette siste tilfellet ser SDF-1-aktivert konformasjon av CXCR4/CXCR2 ut å være mindre fordelaktig for BRET-energioverføring. I begge tilfeller var Mab m414H5, c414H5, m515H7 og c515H7 i stand til å modulere SDF-1-induserte konformasjonsendringer for CXCR4-homodimerer (75% inhibering av SDF-1-indusert BRET-økning for c414H5 og 96 % inhibering av SDF-1-indusert BRET-økning for c515H7, figur 20A) i tillegg til for CXCR2/CXCR4-heterodimerdannelse (77 % inhibering av SDF-1-indusert BRET-minskning for c414H5 og 98 % inhibering av SDF-1-indusert BRET-minskning for c515H7, figur 20B). Mab m414H5, c414H5, m515H7 og c515H7 var også i stand til å modulere ved seg selv henholdsvis CXCR4/CXCR4 og CXCR2/CXCR4 romlig nærhet, noe som indikerer en påvirkning fra disse Mab'ene på både CXCR4/CXCR4-homo- og CXCR2/CXCR4-heterodimerdannelse (figur 20A og 20B).

CXCR4-aktivering ved SDF-1 (100 nM) ga en sterk rekruttering av det intracellulære signaliseringsmolekylet β -arrestin, som vist ved 400 % forsterkning av BRET-signal (figur 20C). Denne rekrutteringen ble delvis inhibert ved Mab c414H5 og ved c515H7 (omtrent 63 % inhibering for c414H5 og 93 % for c515H7, figur 20C) og viser effekten av disse Mab'ene på signalisering.

Eksempel 22: CXCR4-reseptormediert mobilisering av intracellulære kalsiumlagre

Denne funksjonelle analysen ble designet for å overvåke CXCR4-reseptorsignalisering via stimulering av fosfolipase-C-veien, som induserer kalsiumfrigjøring fra intracellulære lagre fra det endoplasmatiske retikulum.

CHO-K1-celler som stabilt og konstitutivt uttrykker villtype-CXCR4-reseptor ble oppnådd som beskrevet i eksemplet ovenfor. U937 (humane lymfom)-celler ble formert i komplett kulturmedium, henholdsvis (DMEM supplert med 10 % FCS) og (RPMI1640 supplert med 10 % FCS, 20 mM HEPES, 1 % ikke-essensiell aminosyreløsning, 1 % natriumpyruvat, 1 % L-glutamin, 4,5 g/l glukose). Alle celletyper ble platet i svarte 96MW-plater ved en tetthet på 100 000 celler/brønn i passende kulturmedium. Celler ble sultet over natt før utførelse av eksperimentene. Celler ble påført fluorescerende kalsiumfargestoff (Fluo-4 No Wash, Washington

- US) i ladningsbuffer (HBSS 1x, HEPES 20 mM, probenisisdsyre 25 mM) i 30 minutter ved 37 °C etterfulgt av 30 minutter ved 25 °C. Stimulering ved SDF-1 ble utført ved direkte injeksjon i hver brønn. For antagonisme-eksperimenter ble 10 µl Mab-løsning tilsatt direkte i ladningsbufferen minst 10 minutter før SDF-1.
- 5 Kinetiske fluorescensmålinger ble utført på en multimodus fluorescens-mikroplateavleser Mithras LB940 (Berthold) ved å benytte de følgende settingene: eksitasjon ved 485 nm, emisjon ved 535 nm, eksitasjonsenergi ved 10 000 arbitrære enheter. Fluorescens i hver brønn ble registrert i løpet av 0,1 sekund hvert sekund og i en periode på 20 sekunder før SDF-1-injeksjon (basalsignal). Deretter ble 20 µl
- 10 SDF-1 injisert og dataregistrering fortsatte i en periode på 2 min. Hver eksperimentelle betingelse ble utført i duplikat. Verdier for hver brønn blir først korrigert ved å trekke fra den basale fluorescensen og fluorescensen som sendes ut fra en kontrollbrønn uten celler. Relative data ble uttrykt som en prosentandel av den maksimale stimuleringen oppnådd ved SDF-1 (100 nM).
- 15 SDF1 (100 nM) induserte en rask og sterk frigjøring av intracellulært kalsium i rekombinant CHO/CXCR4, mens ikke noe fluorescenssignal ble påvist i naive CHO-K1-celler. Den maksimale intensiteten nådde > 140 % over basal fluorescens og ble observert ved omtrent 40 sek. ved stimulering med SDF-1, tilsvarende kinetikk kurver ble observert med U-937-celler (figurene 21A, 21B). Kimært
- 20 antistoff c515H7 (133 nM) ga en sterk og nesten komplett inhibering av det SDF-1 (100 nM)-induserte kalsiumsignalet i begge undersøkte cellelinjer.

Eksempel 23: Effekt av murin anti-CXCR α -Mab m414H5 og m515H7 og kimær Mab c414H5 og c515H7 på SDF-1-indusert U937-cellemigrasjon

- 25 For å evaluere den inhiberende effekten av anti-CXCR4-Mab m414H5 og m515H7 og c414H5 og c515H7 på migrasjonsprosessen ble 100 000 U-937-celler i RPMI1640-medium supplert med 2 % FCS platet ut i det øvre kammeret i migrasjonskamre (24 brønner per plate med porestørrelse 8 µm) enten i nærvær eller fravær av SDF-1 i den nedre delen av brønnene og med eller uten Mab m414H5,
- 30 c414H5, c515H7 og m515H7 i det øvre kammeret. I denne testen ble murint IgG2a og IgG2b introdusert som isotype-kontroller. To timer etter plating ble migrerende celler talt. Resultatene vist på figur 22A (for c414H5 versus m414H5) og 22B (c515H7 versus m515H7) viser at, som forventet, SDF-1 var i stand til å indusere en signifikant økning i U-937-cellemigrasjon. Ingen effekt ble observert når celler ble
- 35 inkubert med IgG2b-isotypekontrollen. I motsetning til dette, for celler inkubert med Mab'ene c515H7 og m515H7, så ble en signifikant og reproducerbar minskning i SDF-1-indusert U937-cellemigrasjon observert: omtrent 50 % med c414H5 og m414H5 og mer enn 80 % med Mab'ene c515H7 og m515H7.

Eksempel 24: Kimær anti-CXCR4-Mab c414H5- og c515H7-aktivitet i U937-museoverlevelsesmodell

- U937-celler fra ATCC ble dyrket i RPMI1640-medium, 10 % FCS, 1 % L-glutamin. Celler ble splittet to dager før transplantering slik at de var i eksponentiell vekstfase. Ti millioner U937-celler injisert i.p. i NOD/SCID-hunmus. To dager etter implantering ble mus behandlet s.c. med en dose på 2 mg med c414H5 og c515H7 Mab/mus og deretter to ganger i uken med 1 mg antistoff/mus. Kontrollmus mottok PBS-injeksjoner fordi det har blitt vist i tidligere studier at ingen forskjell i overlevelse blir observert mellom mus injisert med PBS og mus administrert med en muse-IgG-isotypekontroll. Museoverlevelse ble overvåket hver dag.
- Resultater beskrevet på figur 23 viste at mus behandlet med Mab c414H5 og c515H7 hadde en dramatisk og signifikant økning i livslengde med T/C % på omtrent 210 og 180 for henholdsvis c414H5 og c515H7.

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåte for seleksjon av et anti-CXCR4-antistoff, eller ett av dets funksjonelle fragmenter, der nevnte funksjonelle fragment er valgt blant fragmentene Fv, Fab, (Dab')₂, Fab', scFv, scFv-Fc og dialegemer, som er i stand til å inhibere aktiveringen av CXCR4, karakterisert ved at den omfatter de følgende trinnene:
 - i) screene de genererte antistoffene og velge antistoffer som er i stand til å binde spesifikt til CXCR4 og også modulere CXCR4-aktivering,
 - ii) teste de valgte antistoffene i trinn i) og velge antistoffer som er i stand til å indusere konformasjonsendring i CXCR4-homodimerer, og deretter
 - iii) teste de valgte antistoffene i ii) og velge antistoffer som er i stand til å indusere konformasjonsendring i CXCR4/CXCR2-heterodimerer.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, der trinn ii) består i å evaluere antistoffer ved hjelp av BRET-analyse på celler som uttrykker både CXCR4-RLuc/CXCR4-YFP og velge antistoffer som er i stand til å inhibere minst 40 % av BRET-signalet.
3. Fremgangsmåte ifølge krav 1, der trinn iii) består i evaluering av antistoffer med BRET-analyse på celler som både CXCR4-RLuc/CXCR4-YFP og velge antistoffer som er i stand til å inhibere minst 40 % av BRET-signalet.
4. Antistoff eller et funksjonelt fragment av samme, der nevnte funksjonelle fragment er valgt blant fragmentene Fv, Fab, (Fab')₂, Fab', scFv, scFv-Fc og dialegemer, som er i stand til å inhibere aktivering av CXCR4, karakterisert ved at nevnte antistoff er valgt i gruppen bestående av:
 - a) et antistoff som omfatter:
 - en lettkjede som omfatter, ifølge IMGT, CDR-L1 med sekvensen SEQ ID nr. 1, CDR-L2 med sekvensen SEQ ID nr. 2 og CDR-L3 med sekvensen SEQ ID nr. 3, og
 - en tungkjede som omfatter, ifølge IMGT, CDR-H1 med sekvensen SEQ ID nr. 7, CDR-H2 med sekvensen SEQ ID nr. 5 og CDR-H3 med sekvensen SEQ ID nr. 8,
 - b) et antistoff som omfatter:
 - en lettkjede som omfatter, ifølge Kabat, CDR-L1 med sekvensen SEQ ID nr. 9, CDR-L2 med sekvensen SEQ ID nr. 10 og CDR-L3 med sekvensen SEQ ID nr. 3, og
 - en tungkjede som omfatter, ifølge Kabat, CDR-H1 med sekvensen SEQ ID nr. 11, CDR-H2 med sekvensen SEQ ID nr. 12 og CDR-H3 med sekvensen SEQ ID nr. 6,

- c) et antistoff som omfatter:
- en lettkjede som omfatter, ifølge IGMT, CDR-L1 med sekvensen SEQ ID nr. 40, CDR-L2 med sekvensen ifølge SEQ ID nr. 2 og CDR-L3 med sekvensen SEQ ID nr. 41, og
 - en tungkjede som omfatter, ifølge IGMT, CDR-H1 med sekvensen SEQ ID nr. 44, CDR-H2 med sekvensen SEQ ID nr. 5 og CDR-H3 med sekvensen SEQ ID nr. 45, og
- d) et antistoff som omfatter:
- en lettkjede som omfatter, ifølge Kabat, CDR-Li med sekvensen SEQ ID nr. 46, CDR-L2 med sekvensen SEQ ID nr. 47 og CDR-L3 med sekvensen SEQ ID nr. 41, og
 - en tungkjede som omfatter, ifølge Kabat, CDR-H1 med sekvensen SEQ ID nr. 48, CDR-H2 med sekvensen SEQ ID nr. 49 og CDR-H3 med sekvensen SEQ ID nr. 43.
5. Antistoff eller et funksjonelt fragment av samme, ifølge krav 4, karakterisert ved at nevnte antistoff er valgt i gruppen bestående av:
- a) et antistoff som omfatter en lettkjedesequens som omfatter aminosyresequensen SEQ ID nr. 13, og som omfatter en tungkjedesequens som omfatter aminosyresequensen SEQ ID nr. 14, og
 - b) et antistoff som omfatter en lettkjede som omfatter aminosyresequensen SEQ ID nr. 50, og som omfatter en tungkjedesequens som omfatter aminosyresequensen SEQ ID nr. 51.
6. Antistoff utskilt fra et murint hybridom valgt fra hybridomer som er registrert hos CNCM, Pasteur-instituttet, Paris, 22.oktober 2007, under nummer I-3860 eller registrert hos CNCM, Pasteur-instituttet, Paris, 25.juni 2008 under nummer I-4019.
7. Antistoff eller funksjonelt fragment av samme, ifølge krav 4, karakterisert ved at nevnte antistoff består av et kimært antistoff.
8. Antistoff eller funksjonelt fragment av samme, ifølge krav 7, karakterisert ved at nevnte antistoff er valgt i gruppen bestående av:
- a) et kimært antistoff som omfatter en lettkjedesequens som omfatter aminosyresequensen SEQ ID nr. 64, og ved at det omfatter en tungkjedesequens som omfatter aminosyresequensen SEQ ID nr. 65, og
 - b) et kimært antistoff som omfatter en lettkjedesequens som omfatter aminosyresequensen SEQ ID nr. 66, og ved at det omfatter en tungkjedesequens som omfatter aminosyresequensen SEQ ID nr. 67.

9. Isolert nukleinsyre, karakterisert ved at nevnte isolerte nukleinsyre er en nukleinsyre, DNA eller RNA, som koder for et antistoff ifølge ett av kravene 5 eller 8.
- 5 10. Vektor, sammensatt av en nukleinsyre ifølge krav 9.
11. Vertscelle, omfattende en vektor ifølge krav 10.
- 10 12. Transgent dyr, bortsett fra menneske, omfattende en celle transformert med en vektor ifølge krav 10.
13. Fremgangsmåte for fremstilling av et antistoff, eller et funksjonelt fragment av samme, der nevnte funksjonelle fragment er valgt blant fragmentene Fv, Fab, (Fab')₂, Fab', scFv, scFv-Fc og dialegemer, ifølge ett av kravene 4 til 8, 15 karakterisert ved at nevnte fremgangsmåte omfatter de følgende trinn:
- dyrkingen i et medium av og de passende dyrkingsbetingelsene for en vertscelle ifølge krav 11, og
 - gjenvinningen av nevnte antistoff som er produsert på denne måten fra dyrkingsmediet eller fra nevnte dyrkede celler.
- 20 14. Antistoff eller funksjonelt fragment av samme, ifølge ett av kravene 4 til 8, for anvendelse som et legemiddel.
- 25 15. Farmasøytisk sammensetning omfattende som en aktiv ingrediens en forbindelse som består av et antistoff eller et funksjonelt fragment av samme, ifølge ett av kravene 4 til 8 og 14.
- 30 16. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 15, karakterisert ved at den omfatter, i tillegg, som et kombinasjonsprodukt for anvendelse på en simultan, separert eller forlenget måte, et antitumor-antistoff forskjellig fra et antistoff rettet mot CXCR4.
- 35 17. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 15 eller 16, karakterisert ved at den i tillegg omfatter som et kombinasjons- eller konjugeringsprodukt for anvendelse på en simultan, separert eller forlenget måte, et cytotoxisk/cytostatisk middel, et cellulært toksin og/eller en radioisotop.
- 40 18. Farmasøytisk sammensetning ifølge ett av kravene 15 til 17, for anvendelse som et legemiddel.
19. Antistoff eller et funksjonelt fragment av samme, ifølge ett av kravene 4 til 8 og 16, og/eller en farmasøytisk sammensetning ifølge ethvert av kravene 15 til 17, som et legemiddel for modulering av CXCR4-aktivitet i en celle.

20. Antistoff eller et funksjonelt fragment av samme, ifølge ett av kravene 4 til 8 og 16, og/eller en farmasøytisk sammensetning ifølge ethvert av kravene 15 til 17, for anvendelse i forebyggingen eller behandlingen av kreft.
- 5
21. Antistoff eller et funksjonelt fragment av samme, og/eller en sammensetning ifølge anvendelsen ifølge krav 20, karakterisert ved at nevnte kreft er en kreftform som er valgt blant prostatakreft, osteosarkom, lungekreft, brystkreft, endometriekreft, multippelt myelom, 10 ovarialkreft, pankreaskreft og kolonkreft.
22. Murint hybridom valgt fra hybridomer som ble registrert hos CNCM, Pasteur-instituttet, Paris, 22.oktober 2007, under nummer I-3860 eller registrert hos CNCM, Pasteur-instituttet, Paris, 25.juni 2008 under nummer I-4019.

SEKVENSLISTE

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT

<120> Nye anti-CXCR4-antistoffer og deres anvendelse for behandlingen av kreft

<130> D26935

<150> EP 08305631.7

<151> 2008-10-01

<150> US 61/136,772

<151> 2008-10-01

<150> US 61/173,743

<151> 2009-04-29

<160> 71

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 1

Gln Ser Leu Tyr Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 2

<211> 3

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 2

Trp Ala Ser
1

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 3

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Arg Thr
1 5

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 4

Thr Asp Tyr Tyr
1

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 5

Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr
 1 5 10

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 6

Asp Ile Pro Gly Phe Ala Tyr
 1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 7

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr
 1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 8

Ala Arg Asp Ile Pro Gly Phe Ala Tyr
 1 5

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 9

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Tyr Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 10

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 11

Thr Asp Tyr Tyr Met Ser
1 5

<210> 12

<211> 19

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 12

Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 13

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Tyr Asn Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Thr Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Phe Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 14

<211> 118

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 14

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Thr Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile

<213> mus musculus
 <400> 21
 gggttcacct tcactgatta ctac 24

<210> 22
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 22
 gcaagagata tcccgggggtt tgcttac 27

<210> 23
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 23
 aaatccagtc agagtctgta caacagtaga acccgaaaga actacttggc t 51

<210> 24
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 24
 tgggcatcca ctagggaatc t 21

<210> 25
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 25
 actgattact acatgagc 18

<210> 26
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 26
 tttattagaa acaaagctaa tggttacaca acagagtaca gtgcatctgt gaagggt 57

<210> 27
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 27
 gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 60
 atgagctgca aatccagtc gagtctgtac aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggct 120
 tggtagcagg agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 180
 gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcaccagtg tgcaggctga ggacctggca gttttttact gcaagcaatc ttataatctt 300
 cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 28
<211> 354
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 28
gaggtgaagc tgggtggagtc tggaggaggc ttggtacagc ctggggggttc tctgagactc 60
tcctgtacaa cttctggggtt caccttcact gattactaca tgagctgggt cccgccagtct 120
ccaggaaagg cacttgagtg gttgactttt attagaaaca aagctaattg ttacacaaca 180
gagtacagtg catctgtgaa gggtcgggtc accatctcca gagataattc ccaaagcatc 240
ctctatcttc aaatgaacac cctgagagct gaggacagtg ccacttatta ctgtgcaaga 300
gatatcccgg ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc tgca 354

<210> 29
<211> 352
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 29
Met Glu Gly Ile Ser Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr Thr Glu Glu Met
1 5 10 15
Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Met Lys Glu Pro Cys Phe Arg Glu Glu
20 25 30
Asn Ala Asn Phe Asn Lys Ile Phe Leu Pro Thr Ile Tyr Ser Ile Ile
35 40 45
Phe Leu Thr Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu Val Ile Leu Val Met Gly
50 55 60
Tyr Gln Lys Lys Leu Arg Ser Met Thr Asp Lys Tyr Arg Leu His Leu
65 70 75 80
Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val
85 90 95
Asp Ala Val Ala Asn Trp Tyr Phe Gly Asn Phe Leu Cys Lys Ala Val
100 105 110
His Val Ile Tyr Thr Val Asn Leu Tyr Ser Ser Val Leu Ile Leu Ala
115 120 125
Phe Ile Ser Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Asn Ser
130 135 140
Gln Arg Pro Arg Lys Leu Leu Ala Glu Lys Val Val Tyr Val Gly Val
145 150 155 160
Trp Ile Pro Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp Phe Ile Phe Ala Asn
165 170 175
Val Ser Glu Ala Asp Asp Arg Tyr Ile Cys Asp Arg Phe Tyr Pro Asn
180 185 190
Asp Leu Trp Val Val Val Phe Gln Phe Gln His Ile Met Val Gly Leu
195 200 205
Ile Leu Pro Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys Tyr Cys Ile Ile Ile Ser
210 215 220

Lys Leu Ser His Ser Lys Gly His Gln Lys Arg Lys Ala Leu Lys Thr
 225 230 235 240
 Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe Phe Ala Cys Trp Leu Pro Tyr Tyr
 245 250 255
 Ile Gly Ile Ser Ile Asp Ser Phe Ile Leu Leu Glu Ile Ile Lys Gln
 260 265 270
 Gly Cys Glu Phe Glu Asn Thr Val His Lys Trp Ile Ser Ile Thr Glu
 275 280 285
 Ala Leu Ala Phe Phe His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe
 290 295 300
 Leu Gly Ala Lys Phe Lys Thr Ser Ala Gln His Ala Leu Thr Ser Val
 305 310 315 320
 Ser Arg Gly Ser Ser Leu Lys Ile Leu Ser Lys Gly Lys Arg Gly Gly
 325 330 335
 His Ser Ser Val Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser Phe His Ser Ser
 340 345 350

<210> 30
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 30

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

195 200 205
 Met Val Gly Leu Ile Leu Pro Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys Tyr Cys
 210 215 220
 Ile Ile Ile Ser Lys Leu Ser His Ser Lys Gly His Gln Lys Arg Lys
 225 230 235 240
 Ala Leu Lys Thr Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe Phe Ala Cys Trp
 245 250 255
 Leu Pro Tyr Tyr Ile Gly Ile Ser Ile Asp Ser Phe Ile Leu Leu Glu
 260 265 270
 Ile Ile Lys Gln Gly Cys Glu Phe Glu Asn Thr Val His Lys Trp Ile
 275 280 285
 Ser Ile Thr Glu Ala Leu Ala Phe Phe His Cys Cys Leu Asn Pro Ile
 290 295 300
 Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ala Lys Phe Lys Thr Ser Ala Gln His Ala
 305 310 315 320
 Leu Thr Ser Val Ser Arg Gly Ser Ser Leu Lys Ile Leu Ser Lys Gly
 325 330 335
 Lys Arg Gly Gly His Ser Ser Val Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser
 340 345 350
 Phe His Ser Ser
 355

<210> 31
 <211> 360
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 31

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

Leu Val Lys Phe Ile Cys Leu Ser Ile Trp Gly Leu Ser Leu Leu Leu
165 170 175
Ala Leu Pro Val Leu Leu Phe Arg Arg Thr Val Tyr Ser Ser Asn Val
180 185 190
Ser Pro Ala Cys Tyr Glu Asp Met Gly Asn Asn Thr Ala Asn Trp Arg
195 200 205
Met Leu Leu Arg Ile Leu Pro Gln Ser Phe Gly Phe Ile Val Pro Leu
210 215 220
Leu Ile Met Leu Phe Cys Tyr Gly Phe Thr Leu Arg Thr Leu Phe Lys
225 230 235 240
Ala His Met Gly Gln Lys His Arg Ala Met Arg Val Ile Phe Ala Val
245 250 255
Val Leu Ile Phe Leu Leu Cys Trp Leu Pro Tyr Asn Leu Val Leu Leu
260 265 270
Ala Asp Thr Leu Met Arg Thr Gln Val Ile Gln Glu Thr Cys Glu Arg
275 280 285
Arg Asn His Ile Asp Arg Ala Leu Asp Ala Thr Glu Ile Leu Gly Ile
290 295 300
Leu His Ser Cys Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Phe Ile Gly Gln Lys
305 310 315 320
Phe Arg His Gly Leu Leu Lys Ile Leu Ala Ile His Gly Leu Ile Ser
325 330 335
Lys Asp Ser Leu Pro Lys Asp Ser Arg Pro Ser Phe Val Gly Ser Ser
340 345 350
Ser Gly His Thr Ser Thr Thr Leu
355 360

<210> 32
<211> 24
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 32
gaaactctgc attctcgctt cctg 24

<210> 33
<211> 22
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 33
aggactcggtt tgtacccggtt ga 22

<210> 34
<211> 26
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 34
tgcagattgg ctacccaact gttgca 26

<210> 35

<211> 22
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 35
 ctcttcacac ctcttgaaa tc 22

<210> 36
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 36
 ccaaggaaag catagaggat gg 22

<210> 37
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 37
 gtggtcatta tctatgccct gg 22

<210> 38
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 38
 cgaccctgct gtataagatg ac 22

<210> 39
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 39
 tattcctgct gagcctgctg ggaaa 25

<210> 40
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 40
 Gln Ser Leu Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr
 1 5 10

<210> 41
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 41

Met Gln Ser Phe Asn Leu Arg Thr
 1 5

<210> 42
 <211> 3
 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 42

Asp Asn Tyr
1

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 43

Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 44

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn Tyr
1 5

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 45

Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 46

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 47

Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser
1 5

<210> 48

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 48

Asp Asn Tyr Met Ser
1 5

<210> 49

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 49

Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Asp Tyr Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Arg Gly

<210> 50

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 50

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 51

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 51

Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Asp Tyr Ser Ala
50 55 60

Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 52
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 52
 cagagtctgt tcaacagtcg aacccgaaag aactac 36

<210> 53
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 53
 atgcaatcct ttaatcttcg gacg 24

<210> 54
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 54
 gataactac 9

<210> 55
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 55
 gatgtcgggt ccaactactt tgactac 27

<210> 56
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 56
 ggggtcacct tctactgataa ctac 24

<210> 57
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 57
 gcaagagatg tcggttccaa ctactttgac tac 33

<210> 58
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

 <400> 58
 aaatccagtc agagtctgtt caacagtcga acccgaaaga actacttggc t 51

 <210> 59
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

 <400> 59
 tgggcatccg ctagggattc t 21

 <210> 60
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

 <400> 60
 gataactaca tgagt 15

 <210> 61
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

 <400> 61
 tttattagaa acaaagctaa tggttacaca acagactaca gtgcatctgt gaggggt 57

 <210> 62
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

 <400> 62
 gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggctact 60
 atgagctgca aatccagtcga gagtctgttc aacagtcgaa cccgaaagaa ctacttggct 120
 tggtagcagc agaagccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccgctagg 180
 gattctgggg tccctgtctg cttcacaggc agtggatctg agacatattt cactctcacc 240
 atcagccgtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcatgcaatc ttttaatctt 300
 cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

 <210> 63
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

 <400> 63
 gaggtgaacc tgggtggagtc tggaggaggc ttggtacagc ctgggggttc tctgagactc 60
 tcctgtgcaa cttctgggtt cacttcact gataactaca tgagttgggt ccgccagcct 120
 ccaggaaagg cacttgagtg gttgggcttt attagaaaca aagctaattg ttacacaaca 180
 gactacagtg catctgtgag gggtcggttc accatctcaa gagataattc ccaaagcatc 240

ctctatcttc aaatgaacgc cctgagagcc gaagacagtg ccacttatta ctgtgcaaga 300
 gatgtcgggtt ccaactactt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctctca 360

<210> 64
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 64

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

<210> 65
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 65

Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Val Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly
 1 5 10 15
 Phe Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 15

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

385				390				395				400			
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly 405	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn 410	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro 415	Pro
Val	Leu	Asp	Ser 420	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe 425	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu 430	Thr	Val
Asp	Lys	Ser 435	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly 440	Asn	Val	Phe	Ser	Cys 445	Ser	Val	Met
His	Glu 450	Ala	Leu	His	Asn	His 455	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser 460	Leu	Ser	Leu	Ser
Pro 465	Gly	Lys													

```
<210> 66
<211> 239
<212> PRT
<213> mus musculus
```

<400> 66

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

<210> 67
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 67

Met Lys Met Trp Leu Asn Trp Val Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly
 1 5 10 15
 Ile Gln Cys Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asp Asn Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu
 50 55 60
 Glu Trp Leu Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Asp
 65 70 75 80
 Tyr Ser Ala Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 85 90 95
 Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Ser
 100 105 110
 Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 145 150 155 160
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 210 215 220
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
 225 230 235 240
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 245 250 255
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
325 330 335
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
340 345 350
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
355 360 365
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
370 375 380
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
385 390 395 400
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
405 410 415
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
420 425 430
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
435 440 445
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
450 455 460
Leu Ser Pro Gly Lys
465

<210> 68
<211> 720
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 68
atggagtcac aggccaggt tcttatattg ctgctgctat gggatatctgg tacctgtggg 60
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggctact 120
atgagctgca aatccagtc gagtctgtac aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggct 180
tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 240
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300
atcaccagtg tgcaggctga ggacctggca gttttttact gcaagcaatc ttataatctt 360
cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgta cggtgggccgc tcccagcgtg 420
ttcatcttcc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 480
ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 540
agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 600
agcagcacc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaagggtga cgcctgtgag 660
gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgtgta 720

<210> 69
<211> 1404
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 69
atgaagctgt ggctgaactg ggtgttcctg gtgacctgc tgaacggctt ccagtgcgaa 60

```

gtgaaactgg tggagtctgg cggcggactg gtgcagccag gcggcagcct gagactgagc 120
tgcaccacct ccggcttcac cttcaccgac tactacatga gctgggtgcg ccagagcccc 180
ggcaaggccc tggaatggct gaccttcac cggacaagg ccaacggcta caccaccgag 240
tacagcgcca gcgtgaaggg ccggttcacc atcagccggg acaacagcca gagcatcctg 300
tacctgcaga tgaacaccct gcgggcccag gactccgcca cctactactg cgccagagac 360
atccccggct tcgcctactg gggccagggc accctgggtga ccgtgtccgc cgccagcacc 420
aagggcccaa gcgtgttccc gctagcccc agcagcaaga gcaccagcgg cggcacagcc 480
gccctgggct gcctgggtgaa ggactacttc cccgagcccc tgaccgtgtc ctggaacagc 540
ggagccctga cctccggcgt gcacaccttc cccgccgtgc tgcagagcag cggcctgtac 600
agcctgagca gcgtgggtgac cgtgccagc agcagcctgg gcaccagac ctacatctgt 660
aacgtgaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagtggagcc caagagctgt 720
gacaagaccc acacctgccc cccctgccc gcccccagc tgctgggcgg acccagcgtg 780
ttcctgttcc ccccaagcc caaggacacc ctgatgatca gcagaacccc cgagggtgacc 840
tgtgtgggtg tggacgtgtc ccacgaggac ccagaggtga agttcaactg gtacgtggac 900
ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg agcagtacaa cagcacctac 960
aggggtgggt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 1020
tgtaagggtg ccaacaaggc cctgccagcc ccaatcgaaa agaccatcag caaggccaag 1080
ggccagccaa gagagcccca ggtgtacacc ctgccacca gcagggagga gatgaccaag 1140
aaccaggtgt ccctgacctg tctgggtgaag ggcttctacc caagcgacat cgccgtggag 1200
tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccccagt gctggacagc 1260
gacggcagct tcttctgtga cagcaagctg accgtggaca agagcagatg gcagcagggc 1320
aacgtgttca gctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc 1380
ctgagcctgt cccagggcaa gtga 1404

```

```

<210> 70
<211> 720
<212> DNA
<213> mus musculus

```

```

<400> 70
atggagtcac agactctggc cttcatatcc atactgctct ggttatatgg tacctgtggg 60
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggctact 120
atgagctgca aatccagtc gagtctgttc aacagtcgaa cccgaaagaa ctacttggct 180
tggtaccagc agaagccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccgctagg 240
gattctgggg tccctgctcg cttcacaggc agtggatctg agacatattt cactctcacc 300
atcagccgtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcatgcaatc ttttaatctt 360
cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgta cgggtggccg tcccagcgtg 420
ttcatcttcc ccccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 480

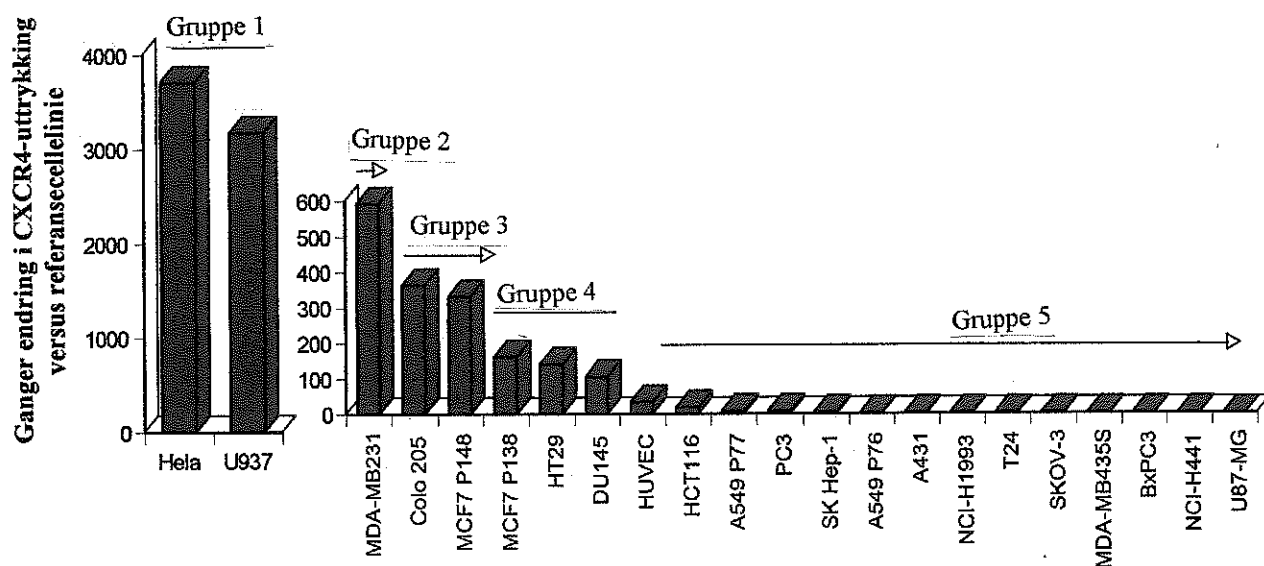
```

ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 540
agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 600
agcagcacc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaagggtga cgccctgtgag 660
gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgtgta 720

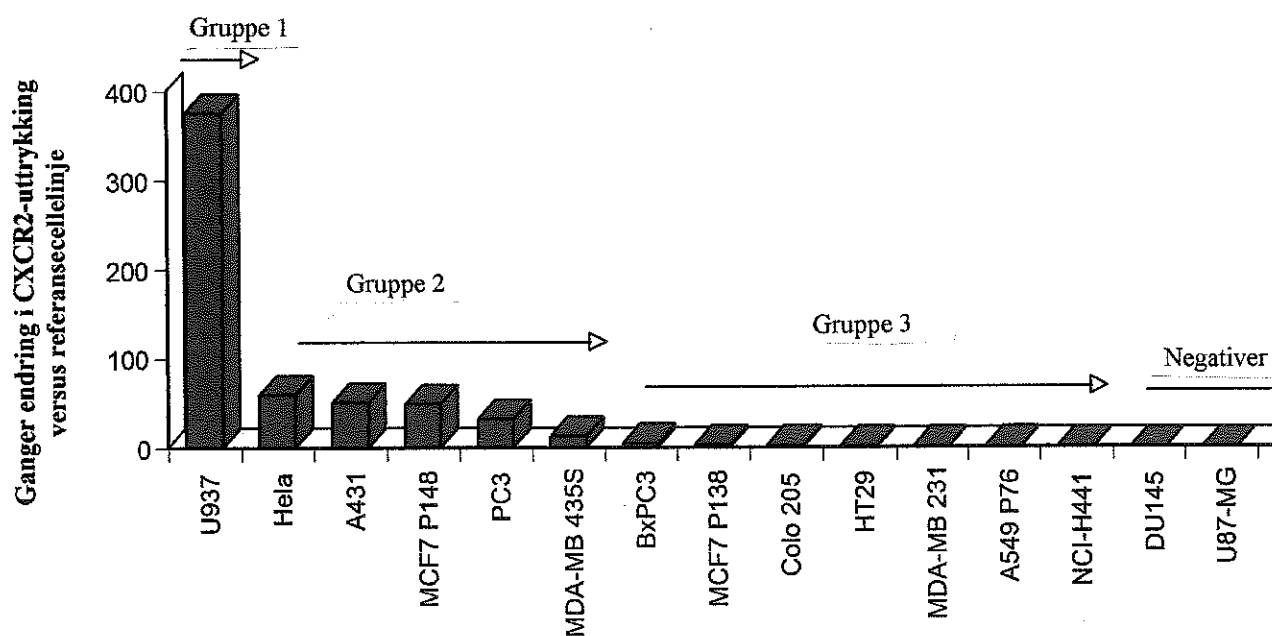
<210> 71
<211> 1410
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 71
atgaagatgt ggctgaactg ggtgttcctg gtgaccctgc tgaacggcat ccagtgcgaa 60
gtgaacctgg tggagtctgg cggcggactg gtgcagcctg ggggcagcct gagactgagc 120
tgcgccacct ccggcttcac cttcaccgac aactacatga gctgggtgcg ccagccccct 180
ggcaaggccc tggaatggct gggcttcac cggacaagg ccaacggcta caccaccgac 240
tacagcgcca gcgtgctggg cagattcacc atcagccggg acaacagcca gagcatcctg 300
tacctgcaga tgaacgccct gcgggcccag gacagcgcca cctactactg tgcccgggac 360
gtgggcagca actacttcga ctactggggc cagggcacca cactgaccgt gtccagcgcc 420
agcaccaagg gcccctccgt gttcccgtga gcccagca gcaagagcac cagcggcgcc 480
acagccgccc tgggctgcct ggtgaaggac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcctgg 540
aacagcggag ccctgacctc cggcgtgcac accttccccg ccgtgctgca gagcagcggc 600
ctgtacagcc tgagcagcgt ggtgaccgtg cccagcagca gcctgggcac ccagacctac 660
atctgtaacg tgaaccacaa gccagcaac accaagggtg acaagagagt ggagcccaag 720
agctgtgaca agaccacac ctgccccccc tgcccagccc ccgagctgct gggcggaccc 780
agcgtgttcc tggtcccccc caagcccaag gacacctga tgatcagcag aacccccgag 840
gtgacctgtg tgggtgtgga cgtgtccac gaggaccag aggtgaagtt caactggtac 900
gtggacggcg tggaggtgca caacgccaag accaagccca gagaggagca gtacaacagc 960
acctacaggg tgggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 1020
tacaagtgtg aggtgtccaa caaggccctg ccagcccaa tcgaaaagac catcagcaag 1080
gccaagggcc agccaagaga gcccaggtg tacaccctgc caccagcag ggaggagatg 1140
accaagaacc aggtgtccct gacctgtctg gtgaagggt tctacccaag cgacatcgcc 1200
gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccacccc ccagtgctg 1260
gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc aagctgaccg tggacaagag cagatggcag 1320
cagggaacg tggtcagctg ctccgtgatg cagaggccc tgcacaacca ctacaccag 1380
aagagcctga gcctgtcccc aggcaagtga 1410

1/20

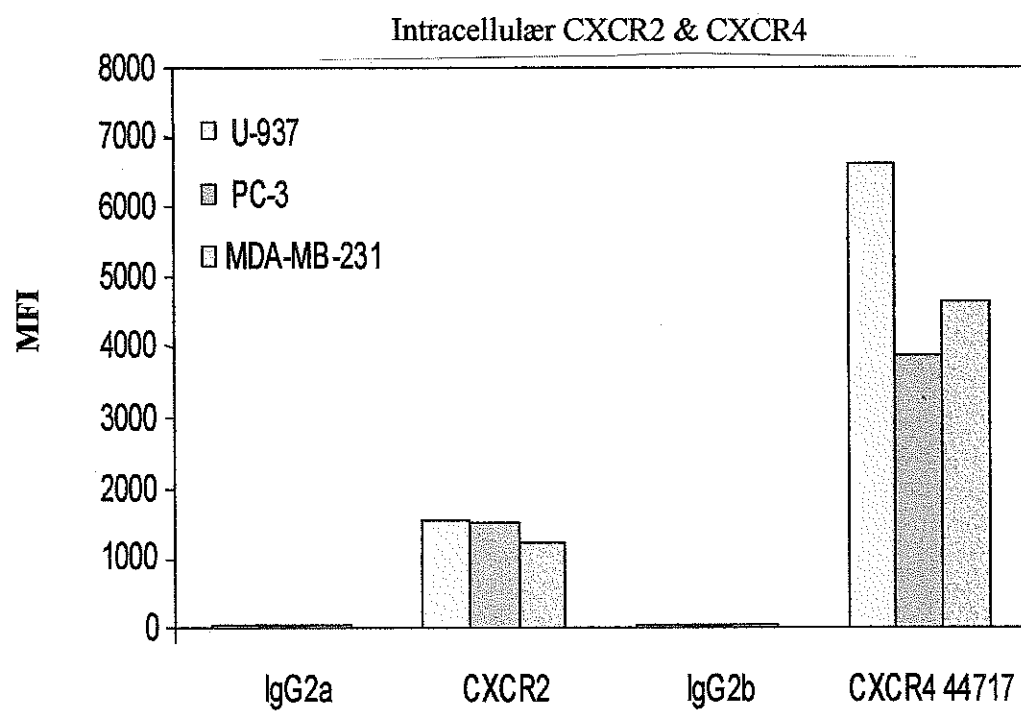


FIGUR 1A

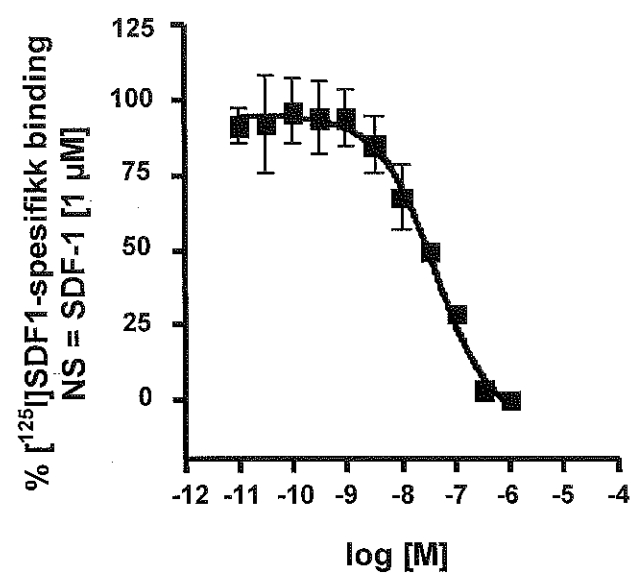


FIGUR 1B

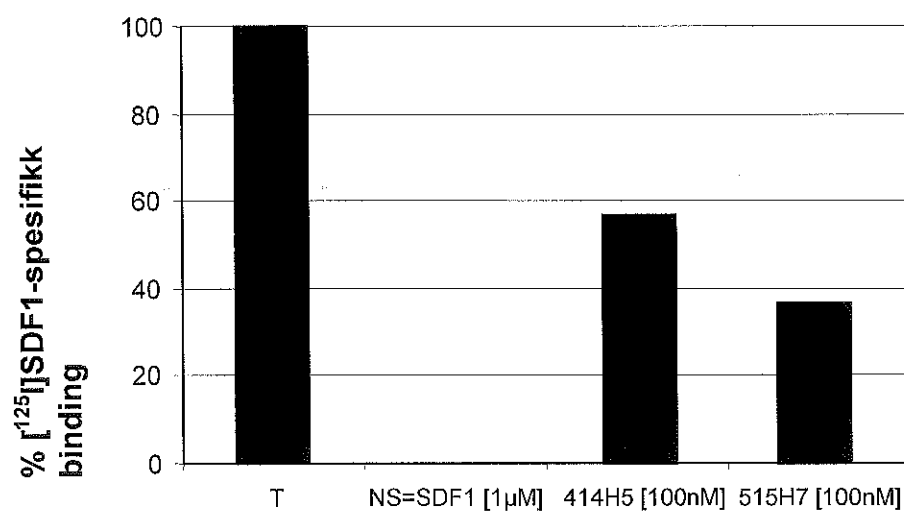
2/20

**FIGUR 2**

3/20

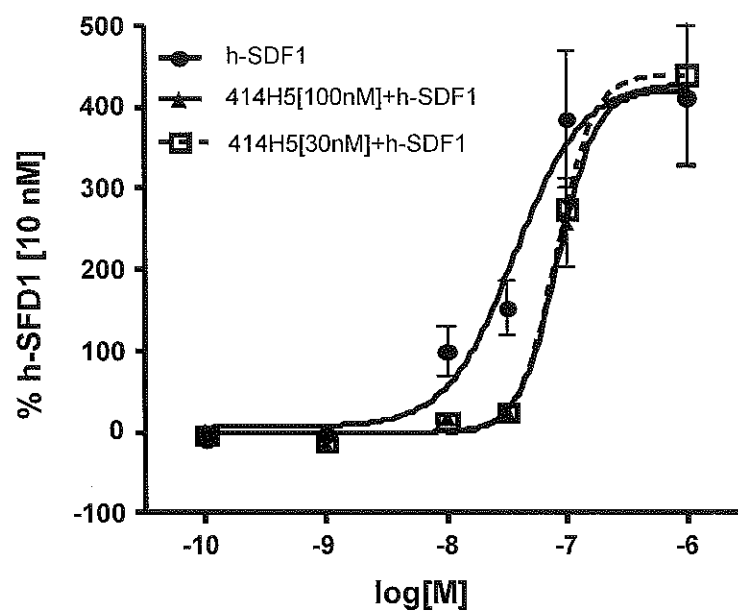


FIGUR 3A

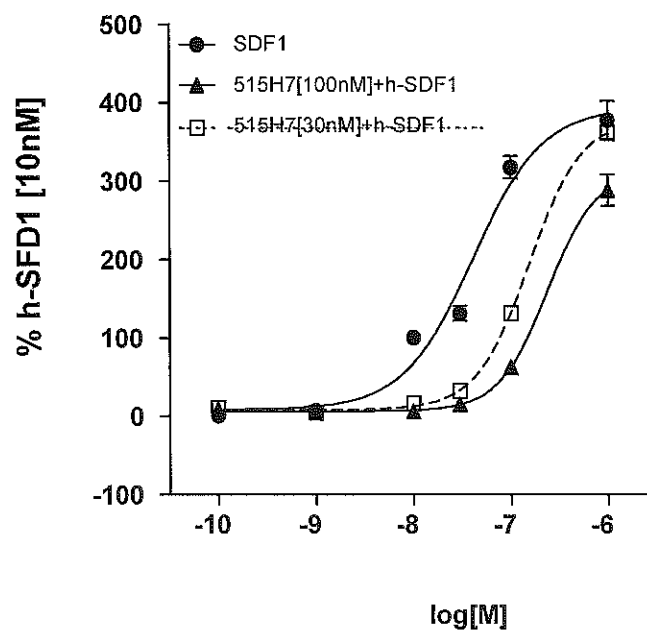


FIGUR 3B

4/20

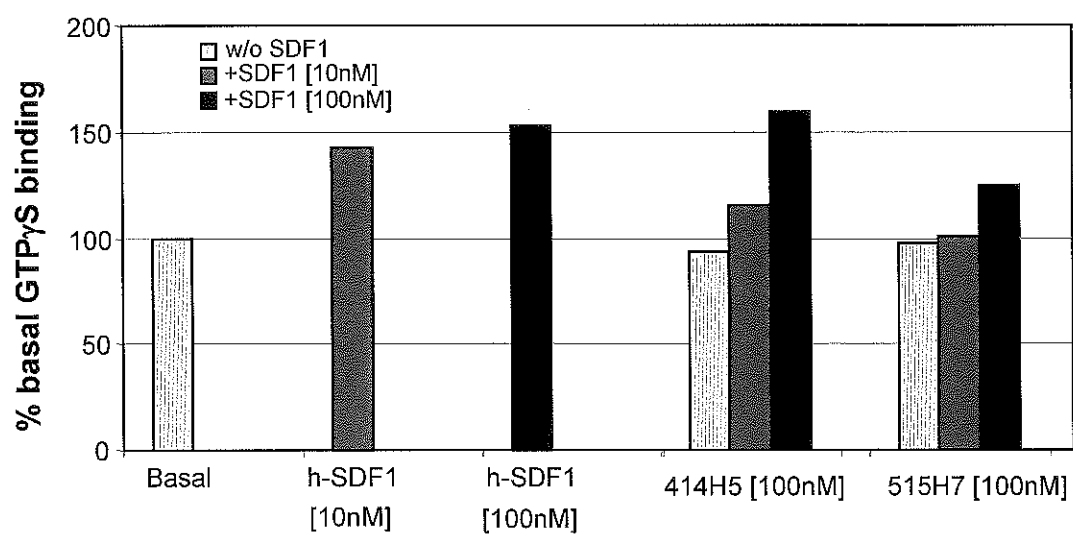


FIGUR 4A

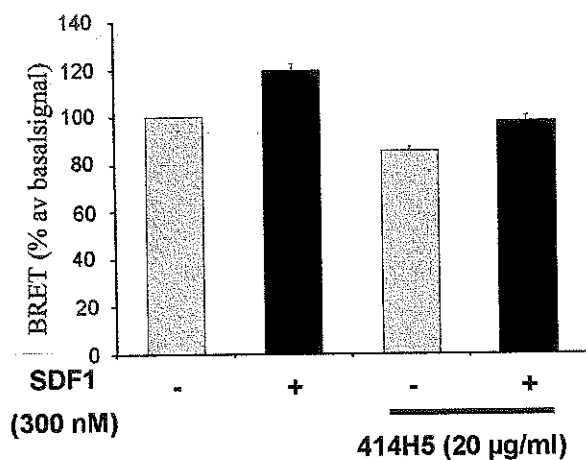


FIGUR 4B

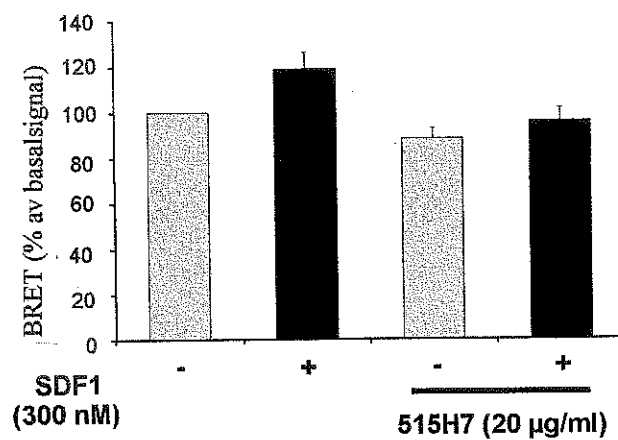
5/20

**FIGUR 5**

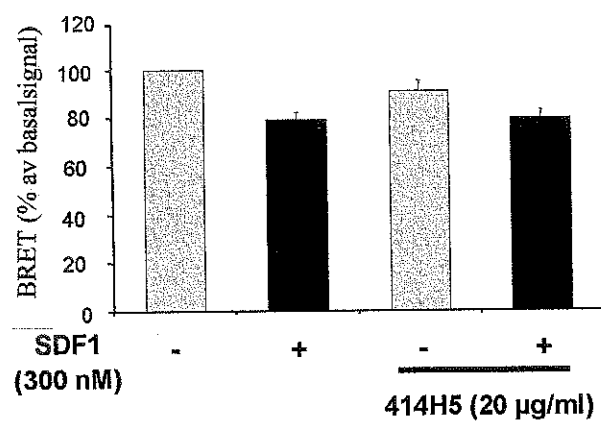
6/20



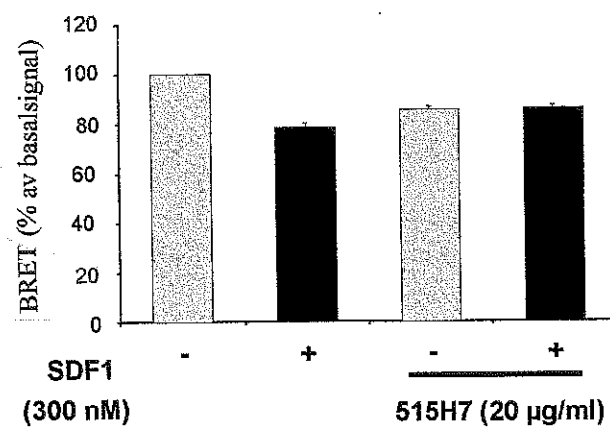
FIGUR 6A



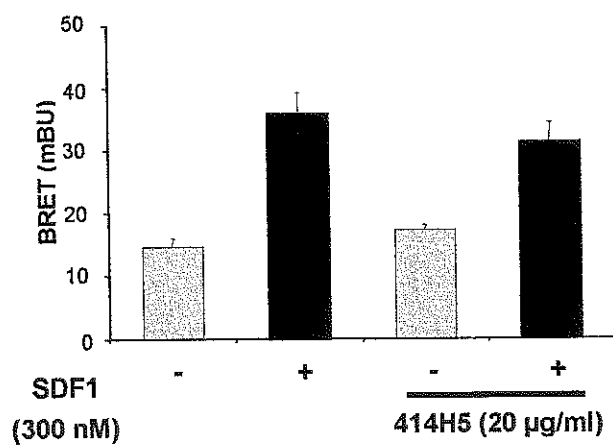
FIGUR 6B



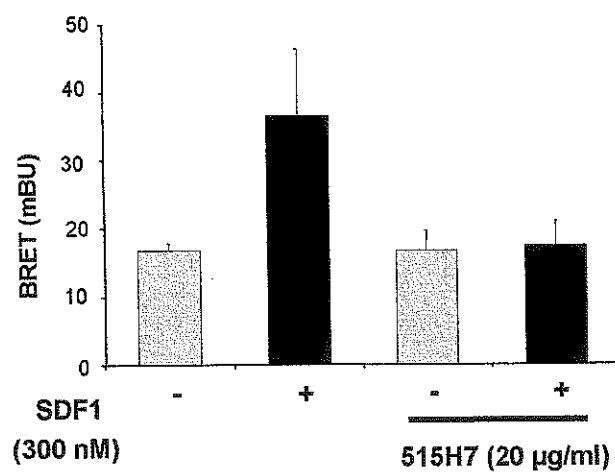
FIGUR 6C



FIGUR 6D

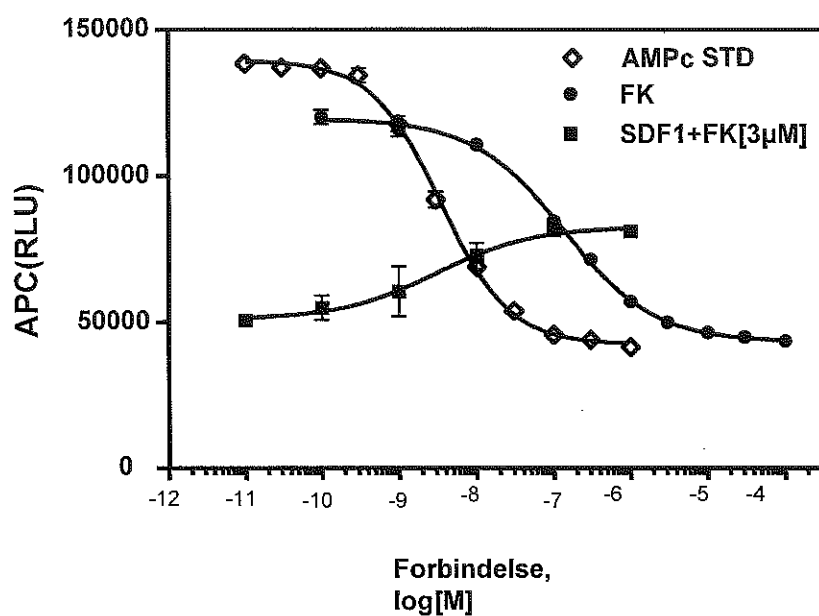


FIGUR 6E

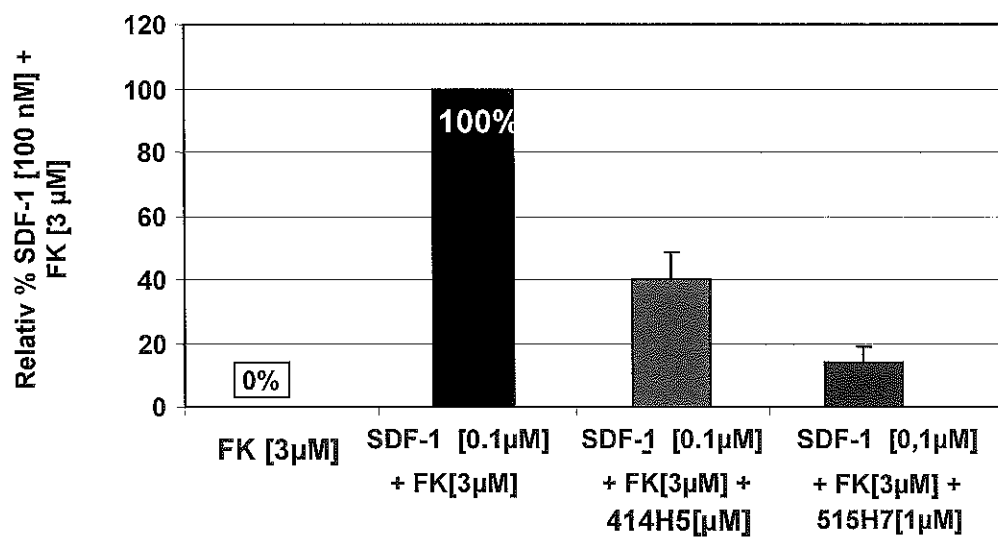


FIGUR 6F

7/20

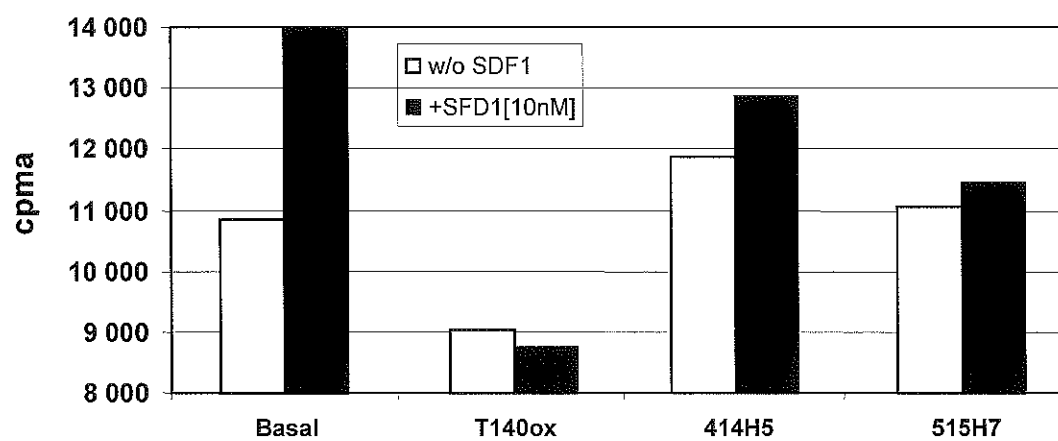


FIGUR 7A

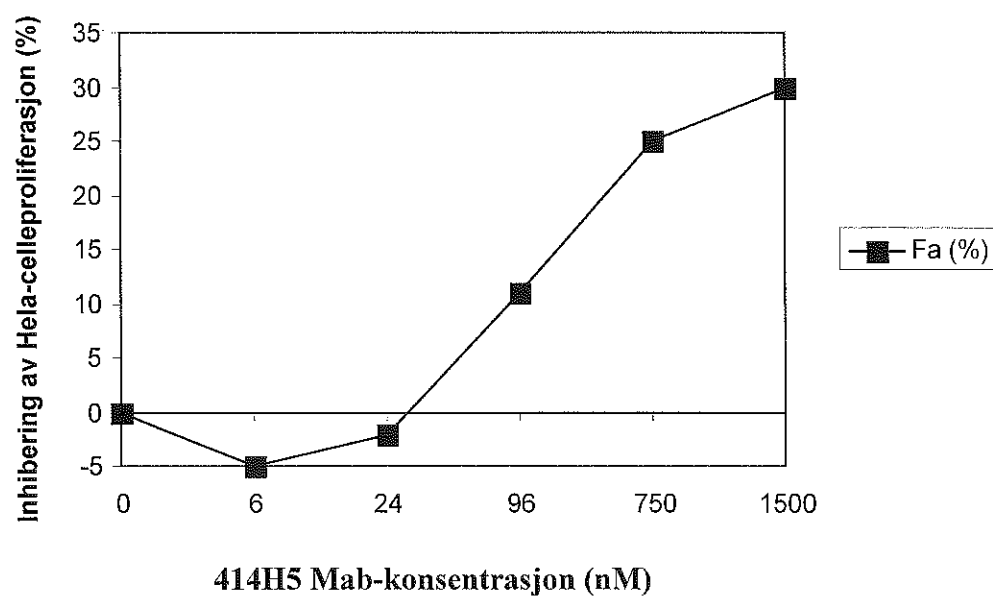


FIGUR 7B

8/20

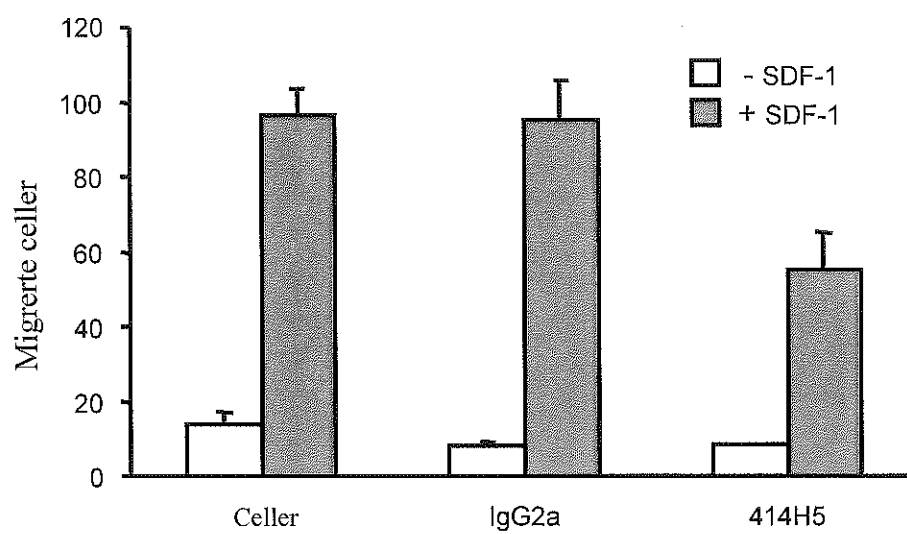


FIGUR 8

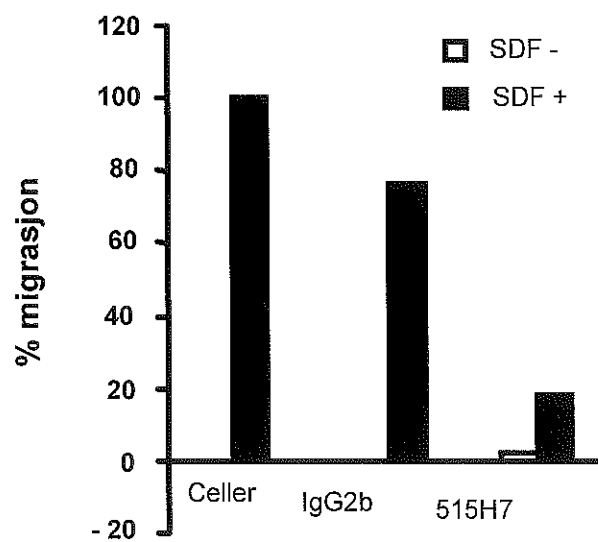


FIGUR 9

9/20



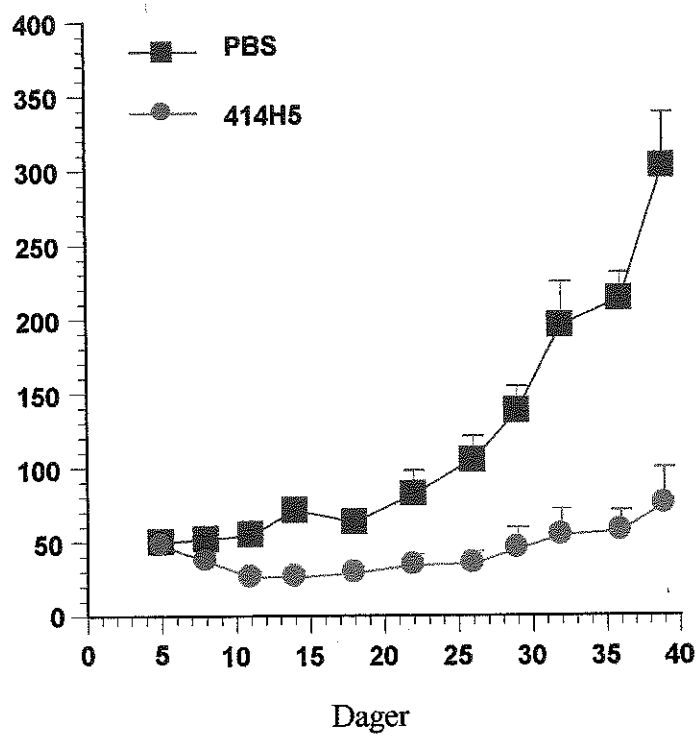
FIGUR 10A



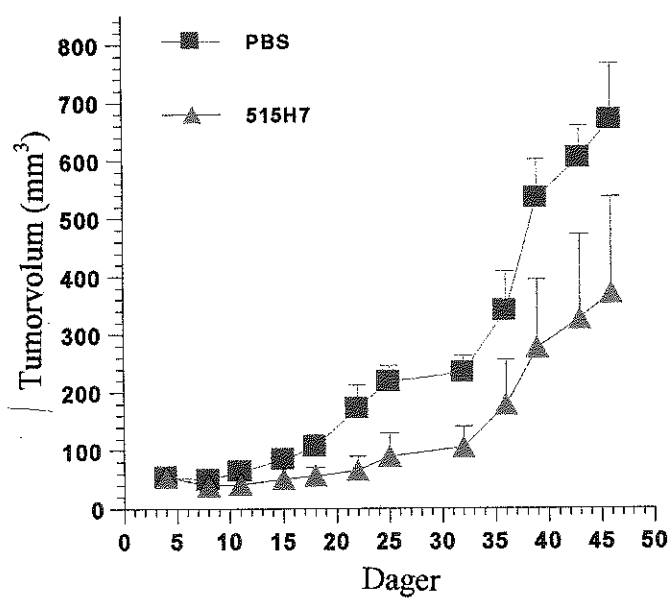
FIGUR 10B

10/20

A

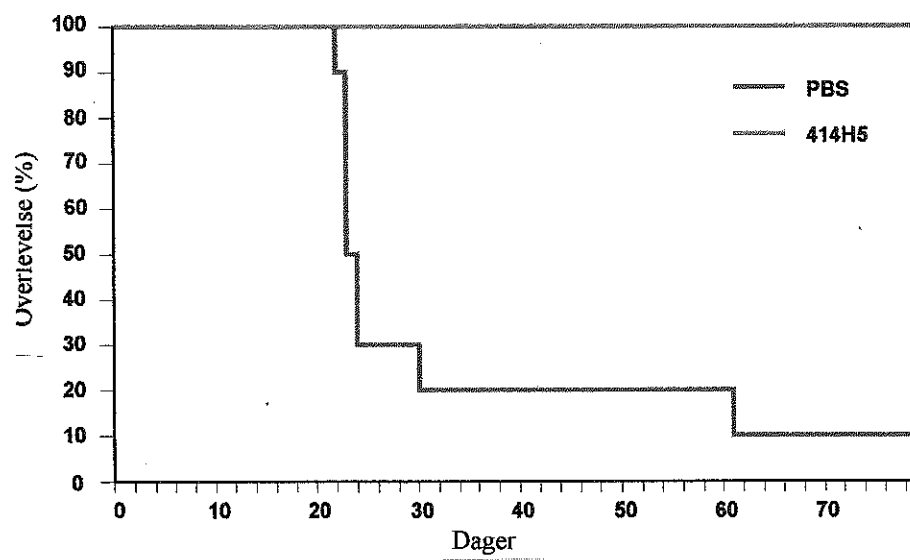


B



FIGUR 11

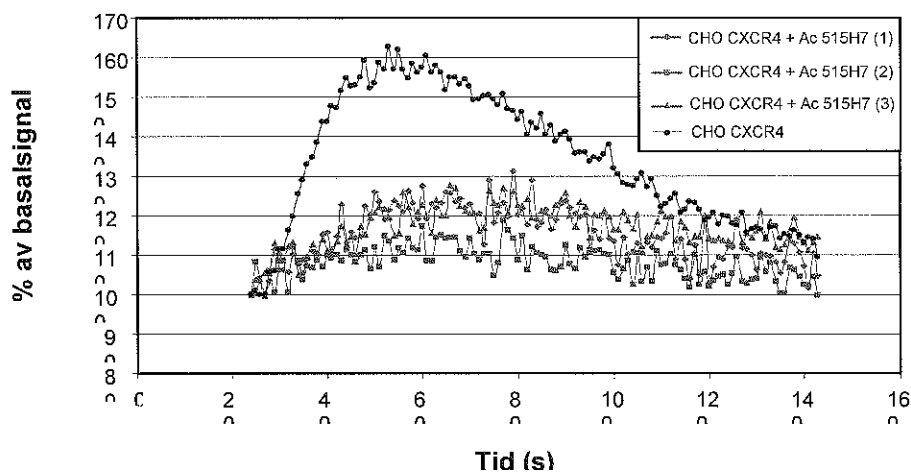
11/20



FIGUR 12

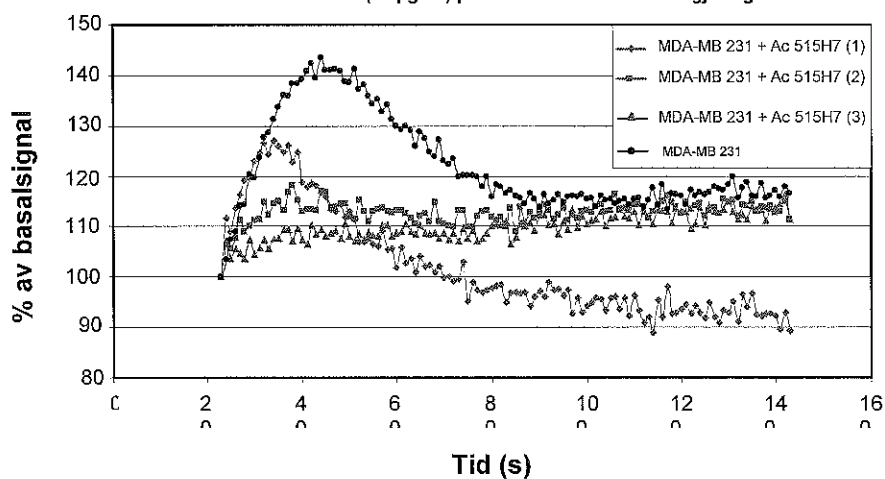
12/20

Effekt av 515H7-antistoff (20 µg/ml) på CHO-CXCR4-kalsiumfrigjøring induisert ved SDF1 100 nM



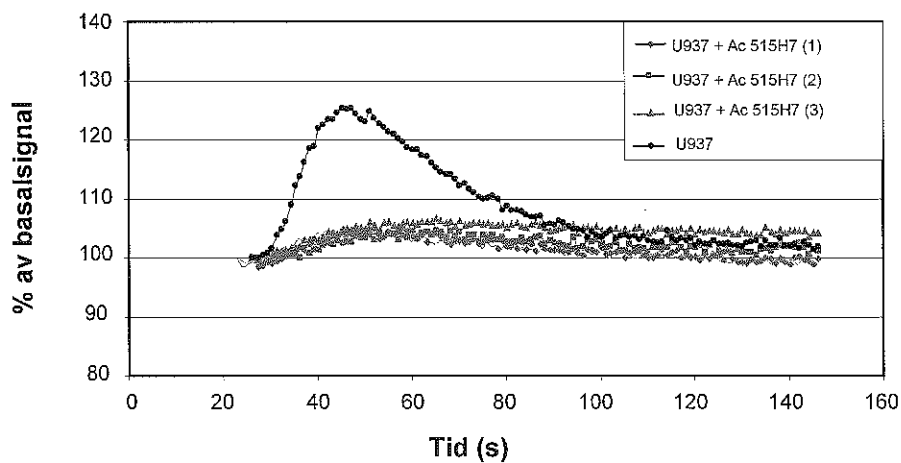
FIGUR 13A

Effekt av 515H7-antistoff (20 µg/ml) på MDA-MB-231-kalsiumfrigjøring induisert ved SDF1 100 nM



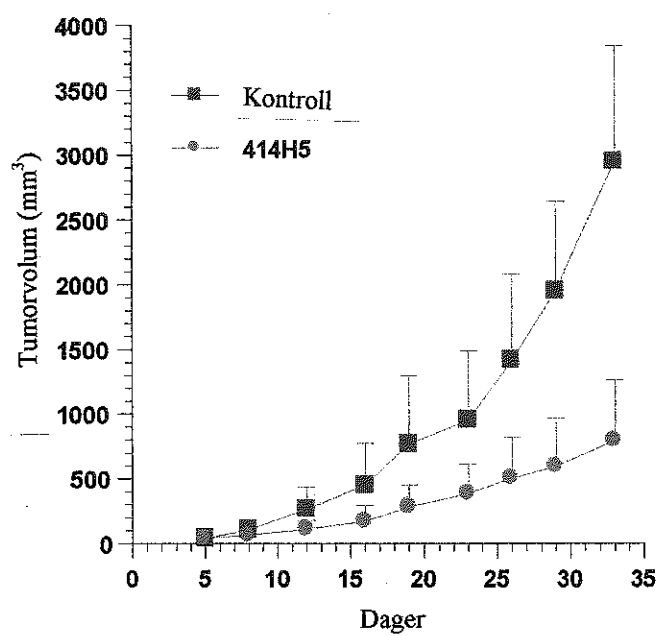
FIGUR 13B

Effekt av 515H7-antistoff (20 µg/ml) på U937-kalsiumfrigjøring induisert ved SDF1 100 nM



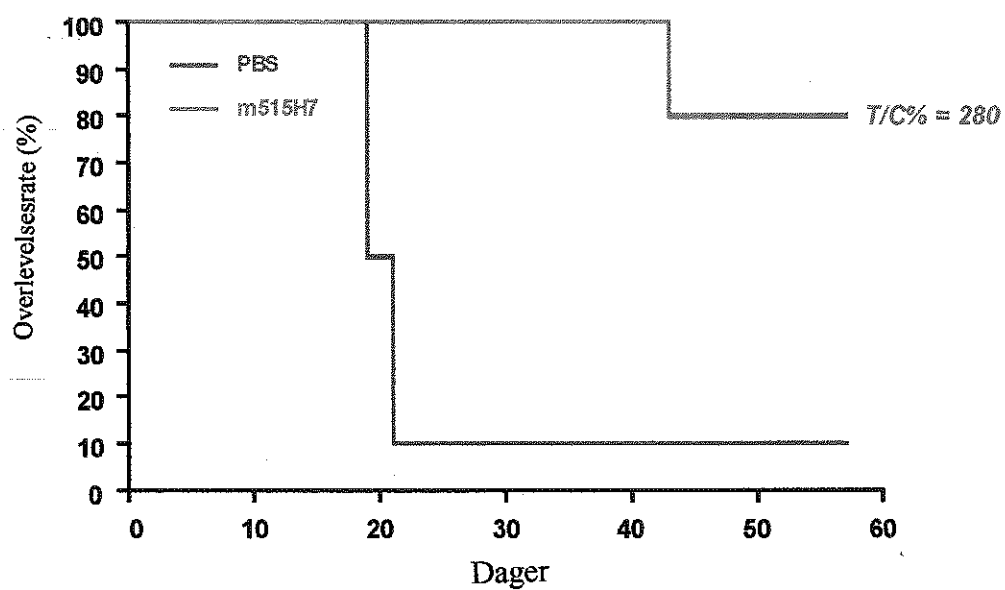
FIGUR 13C

13/20

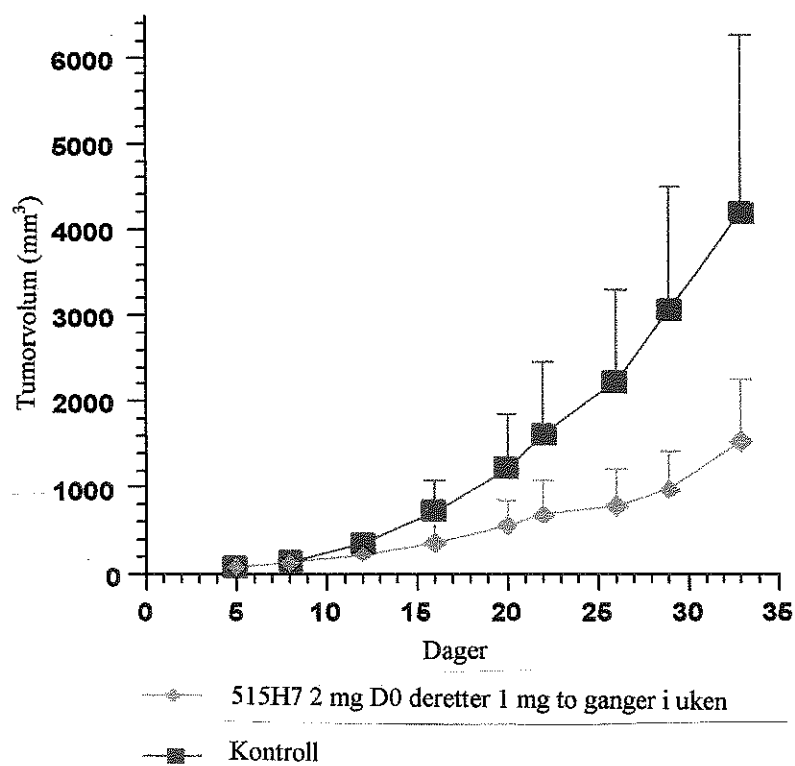


FIGUR 14

14/20

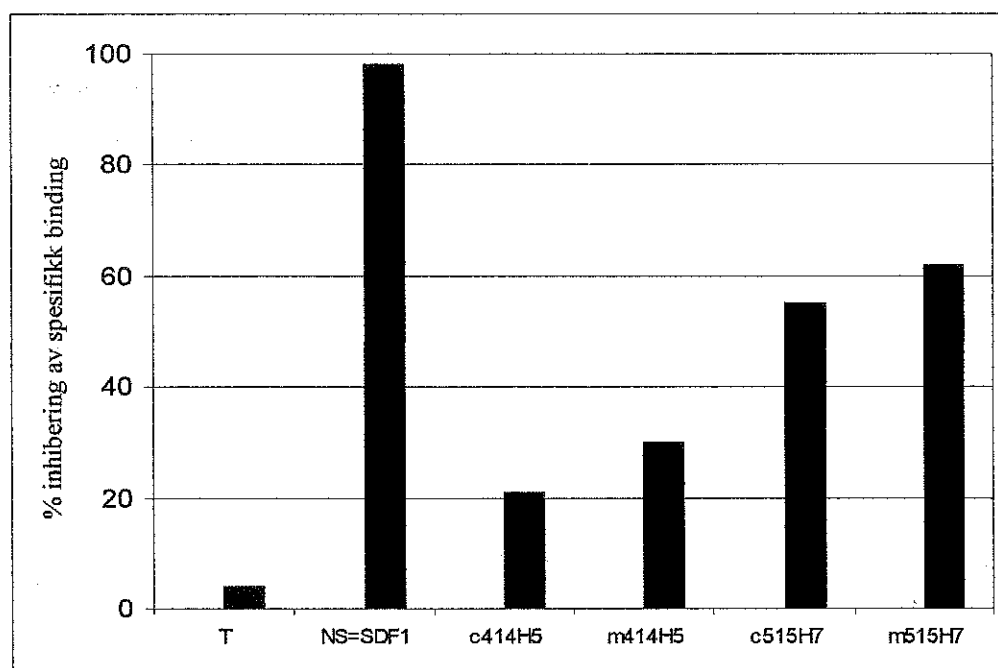


FIGUR 15

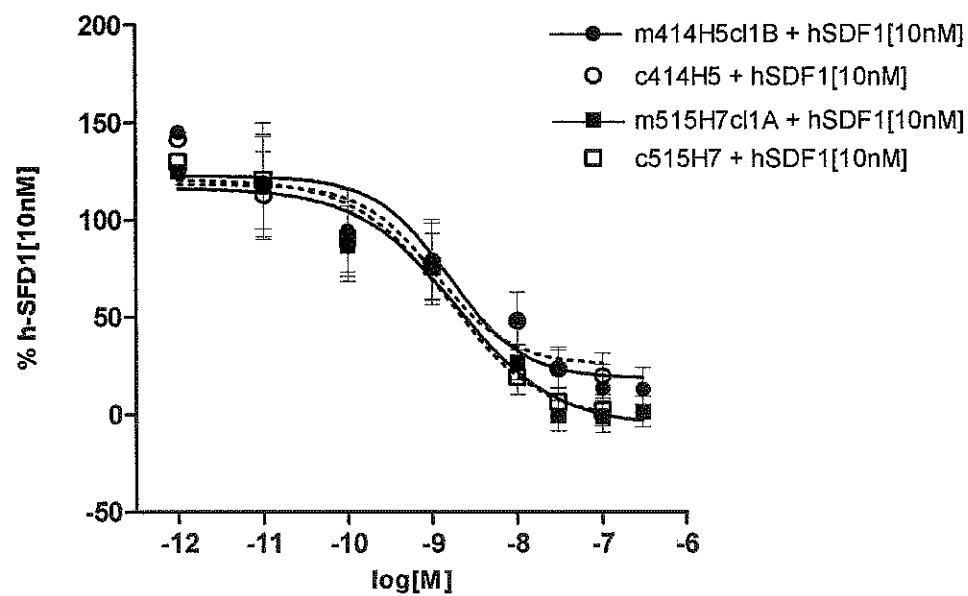


FIGUR 16

15/20

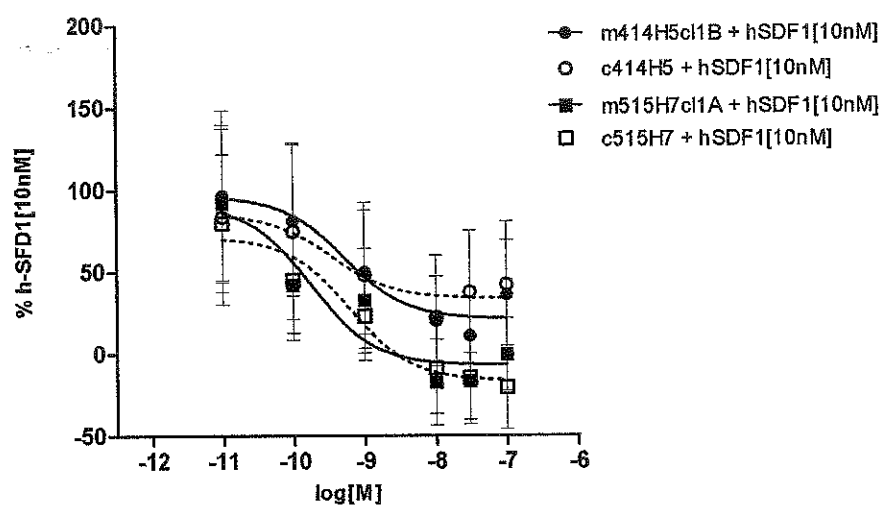


FIGUR 17

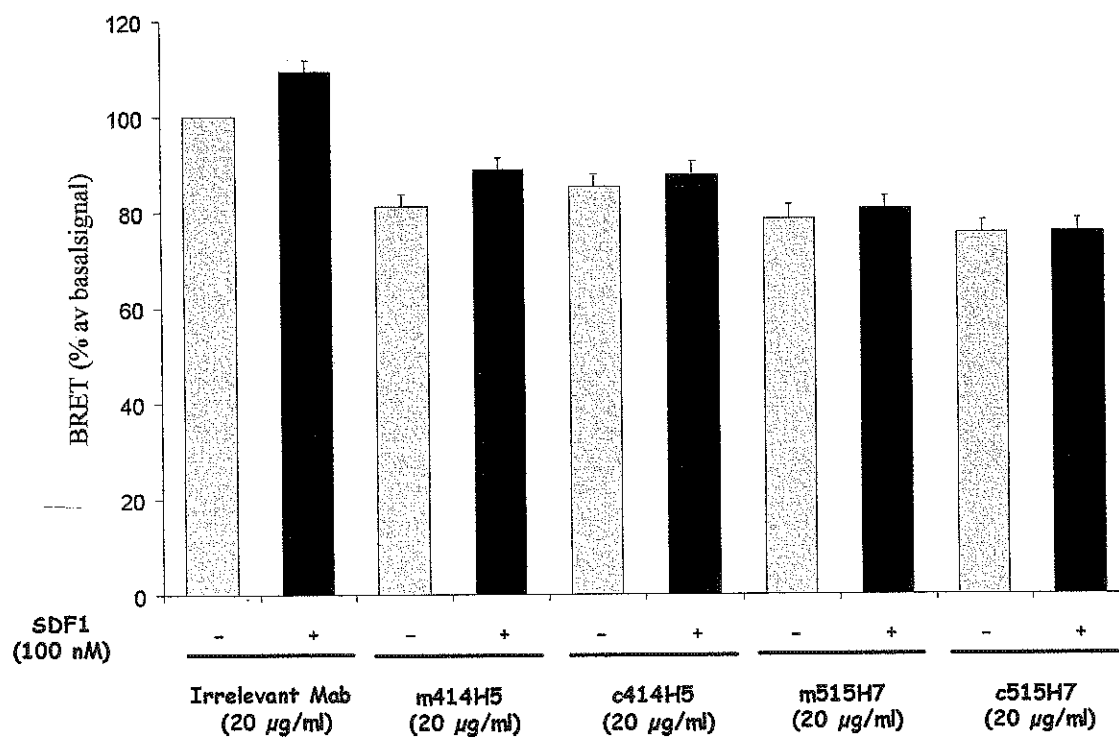


FIGUR 18

16/20

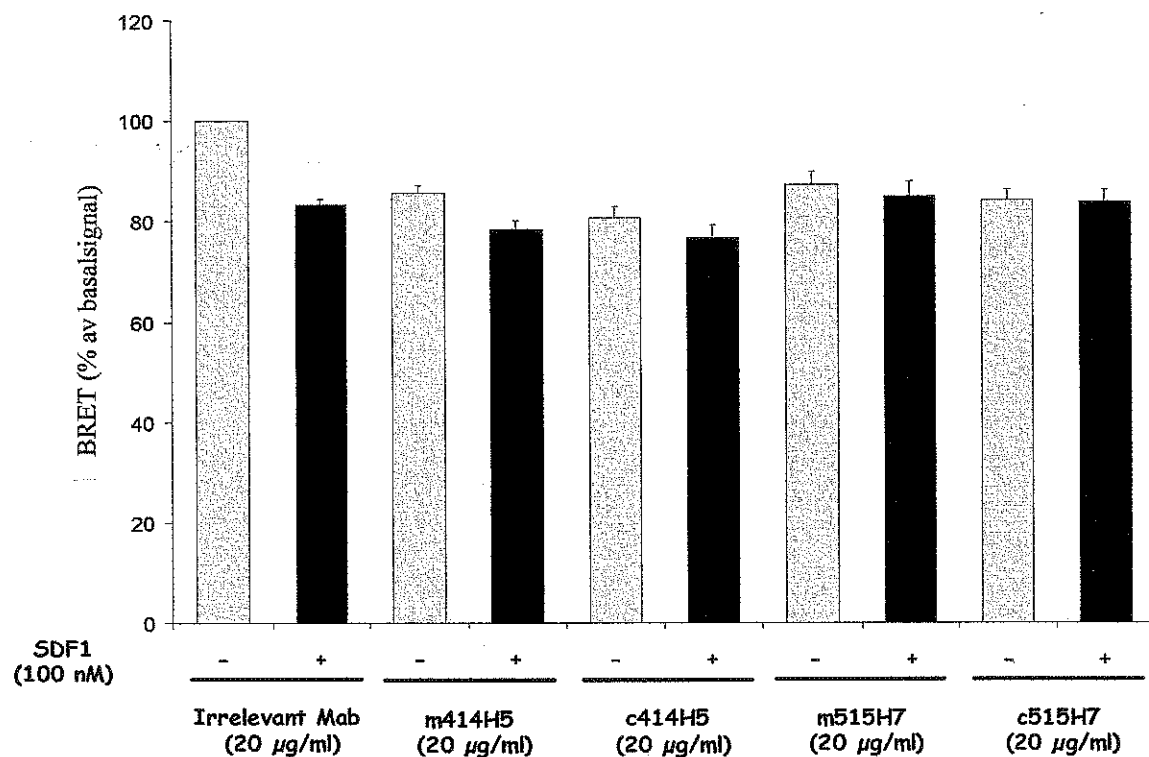


FIGUR 19

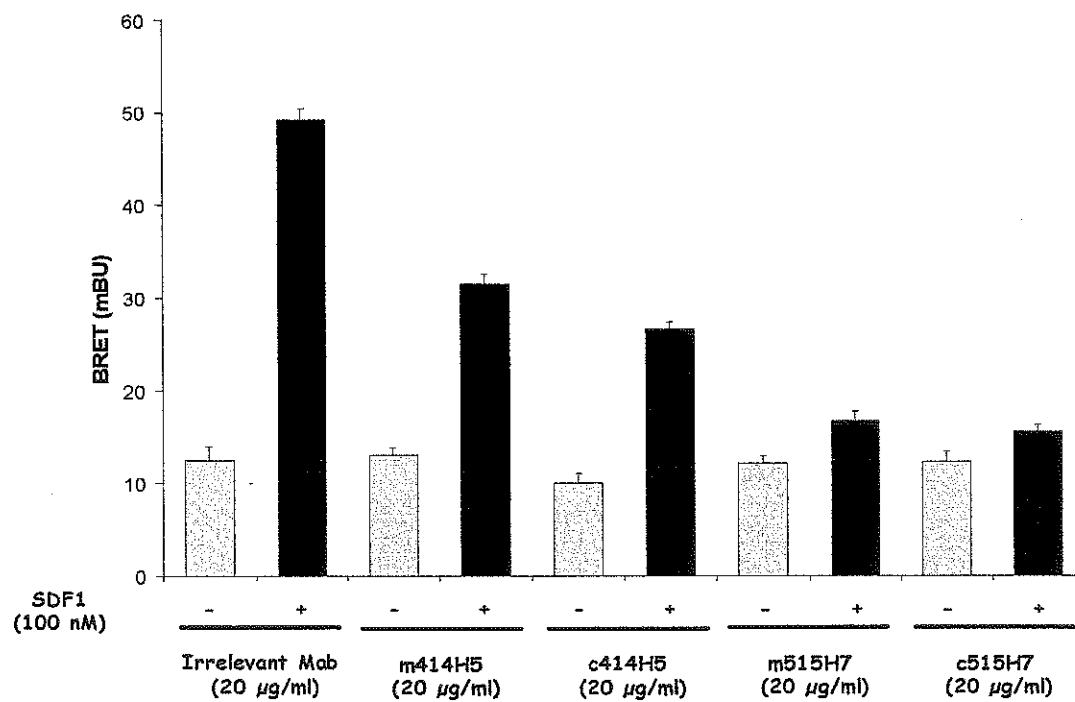


FIGUR 20A

17/20

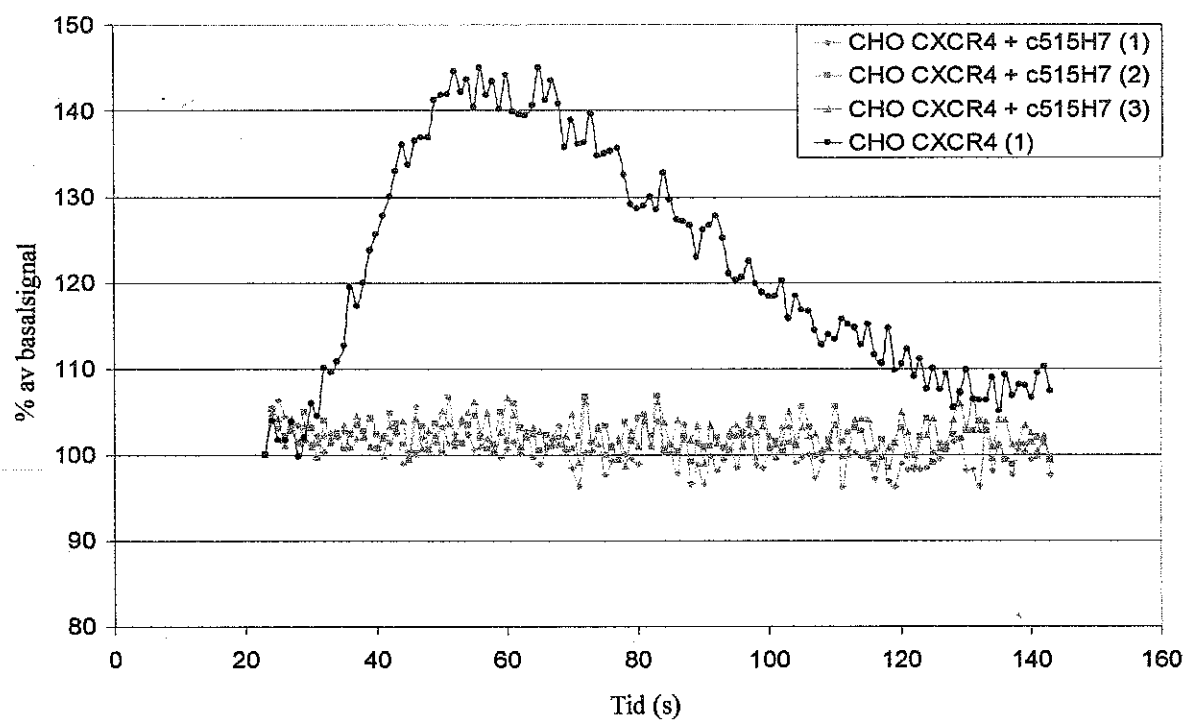


FIGUR 20B

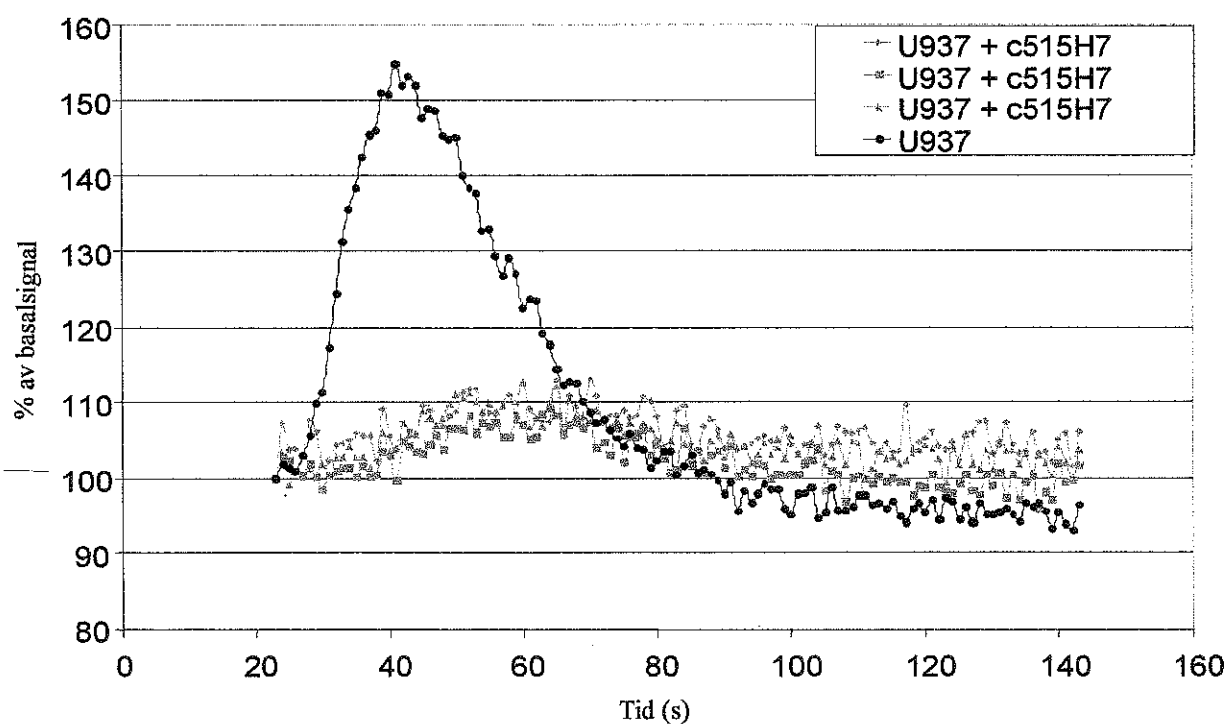


FIGUR 20C

18/20

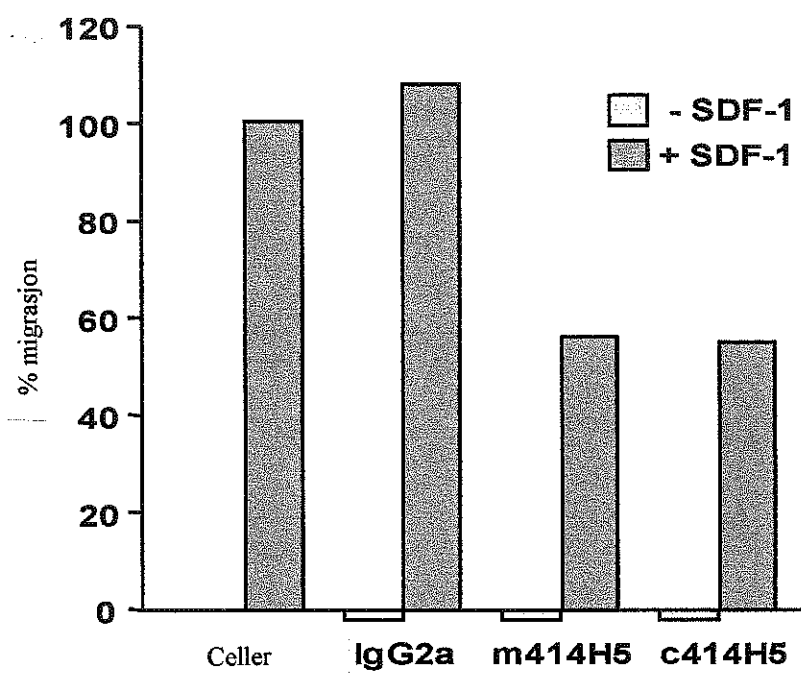


FIGUR 21A

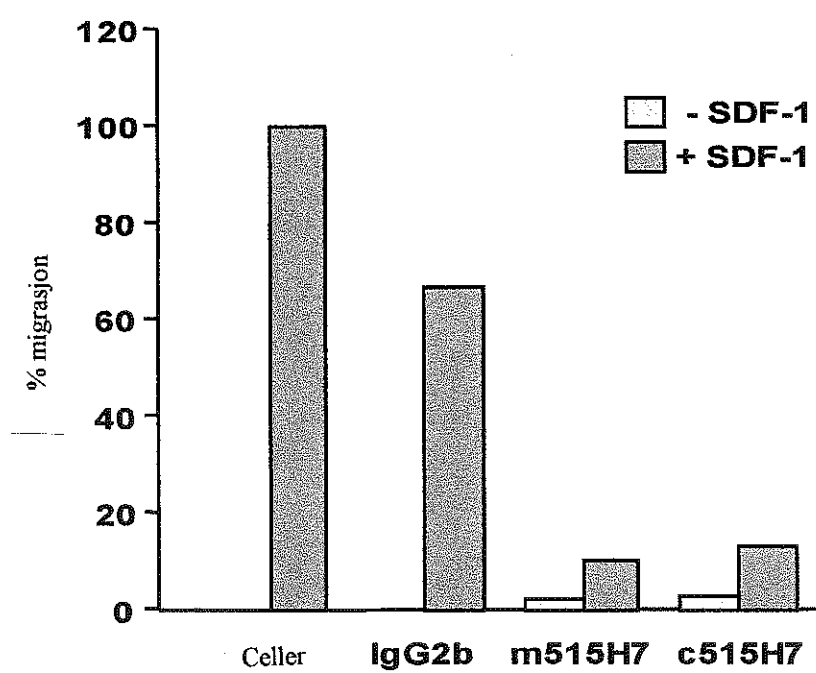


FIGUR 21B

19/20

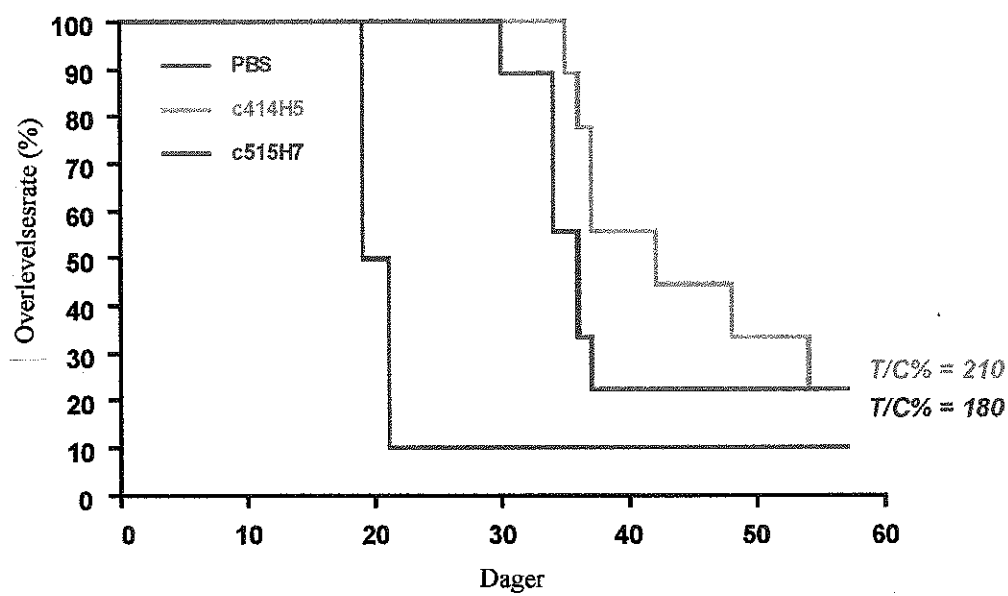


FIGUR 22A



FIGUR 22B

20/20



FIGUR 23