



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **316076**

(13) B1

(51) Int Cl⁷

C 12 P 21/08, C 12 N 15/13

Patentstyret

| | | | |
|-------------------|---|--------------------------------------|----------------------------|
| (21) Søknadsnr | 19913228 | (86) Int. inng. dag og søknadsnummer | 1990.12.21, PCT/GB90/02017 |
| (22) Inng. dag | 1991.08.19 | (85) Videreføringsdag | 1991.08.19 |
| (24) Løpedag | 1990.12.21 | (30) Prioritet | 1989.12.21, GB, 8928874 |
| (41) Alm. tilgj. | 1991.10.21 | | |
| (45) Meddelt dato | 2003.12.08 | | |
| (71) Patenthaver | Celltech R & D Ltd, 208 Bath Road, Slough, Berkshire SL1 3WE, England, GB | | |
| (72) Oppfinner | John Robert Adair, High Wycombe, Buckinghamshire, England, GB Diljeet Singh Athwal, London, England, GB John Spencer Emtage, Marlow, Buckinghamshire, England, GB | | |
| (74) Fullmektig | J.K. Thorsens Patentbureau AS, 0134 Oslo | | |

(54) Benevnelse **Fremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt CDR-podet antistoffmolekyl, DNA-molekyl, klonings- eller ekspresjonsvektor samt vertscelle**

(56) Anførte publikasjoner NO 912385
VERHOYEN ET AL., SCIENCE, VOL 239, 1988, P 1534-1536
QUEEN ET AL. PROC.NATL ACAD.SCI., VOL 86, 1989, P 10029-10033
RIECHMANN ET AL., NATURE, VOL 332, 1988, P 323-327
JONES ET AL., NATURE, VOL 321, 1986, P 522-525
ROBERTS ET AL., NATURE, VOL 328, 1987, P 731-734

(57) Sammendrag

CDR-podede tunge og lette kjeder av antistoff som omfatter akseptorstruktur og donorantigen-bindingsregioner, idet de tunge kjeder omfatter donorrester i minst en av posisjonene (6,23) og/eller (24,48) og/eller (49,71) og/eller (73,75) og/eller (76) og/eller (78) og (88) og/eller (91). De CDR- podede lette kjeder omfatter donorrester i minst en av posisjonene (1) og/eller (3) og (46) og/eller (47) eller i det minste en posisjonene (46,48,58) og (71) De CDR-podede antistoffer er foretrukket humaniserte antistoffer med ikke-human donor, f. eks fra gnagere, og med humane akseptor-strukturer, og de kan anvendes for in vivo terapi og diagnose. En generell anvendbar metode for oppnåelse av CDR- podede antistoffer er beskrevet.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av humaniserte antistoffmolekyler ved anvendelse av rekombinant DNA-teknologi

- 5 Oppfinnelsen vedrører også et DNA-molekyl, klonings- eller ekspresjonsvektor samt vertscelle

Uttrykket "humanisert antistoffmolekyl" anvendes for å beskrive et molekyl med et antigenbindende sete avledet fra
10 et immunoglobulin fra en ikke-human spesies, og hvor de gjenværende immunoglobulin-avledelede deler av molekylet er avledet fra et humant immunoglobulin. Det antigenbindende sete omfatter typisk hypervariable regioner ("complementary determining regions") (CDR'er) som bestemmer bindingsspesifisiteten
15 for antistoffmolekylet og som er båret på passende strukturregioner i de variable domener. Der er tre CDR'er (CDR1, CDR2 og CDR3) i hver av de tung og lett kjede variable domener

I beskrivelsen vises det til en rekke publikasjoner ved hjelp
20 av tallangivelser. Publikasjonene er angitt i numerisk rekkefølge på slutten av beskrivelsen

Naturlige immunoglobuliner har vært kjent i en rekke år, og likeledes de forskjellige fragmenter derav som Fab, (Fab')₂
25 og Fc-fragmentene, som kan utvinnes ved hjelp av enzymatisk spalting. Naturlige immunoglobuliner omfatter et molekyl som generelt er Y-formet og med et antigenbindende sete i nærheten av enden av hver øvre arm. Resten av strukturen, og særlig stammen i det Y-formede molekyl formidler virknings-
30 funksjonene forbundet med immunoglobuliner

Naturlige immunoglobuliner har vært anvendt i forbindelse med analyser, diagnose og, i mere begrenset utstrekning, terapi. Slike anvendelser, særlig i terapi, har imidlertid inntil
35 nylig vært forhindrede pga de naturlige immunoglobuliners polyklonale natur. Et betydelig skritt frem mot bruk av immunoglobuliner som terapeutiske midler var oppdagelsen av prosedyrene for fremstilling av monoklonale antistoff (MAb'er) med definert spesifisitet (1)

De fleste MAb'er er imidlertid dannet ved hjelp av hybridomer som er fusjoneringer av miltceller og myelomaceller fra gnagere. De er derfor i alt vesentlig gnager-proteiner. Der er svært få rapporter vedrørende fremstilling av humane MAb'er

5

Da de fleste tilgjengelige MAb'er er av gnageropprinnelse, er de av naturen antigeniske i mennesker og kan således føre til en uønsket immunrespons betegnet HAMA ("Human Anti-Mouse Antibody") respons. Anvendelse av MAb'er fra gnagere som terapeutiske midler i mennesker er derfor følgelig begrenset ved det faktum at det menneskelige individ vil sette i verk en immunologisk respons mot MAb og vil enten fjerne det fullstendig eller i det minste redusere dets virkningsfullhet. I praksis kan MAb'er av gnageropprinnelse ikke anvendes i pasienter ved mer enn en eller noen få behandlinger, da det snart utvikles en HAMA-respons som gjør MAb ineffektivt så vel som at det oppstår uønskede reaksjoner. OKT3, et IgG2a/k MAb fra mus som gjenkjenner et antigen i T-cellerreseptor-CD3-komplekset har f.eks. vært godkjent for anvendelse i en rekke land i verden som en immuno-undertrykker ved behandling av akutt allograft-forkastelse (Chatenoud et al (2) og Jeffers et al (3)). Sett på bakgrunn av gnager-naturen for dette og andre slike MAb'er, vil imidlertid en signifikant HAMA-respons som kan inkludere en viktig anti-idiotype-komponent, kunne bygges opp ved anvendelse. Det er derfor klart at det er meget ønskelig å nedsette eller avskaffe denne uønskede HAMA-respons og således utvide anvendelsesområdene for disse svært nyttige antistoffer.

30 Det er derfor foreslått at ikke-humane MAb'er gjøres mindre antigeniske i mennesker. Slike teknikker kan generelt betegnes som "humaniserings"-teknikker. Disse teknikker omfatter typisk anvendelse av rekombinant DNA-teknikk for å manipulere DNA-sekvensen som koder for polypeptidkjedene i antistoffmolekylet.

Tidligere metoder for humanisering av MAb'er involverte dannelse av chimeriske antistoffer hvor et antigenbindende sete som omfattet de totale variable domener av ett antistoff

er bundet til konstante domener avledet fra et annet anti-
stoff Metoder for å gjennomføre slike chimeriseringsprose-
dyrer er beskrevet i EP 0120694 (Celltech Limited), EP
0125023 (Genentech Inc og City of Hope), EP-A-0 171496 (Res
5 Dev Corp , Japan), EP-A-0 173494 (Stanford University), og
WO 86/01533 (Celltech Limited) Denne sistnevnte Celltech-
søknaden (WO 86/01533) omhandler en fremgangsmåte for frem-
stilling av et antistoffmolekyl som har de variable domener
fra et mus-MAb og de konstante domener fra et humant immuno-
10 globulin Slike humaniserte chimeriske antistoffer inneholder
imidlertid fremdeles en betydelige andel av ikke-human amino-
syresekvens, dvs de fullstendige ikke-humane variable dome-
ner, og kan således fremdeles utløse noe HAMA-respons, særlig
ved tilførsel over en forlenget tidsperiode (Begent et al
15 (referanse 4))

I en alternativ fremgangsmåte beskrevet i EP-A-0239400
(Winter), har de hypervariable regioner (CDR'er) i et muse-
MAb blitt podet på rammeverkkregionene ("framework regions")
20 av de variable domener i et humant immunoglobulin ved hjelp
av sete-rettet mutagnese ved anvendelse av lange oligonukleo-
tider Den foreliggende oppfinnelse vedrører humaniserte
antistoffmolekyler som er fremstilt i henhold til denne
alternative fremgangsmåte, dvs CDR-podede humaniserte anti-
25 stoffmolekyler Slike CDR-podede humaniserte antistoffer vil
i mye mindre utstrekning føre til en HAMA-respons enn de
humaniserte chimeriske antistoffer på bakgrunn av at de inne-
holder en mye mindre andel av ikke-human aminosyresekvens

30 Det tidligste arbeid i forbindelse med humanisering av MAb'er
ved hjelp av CDR-poding ble gjennomført på MAb'er som gjen-
kjenner syntetiske antigener, slik som NP- eller NIP-anti-
gener Eksempler hvor et muse-MAb som gjenkjenner et lysozym
og et rotte-MAb som gjenkjenner et antigen på humane T-celler
35 ble humanisert ved hjelp av CDR-poding, er imidlertid hen-
holdsvis beskrevet av Verhoeyen et al (5) og Riechmann et al
(6) Fremstillingen av CDR-podet antistoff mot antigenet på
humane T-celler er også beskrevet i WO 89/07452 (Medical
Research Council)

I Riechmann et al/Medical Research Council er det funnet at overføring av CDR-regionene alene (som definert av Kabat, referanse (7) og (8)) ikke var tilstrekkelig til å gi tilfredsstillende antigen-bindingsaktivitet i det CDR-podede produkt. Riechmann et al fant at det var nødvendig å bytte en serinrest i stilling 27 i den humane sekvens med den tilsvarende rotte-fenylalaninrest for å oppnå et CDR-podet produkt med forbedret antigen-bindingsaktivitet. Denne rest i stilling 27 i den tunge kjede er innenfor den strukturelle sløyfe ved siden av CDR1. En ytterligere sammenstilling som i tillegg inneholdt en endring fra humant serin til rottet tyrosin i stilling 30 i den tunge kjede hadde ikke en signifikant endret bindingsaktivitet i forhold til det humaniserte antistoff hvor serin var endret til fenylalanin i stilling 27 alene. Disse resultater indikerer at forandringer av rester i den humane sekvens utenfor CDR-regionene, særlig i den strukturelle sløyfe i nærheten av CDR1, kan være nødvendig for å oppnå effektiv antigen-bindingsaktivitet for CDR-podede antistoffer som gjenkjenner mer komplekse antigener. Likevel var bindingsaffiniteten for de beste CDR-podede antistoffer som ble oppnådd fremdeles betydelig mindre enn det opprinnelige MAb.

Nylig har Queen et al (9) beskrevet fremstillingen av et humanisert antistoff som binder til interleukin-2-reseptoren, ved at CDR'er av et murint MAb (anti-Tac) kombineres med humane immunoglobulinrammeverk- og konstante regioner. De humane rammeverkregioner ble valgt for å gjøre homologien med anti-Tac MAb-sekvensen så stor som mulig. I tillegg ble det anvendt data for å identifisere rammeverk-aminosyrerester som det var sannsynlig ville virke sammen med CDR'ene eller antigenet, og det ble anvendt muse-aminosyrer i disse posisjoner i det humaniserte antistoff.

I WO 90/07861 foreslo Queen et al fire kriterier for utforming av humaniserte immunoglobuliner. Det første kriterium er å anvende, som den humane akseptor, rammeverket ("framework") fra et spesielt humant immunoglobulin som er særlig homologt til det ikke-humane donor-immunoglobulin som skal humanise-

res, eller å anvende en konsensus-struktur fra flere humane antistoffer. Det andre kriterium er å heller anvende donor-aminosyren enn akseptoren dersom den humane akseptorrest er uvanlig og donorresten er typisk for humane sekvenser i en spesifikk rest av strukturen. Det tredje kriterium er å heller anvende donorstruktur-aminosyreresten enn akseptoren i stillinger i umiddelbar nærhet av CDR'ene. Det fjerde kriterium er å anvende donor-aminosyreresten i rammeverk-posisjoner hvor aminosyren er forutsagt til å ha et sidekjedeatom innen omtrent 3 Å av CDR'ene i en tredimensjonal immunoglobulinmodell og til å være i stand til å interagere med antigenet eller med CDR'ene i det humaniserte immunoglobulin. Det er foreslått at kriterium 2, 3 eller 4 kan anvendes i tillegg til eller alternativt til kriterium en, og kan anvendes alene eller i enhver kombinasjon.

WO 90/07861 beskriver detaljert fremstillingen av et enkelt CDR-podet humanisert antistoff, et humanisert antistoff med spesifisitet for p55 Tac-proteinet i IL-2-reseptoren. Kombinasjonen av alle fire kriterier, som nevnt over, ble anvendt for å utforme dette humaniserte antistoff, idet variabel region rammeverkene av det humane antistoff Eu (7) anvendes som akseptor. I det oppnådde humaniserte antistoff var donor-CDR'ene som definert av Kabat et al (7 og 8) og i tillegg ble muse-donorrestene anvendt i stedet for de humane akseptorresten i stillingene 27, 30, 48, 66, 67, 89, 91, 94, 103, 104, 105 og 107 i den tunge kjede og i stillingene 48, 60 og 63 i den lette kjede i variabel region rammeverkene. Det oppnådde humaniserte anti-Tac-antistoff er rapportert til å ha en affinitet for p55 på $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, noe som er omtrent en tredjedel av det som ble oppnådd for murint MAb.

Videre er fremstillingen av CDR-podede humaniserte antistoffmolekyler blitt undersøkt og det er identifisert et stillingshierarki innenfor rammeverket av de variable regioner (dvs utenfor både Kabat CDR'ene og de strukturelle sløyfer i de variable regioner), hvor aminosyre-identitetene av restene er viktige for å oppnå CDR-podede produkter med tilfredsstillende bindingsaffinitet. Dette har gjort det mulig å etablere

et oppsett for å oppnå tilfredsstillende CDR-podete produkter som kan anvendes i utstrakt grad uavhengig av graden av homologt mellom donor-immunoglobulinet og akseptor-rammeverket. Gruppen av rester som er identifisert til å være av kritisk viktighet faller ikke sammen med restene som er identifisert av Queen et al (9)

De foran beskrevne fordeler oppnås med fremgangsmåten, DNA-molekylet, klonings- eller ekspresjonsvektoren samt vertscellen slik de er definert med de i kravene anførte trekk

Følgelig, i et første aspekt av oppfinnelsen tilveiebringes en fremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt CDR-podet antistoffmolekyl omfattende en tung kjede med et variabelt region domene omfattende akseptorstruktur og donor-antigenbindende regioner hvor i strukturen omfatter donorrester i minst en av posisjonene 6, 23 og/eller 24, 48 og/eller 49, 71 og/eller 73, 75 og/eller 76 og/eller 78 og 88 og/eller 91, med den betingelse at det CDR-podete antistoff ikke binder p55 Tac proteinet av IL-2 reseptoren

I foretrukne utførelsesformer omfatter rammeverket av den tunge kjede donorrester i posisjonene 23, 24, 49, 71, 73 og 78 eller i posisjonene 23, 24 og 49. Restene i posisjonene 71, 73 og 78 i rammeverket av den tunge kjede er foretrukket alle enten akseptorrester eller alle donorrester

I særlig foretrukne utførelsesformer omfatter rammeverket av den tunge kjede i tillegg donorrester i en, noen eller i alle posisjonene 6, 37, 48 og 94. Det er også særlig foretrukket at restene i posisjoner i rammeverket av den tunge kjede som vanligvis beholdes på tvers av spesies, dvs posisjonene 2, 4, 25, 36, 39, 47, 93, 103, 104, 106 og 107 ytterligere omfatter donorrester dersom de ikke er beholdt mellom donor og akseptor. Mest foretrukket omfatter rammeverket av den tunge kjede i tillegg donorrester i posisjoner 2, 4, 6, 25, 36, 37, 39, 47, 48, 93 og 94, 103, 104, 106 og 107

I tillegg omfatter rammeverket av den tunge kjede eventuelt donorrester i en, noen eller i alle posisjonene

1 og 3,

72 og 76,

5 69 (dersom 48 er forskjellig mellom donor og akseptor),

38 og 46 (dersom 48 er donorresten),

80 og 20 (dersom 69 er donorresten),

67,

82 og 18 (dersom 67 er donorresten),

10 91,

88, og

hvilken som helst eller flere av 9, 11, 41, 87, 108, 110 og 112

15 I det første og andre aspekter av den foreliggende oppfin-
nelse skal det vises til en fremgangsmåte for fremstilling av
terapeutisk aktive CDR-podede antistoffprodukter som omfatter
akseptor-rammeverk og donorantigenbindende regioner Det skal
forstås at oppfinnelsen i stor utstrekning kan anvendes for
20 CDR-poding av antistoffer generelt Donor- og akseptoranti-
stoffene kan således avledes fra dyr av den samme spesies og
til og med fra samme antistoffgruppe eller undergruppe Det
er imidlertid mer vanlig at donor- og akseptorantistoffene er
avledet fra dyr av forskjellig spesies Donorantistoffet er
25 typisk et ikke-humant antistoff, slik som et gnager-MAb, og
akseptorantistoffet er et humant antistoff

I det første og andre aspekter av den foreliggende oppfin-
nelse, omfatter den donorantigenbindende regionen typisk
30 minst ett CDR fra donorantistoffet Vanligvis omfatter den
donorantigenbende regionen minst to og foretrukket alle tre
CDR'er av hver av de tung kjede og/eller lett kjed variable
regioner CDR'ene kan omfatte Kabat CDR'er, strukturell
sløyfe CDR'er eller en kompositt av Kabat CDR'er og struktu-
35 rell sløyfe CDR'er og enhver kombinasjon av disse Foretruk-
ket omfatter de antigenbindende regionene i det variable
domene av den CDR-podede tunge kjede CDR'er som tilsvarer
Kabat CDR'er ved CDR2 (restene 50 - 65) og CDR3 (restene 95 -

100) og en kompositt av Kabat CDR'er og strukturell sløyfe CDR'er ved CDR1 (restene 26 - 35)

Angivelsene av restene som er gitt over og andre steder i den foreliggende søknad er nummerert i henhold til Kabat-nummereringen (referansene (7) og (8)) Således vil rest-angivelser ikke alltid tilsvare direkte til den lineære nummerering av aminosyrerestene Den virkelige lineære aminosyresekvens kan inneholde færre eller ytterligere aminosyrer enn i den strenge Kabat-nummerering tilsvarende til en forkortning av, eller innføyning inn i, en strukturkomponent, enten rammeverk eller CDR, av den grunnleggende variable domene struktur Den variable region i den tunge kjede i anti-Tac-antistoffet som beskrevet av Queen et al (9) inneholder f.eks. en enkel aminosyre-innføyning (rest 52a) etter rest 52 i CDR2 og en innføyning omfattende tre aminosyrer (rester 82a, 82b og 82c) etter rammeverk-rest 82 i Kabat-nummereringen Den korrekte Kabat-nummerering av rester kan bestemmes for et gitt antistoff ved at regioner med homologt antistoffets sekvens ordnes med en "standard" Kabat-nummerert sekvens

I et andre aspekt tilveiebringer også den foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt CDR-podet antistoffmolekyl omfattende en lett kjede med et variabel region domene omfattende akseptor-rammeverk og donorantigenbindende regioner hvor rammeverket omfatter donorrester i det minste i en av posisjonene 1 og/eller 3 og 46 og/eller 47, med den betingelse at det CDR-podede antistoff ikke binder p55 Tac proteinet av IL-2 reseptoren

Den CDR-podede lette kjede ifølge det andre aspekt av oppfinnelsen omfatter foretrukket donorrester i posisjonene 46 og/eller 47

I et tredje aspekt av den foreliggende oppfinnelse tilveiebringes også en fremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt CDR-podet antistoffmolekyl omfattende en lett kjede med et variabelt region domene omfattende akseptor-rammeverk og donorantigenbindende regioner hvor rammeverket

omfatter donorrester i minst en av posisjonene 46, 48, 58 og 71, med den betingelse at det CDR-podete antistoff ikke binder p55 Tac proteinet av IL-2 reseptoren

- 5 I en foretrukket utførelsesform av det tredje aspekt, omfatter rammeverket donorrester i alle posisjoner 46, 48, 58 og 71

I særlig foretrukne utførelsesformer av det andre og tredje
10 aspekt, omfatter rammeverket ytterligere donorrester i posisjoner 36, 44, 47, 85 og 87 Likeledes, vil posisjoner i lett kjede rammeverket som vanligvis beholdes på tvers av spesies, dvs posisjoner 2, 4, 6, 35, 49, 62, 64 - 69, 98, 99, 101 og 102 i tillegg omfatte donorrester dersom de ikke er beholdt
15 mellom donor og akseptor Mest foretrukket omfatter lett kjede rammeverket i tillegg donorrester i posisjoner 2, 4, 6, 35, 36, 38, 44, 47, 49, 62, 64 - 69, 85, 87, 98, 99, 101 og 102

- 20 Dessuten, inneholder rammeverket i det andre eller tredje aspekt eventuelt donorrester i en, noen eller alle av posisjonene
1 og 3,
63,
25 60 (dersom 60 og 54 er i stand til å danne en potensiell saltbro),
70 (dersom 70 og 24 er i stand til å danne potensiell saltbro),
73 og 21 (dersom 47 er forskjellig mellom donor og akseptor),
30 37 og 45 (dersom 47 er forskjellig mellom donor og akseptor),
og
hvilken som helst eller flere av 10, 12, 40, 80, 103 og 105

Foretrukket omfatter de antigenbindende regionene i det CDR-
35 podete lett kjede variable domene CDR'er tilsvarende til Kabat CDR'er i CDR1 (rest 24 - 34), CDR2 (rest 50 - 56) og CDR3 (rest 89 - 97)

I et fjerde aspekt tilveiebringer oppfinnelsen ytterligere en fremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt CDR-podet antistoffmolekyl som omfatter minst en CDR-podet tung kjede og minst en CDR-podet lett kjede i henhold til det første og andre eller første og tredje aspekt av den foreliggende oppfinnelse, med den betingelse at det CDR-podede antistoff ikke binder p53 Tac proteinet av IL-2 reseptoren

De humaniserte antistoffmolekyler og kjeder fremstilt i henhold til oppfinnelsen kan omfatte et fullstendig antistoffmolekyl, med tunge og lette kjeder i full lengde, et fragment derav som et Fab, (Fab')₂ eller FV-fragment, en lett kjede eller tung kjede monomer eller dimer, eller et enkeltkjedet antistoff, f.eks. enkeltkjedet FV hvor tung og lett kjede variable regioner er bundet sammen ved hjelp av en peptidbinding, eller et hvilket som helst annet CDR-podet molekyl med den samme spesifisitet som det opprinnelige donorantistoff. Likeledes kan den CDR-podede tung og lett kjede variable region passende kombineres med andre antistoff-domener. De tunge eller de lette kjeder eller de humaniserte antistoffmolekyler fremstilt i henhold til oppfinnelsen kan også ha et effektor- eller reporter-molekyl festet dertil. Det kan f.eks. ha en makrosyklus for chelatering av et tungt metallatom, eller et toksin, som ricin, festet dertil ved hjelp av en kovalent brobindingsstruktur. Alternativt kan prosedyrene for rekombinant DNA-teknologi anvendes for å fremstille et immunoglobulinmolekyl hvor Fc-fragmentet eller CH3-domenet i et fullstendig immunoglobulinmolekyl er blitt erstattet med, eller har festet dertil ved hjelp av peptidbinding, et funksjonelt ikke-immunoglobulinprotein som et enzym eller et toksinmolekyl

Hvilke som helst passende akseptor variabel region rammeverksekvenser kan anvendes under hensyntagen til klasse/type av donorantistoffet hvorfra de antigenbende regionene er avledet. Typen akseptorrammeverk som anvendes er foretrukket av samme/lignende klasse/type som donorantistoffer. Følgelig kan rammeverket velges for å maksimere/optimalisere homologi med donorantistoffsekvensen, særlig i posisjoner nær eller i

nabostilling til CDR'ene En høy grad av homologi mellom donor-og akseptorsekvenser er imidlertid ikke viktig for anvendelsen av den foreliggende oppfinnelse Ved den foreliggende oppfinnelse identifiseres et system av rammeverk-
 5 restposisjoner hvor donorrester kan være viktige eller ønskelige for å oppnå et CDR-podet antistoffprodukt med tilfredsstillende bindingsegenskaper De CDR-podede produkter har vanligvis bindingsaffiniteter på minst $10^5 M^{-1}$, foretrukket minst omtrent $10^8 M^{-1}$, eller særlig i området $10^8 - 10^{12} M^{-1}$
 10 Prinsippielt kan den foreliggende oppfinnelse anvendes for enhver kombinasjon av donor- og akseptorantistoffer uten hensyn til graden av homologi mellom deres sekvenser Et oppsett for anvendelse av den foreliggende oppfinnelse på et hvilket som helst spesielt donor-akseptor antistoffpar er
 15 gitt i det etterfølgende Eksempler på humane rammeverk som kan anvendes er KOL, NEWM, REI, EU, LAY og POM (referanse 4 og 5) og lignende, f eks KOL og NEWM for den tunge kjede og REI for den lette kjede og EU, LAY og POM for både den tunge kjede og den lette kjede

20 Også konstant region domeneene i produktene fremstilt i henhold til oppfinnelsen kan velges under hensyntagen til antistoffets foreslåtte funksjon og særlig de effektorfunksjoner som kreves Konstant region domeneene kan f eks være human
 25 IgA-, IgE-, IgG- eller IgM-domener Spesielt kan humane IgG konstant region domener anvendes, særlig av isotypene IgG1 og IgG3, når det humaniserte antistoffmolekyl er bestemt til terapeutiske anvendelser, og antistoff-effektorfunksjoner kreves Alternativt kan IgG2- og IgG4-isotyper anvendes når
 30 det humaniserte antistoffmolekyl er beregnet for terapeutiske formål og når antistoff-effektorfunksjonen ikke er nødvendig, f eks for enkel blokkering av lymfokinaktivitet

Resten av antistoffmolekylene behøver imidlertid ikke omfatte
 35 bare proteinsekvenser fra immunoglobuliner Et gen kan f eks konstrueres hvor i en DNA-sekvens som koder for en del av en human immunoglobulinkjede fusjoneres til en DNA-sekvens som koder for aminosyresekvensen av et funksjonelt polypeptid slik som et effektor- eller reportertermolekyl

Ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et terapeutisk aktivt CDR-podet antistoffmolekyl benyttes en rekombinant genteknologisk fremgangsmåte

5 Ytterligere aspekter av den foreliggende oppfinnelse inkluderer således også DNA-sekvenser som koder for de CDR-podede tunge og lette kjeder, klonings- og ekspresjonsvektorer som inneholder DNA-sekvensene samt vertsceller som er transformert med DNA-sekvensene og som er i stand til ekspresjon av
10 DNA-sekvensene

De generelle metoder for konstruksjon av vektorene, transfeksjonsmetoder og dyrkningsmetoder er i seg selv velkjente. Slike metoder er f.eks. vist i referansene 10 og 11

15

DNA-sekvensene som koder for donoraminosyresekvensen kan oppnås ved hjelp av metoder som er velkjente innen teknikkens stand. De donor-kodende sekvenser kan f.eks. oppnås ved genomisk kloning, eller cDNA-kloning fra passende hybridom-
20 cellelinjer. Positive kloner kan screenes ved anvendelse av passende prober for de aktuelle gener for den tunge og lette kjede. Også PCR-kloning kan anvendes

DNA som koder for akseptor, f.eks. human akseptor, sekvenser
25 kan oppnås på en hvilken som helst passende måte. DNA-sekvenser som koder for foretrukne humane akseptor-rammeverk som KOL, REI, EU og NEWM, er f.eks. lett tilgjengelige for de som arbeider innen dette området

30 Standardteknikker innen molekylær biologi kan anvendes for fremstilling av DNA-sekvenser som koder for de CDR-podede produkter. Ønskede DNA-sekvenser kan syntetiseres helt eller delvis ved anvendelse av oligonukleotidsynteseteknikker. Sete-rettet mutagenese og polymerasekjedereaksjon (PCR)-teknikker kan passende anvendes. Oligonukleotid-rettet syntese
35 som beskrevet av Jones et al. (referanse 20) kan f.eks. anvendes. Også oligonukleotid-rettet mutagenese av en variabel region som på forhånd er fjernet, som f.eks. beskrevet av Verhoeyen et al. (referanse 5) eller Riechmann et al. (reffe-

ranse 6) kan anvendes. Også enzymatisk tilføyning i avbrutte oligonukleotider ved anvendelse av T_4 DNA-polymerase som f eks beskrevet av Queen et al (referanse 9) kan anvendes

5 Ethvert passende vertscelle/vektorsystem kan anvendes for ekspresjon av DNA-sekvensene som koder for de CDR-podede tunge og lette kjeder. Bakterielle f eks E coli og andre mikrobielle systemer kan anvendes, særlig for ekspresjon av antistoff-fragmenter som FAb og (Fab')₂-fragmenter, og særlig
10 FV-fragmenter og antistoff-fragmenter med en enkelt kjede, f eks FV'er med enkelt kjede. Eukaryotiske f eks ekspresjons-systemer fra pattedyr-vertsceller kan anvendes for fremstilling av større CDR-podede antistoffprodukter, inkluderende fullstendige antistoffmolekyler. Passende pattedyr-verts-
15 celler inkluderer CHO-celler og myelom- eller hybridomcellerlinjer.

I et ytterligere aspekt tilveiebringer således den foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for fremstilling av et
20 CDR-podet antistoffprodukt omfattende

- (a) fremstilling, i en ekspresjonsvektor, av et operon med DNA-sekvens som koder for en tung kjede av et antistoff i henhold til det første aspekt av oppfinnelsen, og/eller
- 25 (b) fremstilling, i en ekspresjonsvektor, av et operon med en DNA-sekvens som koder for en komplementær lett kjede av et antistoff i henhold til det andre eller tredje aspekt av oppfinnelsen,
- (c) transfeksjon av en vertscelle med den eller hver vektor, og
30
- (d) dyrking av den transfekterte cellelinje for fremstilling av det CDR-podede antistoffprodukt

Det CDR-podede produkt kan omfatte polypeptid avledet fra kun
35 den tunge eller den lette kjede, hvor kun en tung eller lett kjede polypeptid-kodende sekvens anvendes for å transfektere vertscellene.

For fremstilling av produkter som omfatter både tunge og lette kjeder, kan cellelinjen transfekteres med to vektorer, idet den første vektor kan inneholde et operon som koder for et peptid avledet fra en lett kjede og den andre vektor kan inneholde et operon som koder for et polypeptid avledet fra en tung kjede. Vektorene er foretrukket identiske, unntatt når det gjelder kodesekvenser og selekterbare markører, for å sikre, så langt som mulig, at hver polypeptidkjede uttrykkes likt. Alternativt kan en enkel vektor anvendes, idet vektoren inkluderer sekvensene som koder for polypeptider som er avledet fra både den lette og den tunge kjede.

DNA i de sekvenser som koder for de lette og tunge kjeder kan omfatte cDNA eller genomisk DNA eller begge. Det er imidlertid foretrukket at DNA-sekvensen som koder for den tunge eller lette kjede omfatter i det minste delvis genomisk DNA, foretrukket fusjonert cDNA og genomisk DNA.

Den foreliggende oppfinnelse kan anvendes for antistoffer med en hvilken som helst passende spesifisitet. Oppfinnelsen kan imidlertid fordelaktig anvendes for å humanisere ikke-humane antistoffer som anvendes for in vivo terapi. Antistoffene kan således være steds-spesifikke antistoffer slik som tumor-spesifikke eller celleoverflate-spesifikke antistoffer som passende kan anvendes i in vivo terapi. Eksempler på celleoverflate-spesifikke antistoffer er anti-T-celle antistoffer, som anti-CD3, og CD4 og adhesjonsmolekyler som CR3, ICAM og ELAM. Antistoffene kan ha spesifisitet for interleukiner (inkluderende lymfokiner, vekstfaktorer og stimulerende faktorer), hormoner og andre biologisk aktive forbindelser, og reseptorer for hvilken som helst av disse. Antistoffene kan f. eks. ha spesifisitet for hvilken som helst av de følgende interferoner α , β , γ eller δ , IL1, IL2, IL3 eller IL4 osv, TNF, GCSE, GMCSF, EPO, hGH eller insulin osv.

35

Terapeutiske preparater som omfatter de CDR-podede produkter fremstilt i henhold til oppfinnelsen for anvendelse innen terapi kan også oppnås.

Det kan således tilveiebringes et terapeutisk preparat som omfatter et antistoff eller molekyl med CDR-podet tung eller lett kjede i henhold til tidligere aspekter av den foreliggende oppfinnelse sammen med en farmasøytisk tålbart bærer, 5 fortynningsmiddel eller hjelpestoff

For terapi tilføres av en effektiv mengde av et antistoff eller molekyl med CDR-podet tung eller lett kjede i henhold til de tidligere aspekter av oppfinnelsen, til et menneske 10 eller et dyr

En foretrukket protokoll for oppnåelse av antistoff med CDR-podete tunge og lette kjeder fremstilt i overensstemmelse med den foreliggende oppfinnelse er angitt i det etterfølgende 15 sammen med den logiske begrunnelse som denne protokoll er utledet fra

Protokoll

Det er først og fremst nødvendig å sekvensere det DNA som 20 koder for de variable regioner i den tunge og lette kjede i donorantistoffet, for å bestemme deres aminosyresekvenser. Det er også nødvendig å velge passende akseptor variable regioner i den tunge og lette kjede, med kjent aminosyresekvens. Den CDR-podete kjede utformes deretter med utgangspunkt i basisen av akseptorsekvensen. Det skal forstås at 25 donor- og akseptor-aminosyrerestene i noen tilfeller kan være identiske i en spesiell posisjon og det kreves således ingen forandringer av akseptor-rammeverkresten.

30 1 I et første trinn ble akseptorrester erstattet med donorrester i CDR'ene. For dette formål er CDR'ene foretrukket definert som følger

| | | | | | | | |
|----|------------|---|------|--------|--------|----|-------|
| 35 | Tung kjede | - | CDR1 | rester | 26 | - | 35 |
| | | | - | CDR2 | rester | 50 | - 65 |
| | | | - | CDR3 | rester | 95 | - 102 |
| | Lett kjede | - | CDR1 | rester | 24 | - | 34 |
| | | | - | CDR2 | rester | 50 | - 56 |
| | | | - | CDR3 | rester | 89 | - 97 |

De posisjoner hvori akseptor skal erstattes med donorrester i rammeverket velges deretter som følger, først og fremst med hensyn til den tunge kjede og deretter med hensyn til den lette kjede

5

2 Tung kjede

2 1 Velg donorrester i alle posisjoner 23, 24, 49, 71, 73 og 78 i den tunge kjede og i alle posisjoner 23, 24 og 49 (71, 73 og 78 er alltid enten alle donor eller alle akseptor)

10

2 2 Undersøk at de følgende har den samme aminosyre i donor- og akseptorsekvenser, og dersom ikke velg foretrukket donoren 2, 4, 6, 25, 36, 37, 39, 47, 48, 93, 94, 103, 104, 106 og 107

15

2 3 For å optimalisere affiniteten ytterligere, overvei valg av donorrester i en, noen eller hvilke som helst av

1 1, 3

11 72, 76

111 Dersom 48 er forskjellig mellom donor- og akseptorsekvenser, overvei 69

20

1v Dersom donorresten velges i 48, overvei 38 og 46

v Dersom donorresten velges i 69, overvei 80 og deretter 20

v1 67

25

v11 Dersom donorresten velges i 67, overvei 82 og deretter 18

v111 91

1x 88

x 9, 11, 41, 87, 108, 110, 112

30

3 Lett kjede

3 1 Velg donor i 46, 48, 58 og 71

3 2 Undersøk at de følgende har den samme aminosyre i donor- og akseptorsekvenser, og dersom dette ikke er tilfelle velg foretrukket donor

35

2, 4, 6, 35, 38, 44, 47, 49, 62, 64 - 69, 85, 87, 98, 99, 101 og 102

3 3 For å optimalisere affiniteten ytterligere, overvei valg av donorrester i en, noen eller hvilken som helst av

| | | |
|----|-----|--|
| | 1 | 1,3 |
| | 11 | 63 |
| | 111 | 60, dersom 60 og 54 er i stand til å danne en potensiell saltbro |
| 5 | 1V | 70, dersom 70 og 24 er i stand til å danne en potensiell saltbro |
| | V | 73, og 21 dersom 47 er forskjellig mellom donor og akseptor |
| | V1 | 37, og 45 dersom 47 er forskjellig mellom donor og akseptor |
| 10 | V11 | 10, 12, 40, 80, 103, 105 |

Praksis

For å overføre bindingsstedet i et antistoff inn i en forskjellig akseptorrammeverk, må en rekke faktorer tas i betraktning

1 Omfanget av CDR'ene

CDR'ene ("Complementary Determining Regions") ble definert av Wu og Kabat (referansene 4 og 5) på grunnlag av en analyse som vedrører varierbarheten av forskjellige regioner i antistoff-variable regioner. Tre regioner pr domene ble anerkjent. I den lette kjede er sekvensen 24 til og med 34, 50 til og med 56, og 89 til og med 97 (nummerering i henhold til Kabat (referanse 4), Eu Index) og i den tunge kjede er sekvensene 31 til og med 35, 50 til og med 65 og 95 til og med 102.

Når antistoffstrukturene ble tilgjengelige var det tydelig at disse CDR-regioner hovedsakelig tilsvarende sløyferegioner som strekker seg fra β -"barrel" (lukket β -plate)-rammeverket i de lette og tunge variable domener. For H1 var det en uoverensstemmelse ved at sløyfen var fra 26 til og med 32 og for H2 var sløyfen fra 52 til 56 og for L2 fra 50 til 53. Med unntak av H1, omfattet imidlertid CDR-regionene sløyferegionene og strakk seg inn i β -"barrel"-rammeverket. I H1, har rest 26 en tendens til å være serin og 27 fenylalanin eller tyrosin, rest 29 er fenylalanin i de fleste tilfeller. Restene 28 og 30 som er overflaterester som utsettes for

løsningsmiddel kan være involvert i antigenbinding. En forsiktig definisjon av H1-CDR vil derfor kunne inkludere rester 26 til 35, som derfor inkluderer både sløyferegioner og de hypervariable rester 33 til 35

5

Det er interessant å merke seg eksempelet etter Riechmann et al (referanse 3), som valgte resten 31 - 35 for CDR-H1. For å danne effektiv antigenbinding, må også rest 27 være rekrutert fra donor (rotte) antistoffet

10

2 Ikke-CDR-rester som bidrar til antigenbinding

Ved undersøkelse av tilgjengelige røntgenstråle-strukturer er det blitt identifisert en rekke rester som kan ha en virkning på netto antigenbinding og som kan vises ved forsøk. Disse rester kan oppdeles i en rekke grupper

15

2 1 Overflaterester nær CDR (all nummerering som i Kabat et al (referanse 7))

2 1 1 Tung kjede - Nøkkelerester er 23, 71 og 73. Andre rester som kan bidra i mindre utstrekning er 1, 3 og 76. Endelig er 25 vanligvis bevart, men murinresten bør anvendes dersom det er en forskjell

20

2 1 2 Lett kjede - Mange rester nær CDR'ene, f. eks er 63, 65, 67 og 69 bevart. Dersom de er bevart, har sannsynligvis ingen av disse overflaterester i den lette kjede en viktig effekt. Dersom murinresten i disse posisjoner imidlertid er uvanlig, vil det være fordelaktig å analysere det sannsynlige bidrag nærmere. Andre rester som også kan bidra til binding er 1 og 3, og også 60 og 70 dersom restene i disse posisjoner og i henholdsvis 54 og 24 eventuelt er i stand til å danne en saltbro dvs $60 + 54, 70 + 24$

25

30

2 2 Sammenfoldingsrester nær CDR'ene

2 2 1 Tung kjede - Nøkkelerester er 24, 49 og 78. Andre nøkkelerester ville være 36 dersom ikke et tryptofan, 94 dersom ikke et arginin, 104 og 106 dersom ikke glyciner og 107 dersom ikke threonin. Rester som kan gi ytterligere bidrag til stabil sammenfolding av den tunge kjede og således forbedret affinitet er 2, 4, 6, 38, 46, 67 og 69. 67 sammenfolder mot CDR-resten 63 og

35

- dette par vil begge enten være fra mus eller begge fra menneske Rester som bidrar til sammenfolding i denne region men fra en større avstand er til slutt 18, 20, 80, 82 og 86 82 sammenfolder mot 67 og 18 sammen-
 5 folder igjen mot 82 80 sammenfolder mot 69 og 20 sammenfolder igjen mot 80 86 danner et H-bindingsnettverk med 38 og 46 Mange av forskjellene mellom mus og menneske er av mindre betydning, f eks Leu-Ile, men vil kunne ha en mindre virkning på korrekt
 10 sammenfolding som vil kunne overføres til endret plassering av CDR'ene
- 2 2 2 Lett kjede - Nøkkelrester er 48, 58 og 71 Andre nøkkelrester vil kunne være 6 dersom ikke glutamin, 35 dersom ikke tryptofan, 62 dersom ikke fenylalanin
 15 eller tyrosin, 64, 66, 68, 99 og 101 dersom ikke glyciner og 102 dersom ikke threonin Rester som ytterligere bidrar er 2, 4, 37, 45 og 47 Endelig kan rester 73 og 21 og 19 i mindre utstrekning bidra til sammenfolding over større avstand
- 20 2 3 Rester i det variable domenes grenseflate mellom tunge og lette kjeder - I både den tunge og den lette kjede er de fleste ikke-CDR-grenseflaterester bevart Dersom en bevart rest erstattes av en rest med forskjellig karakter, f eks størrelse eller ladning, bør det anses for
 25 retensjon som murinresten
- 2 3 1 Tung kjede - Rester som man behøver å vurdere er 37 dersom resten ikke er valin, men har et større sidekjedevolum eller har en ladning eller polaritet Andre rester er 39 dersom ikke et glutamin, 45 dersom ikke
 30 et leucin, 47 dersom ikke et tryptofan, 91 dersom ikke et fenylalanin eller tyrosin, 93 dersom ikke et alanin og 103 dersom ikke et tryptofan Rest 89 er også i grenseflaten, men er ikke i en posisjon hvor sidekjeden vil kunne ha stor innvirkning
- 35 2 3 2 Lett kjede - Rester som man behøver å vurdere er 36, dersom ikke et tyrosin, 38 dersom ikke et glutamin, 44 dersom ikke et prolin, 46, 49 dersom ikke et tyrosin, rest 85, rest 87 dersom ikke et tyrosin og 98 dersom ikke et fenylalanin

- 2 4 Variabel-konstant region grenseflate - Vinkelen mellom
variable og konstante regioner kan påvirkes ved foran-
dringer i sammenfolding av nøkkelrester i den variable
region mot den konstante region som kan påvirke posi-
5 sjonen av V_L og V_H med hensyn til hverandre. Man skal
derfor legge merke til restene som passende kan være i
kontakt med den konstante region. I den tunge kjede er
overflaterestene som eventuelt er i kontakt med den
variable region beholdt mellom antistoffer fra mus og
10 menneske og derfor kan kontaktrestene i den variable
region innvirke på V-C-interaksjonen. I den lette kjede
varierer aminosyrene som er funnet i en rekke av kon-
taktpunktene i den konstante region, og V- og C-regi-
onene er ikke i en slik nær tilknytning som i den tunge
15 kjede. Derfor vil innvirkningene av V-C-grenseflatene i
den lette kjede være av mindre betydning.
- 2 4 1 Tung kjede - Kontaktrester er 7, 11, 41, 87, 108, 110,
112
- 2 4 2 Lett kjede - I den lette kjede er eventuelle
20 kontaktrester 10, 12, 40, 80, 83, 103 og 105

De overnevnte analyser sammen med søkerens betydelige prak-
tiske eksperimentelle erfaring i CDR-poding av en rekke for-
skjellige antistoffer har ført til det overnevnte oppsett

25

Den foreliggende oppfinnelse skal nå eksempelvis beskrives
med henvisning til de vedlagte figurer 1 - 13

Kort beskrivelse av figurene

- 30 Fig 1 viser DNA og aminosyresekvenser av den OKT3 lette
kjede,
- Fig 2 viser DNA og aminosyresekvenser av den OKT3 tunge
kjede,
- Fig 3 viser oppstillingen av OKT3 aminosyresekvensen av
35 den lette variable region sammen med den for den
lette variable region av det humane antistoff REI,
- Fig 4 viser oppstillingen av OKT3 aminosyresekvensen av
den tunge variable region sammen med den for den
tunge variable region av det humane antistoff KOL,

- Fig 5 viser aminosyresekvensene av den tunge variable region av OKT3, KOL og forskjellige tilsvarende CDR-podinger,
- Fig 6 viser aminosyresekvensen av den lette variable region av OKT3, REI og forskjellige tilsvarende CDR-podinger,
- Fig 7 viser en grafisk fremstilling av bindingsforsøksresultater for forskjellige podede OKT3-antistoffer,
- Fig 8 viser en grafisk fremstilling av blokkeringsforsøksresultater for forskjellige podede OKT3-antistoffer,
- Fig 9 viser en lignende grafisk fremstilling av blokkeringsforsøksresultater,
- Fig 10 viser lignende grafiske fremstillinger for både bindingsforsøks- og blokkeringsforsøksresultater,
- Fig 11 viser ytterligere lignende grafiske fremstillinger for både bindingsforsøks- og blokkeringsforsøksresultater,
- Fig 12 viser en grafisk fremstilling av konkurranseforsøksresultater for et minimalt podet OKT3-antistoff sammenlignet med OKT3 murin referansestandard, og
- Fig 13 viser en lignende grafisk fremstilling av konkurranseforsøksresultater som sammenligner et fullstendig podet OKT3-antistoff med den murine referansestandard

25

Detaljert beskrivelse av utførelsesformer av oppfinnelsen

EKSEMPEL 1

30 CDR-poding av OKT3

Material og metoder

1 Utgangsceller

Hybridomceller som danner antistoff OKT3 ble tilveiebragt fra Ortho (seedlot 4882 1) og blir dyrket i et Dulbecco's Modified Eagles Medium uten antibiotika (DMEM) som var til-satt glutamin og 5 % føtalt kalveserum, og som ble skilt til å gi en overliggende supernatant for evaluering og celler for ekstraksjon av RNA. Den overliggende supernatant inneholdt 250 µg/ml murint IgG2a/kappa antistoff. Supernatanten inne-

holdt ikke murin lambda lett kjede og IgG1, IgG2b, IgG3, IgA og IgM tung kjede 20 ml supernatant ble undersøkt for å bekrefte at det tilstedeværende antistoff var OKT3

5 2 Molekylær biologiprocedyrer

De grunnleggende prosedyrer for molekylær biologi var som beskrevet i Maniatis et al (referanse 9) med noen mindre modifikasjoner i enkelte tilfeller DNA-sekvensering ble gjennomført som beskrevet i Sanger et al (referanse 11) og i Amersham International Plc sekvenseringshåndboken Seterettet mutagenese var som beskrevet i Kramer et al (referanse 12) og i Anglian Biotechnology Ltd håndboken COS-celleekpresjon og metabolsk merking var som beskrevet i Whittle et al (referanse 13)

15

3 Undersøkelsesforsøk

3 1 Samleforsøk

Samleforsøk ble gjennomført på supernatanter fra transfiserte COS-celler for å bestemme mengden tilstedeværende intakt IgG

20

3 1 1 COS-celler transfektert med OKT3-gener fra mus

Forsøket som ble gjennomført for intakt muse-IgG i COS-celle supernatanter var ELISA med følgende format mikrotiterplater med 96 brønner ble belagt med F(ab')₂-geit anti-mus IgG Fc Platene ble vasket i vann og prøver ble tilsatt i løpet av en time ved romtemperatur Platene ble vasket og F(ab')₂-geit anti-mus IgG F(ab')₂ (HRPO-konjugert) ble deretter tilsatt Substrat ble tilsatt for å vise reaksjonen UPC10, et IgG2a-myeloma fra mus ble anvendt som en standard

25

30

3 1 2 COS- og CHO-celler transfektert med chimeriske eller CDR-podete OKT3-gener

Bestemmelsen som ble anvendt i forbindelse med chimerisk eller CDR-podet antistoff i COS-celle supernatanter var ELISA med følgende format mikrotiterplater med 96 brønner ble belagt med F(ab')₂-geit anti-humant IgG Fc Platene ble deretter

35

vasket og prøver ble tilsatt og inkubert i en time ved romtemperatur. Platene ble vasket og monoklonal anti-human kappa-kjede fra mus ble tilsatt i løpet av en time ved romtemperatur. Platene ble vasket og F(ab')₂-geit anti-mus IgG Fc (HRPO-konjugert) ble tilsatt. Enzymsubstratet ble tilsatt for å vise reaksjonen. Chimerisk B72.3 (IgG4) (referanse 13) ble anvendt som standard. Anvendelse av en monoklonal anti-kappa-kjede i dette forsøk tillater at podede antistoffer kan avleses ut fra den chimeriske standard.

3.2 Bestemmelse av antigen-bindingsaktivitet

Material fra COS-cellesupernatanter ble analysert for OKT3-antigenbindende aktivitet på CD3 positive celler i en direkte analyse. Prosedyren var som følger. HUT 78-celler (human T-cellelinje, CD3-positiv) ble holdt i cellekultur. Monolag av HUT 78-celler ble fremstilt på ELISA-plater med 96 brønner ved anvendelse av poly-L-lysin og glutaraldehyd. Prøver ble tilsatt til monolagene i løpet av en time ved romtemperatur.

Platene ble vasket forsiktig ved anvendelse av PBS. F(ab')₂-geit anti-humant IgG Fc (HRPO-konjugert) eller F(ab')₂-geit anti-mus IgG Fc (HRPO-konjugert) ble tilsatt som passende for humaniserte eller museprøver. Substrat ble tilsatt for å vise reaksjon. Den negative kontroll for den cellebaserte bestemmelse var chimerisk B72.3. Den positive kontroll var Orthomune OKT3 av mus eller chimerisk OKT3 når det var tilgjengelig. Dette cellebaserte forsøk var vanskelig å gjennomføre, og en alternativ analyse ble utviklet for CDR-podet OKT3 som var mer sensitiv og lettere å gjennomføre.

I dette system ble CDR-podet OKT3 dannet ved hjelp av COS-celler testet for dets evne til å binde til den CD3-positiv HPB-ALL ("human peripheral blood acute lymphocytic leukemia") cellelinje. Det ble også testet for dets evne til å blokkere binding av murint OKT3 til disse celler. Bindingen ble målt ved hjelp av følgende prosedyre. HPB-ALL-celler ble høstet fra vevskultur.

Cellene ble inkubert ved 4°C i en time med forskjellige fortynninger av test-antistoff, positiv kontroll-antistoff eller negativ kontroll-antistoff. Cellene ble vasket en gang og inkubert ved 4°C i en time med FITC-merket geit anti-humant IgG (Fc-spesifikk, museabsorbert). Cellene ble vasket to ganger og analysert ved hjelp av cytofluorografi. Chimerisk OKT3 ble anvendt som en positiv kontroll for direkte binding. Celler inkubert med mock-transfektet COS-celle supernatant, etterfulgt av FITC-merket geit anti-humant IgG, var den negative kontroll. For å teste den evnen som CDR-podet OKT3 har til å blokkere murin OKT3-binding, ble HPB-ALL-cellene inkubert ved 4°C i en time med forskjellige fortynninger av et antistoff eller kontrollantistoff. En fast mettede mengde FITC OKT3 ble tilsatt. Prøvene ble inkubert i en time ved 4°C, vasket to ganger og analysert ved hjelp cytofluorografi. FITC-merket OKT3 ble anvendt som en positiv kontroll for å bestemme maksimal binding. Umerket murin OKT3 tjente som en referansestandard for blokkering. Negative kontroller var ikke-merkede celler med eller uten mock-transfektet celle supernatant. Den evnen som CDR-podet OKT3 lett kjede har til å binde CD3-positiv celler og blokkere bindingen av murin OKT3 ble først testet sammen med den chimeriske OKT3 tunge kjede. Den chimeriske OKT3 tunge kjede består av den murine OKT3 variable region og den humane IgG4 konstante region. Gener for den chimeriske tunge kjede uttrykkes i den samme ekspresjonsvektor som anvendes for de CDR-podete gener. Ekspresjonsvektoren for CDR-podet lett kjede og ekspresjonsvektoren for den chimeriske tunge kjede ble ko-transfektet inn i COS-celler. Hele det chimeriske OKT3-antistoff (chimerisk lett kjede og chimerisk tung kjede) ble funnet å være i stand til å binde til CD3 positive celler og blokkere bindingen av murint OKT3 til disse celler.

3 3 Bestemmelse av relativ bindingsaffinitet

De relative bindingsaffiniteter av CDR-podete anti-CD3 monoklonale antistoffer ble bestemt ved konkurrerende binding (referanse 6) ved anvendelse av den HPB-ALL

humane T-cellelinje som en kilde for CD3-antigen, og fluorescein-konjugert murint OKT3 (F1-OKT3) med en kjent bindingsaffinitet som et markør-antistoff. Bindingsaffiniteten av F1-OKT3-markør antistoffet ble bestemt ved hjelp av en direkte bindingsbestemmelse hvor en økende mengde F1-OKT3 ble inkubert med HPB-ALL (5×10^5) i PBS med 5 % føtalt kalveserum i 60 minutter ved 4°C . Cellene ble vasket og den fluorescerende intensitet ble bestemt på et FACScan flowcytometer som var kalibrert med kvantitative mikrokule-standarder (Flow Cytometry Standards, Research Triangle Park, NC). Fluorescerende intensitet per antistoffmolekyl (F/P-forhold) ble bestemt ved anvendelse av mikrokuler som har et forhåndsbestemt antall mus IgG-antistoff-bindingssteder (Simply Cellular beads, Flow Cytometry Standards). F/P er lik den fluorescerende intensitet av kuler mettet med F1-OKT3 dividert med antall bindingssteder pr kule. Mengden av bundet og fritt F1-OKT3 ble beregnet fra den gjennomsnittlige fluorescerende intensitet pr celle, og forholdet bundet/fritt ble plottet mot antall mol bundet antistoff. En lineær tilpasning ble anvendt for å bestemme bindingsaffiniteten (absolutt verdi av helningen ("slope")). For konkurrerende binding, ble økende mengder konkurrerende antistoff tilsatt til en sub-mettende dose av F1-OKT3 og inkubert med 5×10^5 HPB-ALL i 200 ml PBS med 5 % føtalt kalveserum i 60 minutter ved 4°C . De fluorescerende intensiteter av cellene ble målt på et FACScan flowcytometer som er kalibrert med kvantitative mikrokule-standarder. Konsentrasjonene av bundet og fritt F1-OKT3 ble beregnet. Affinitetene av konkurrerende antistoffer ble beregnet fra ligningen

$$[X] - [\text{OKT3}] = (1/K_x) - (1/K_a),$$

hvor K_a er affiniteten av murint OKT3, K_x er affiniteten av det konkurrerende X, [] er konsentrasjonen av konkurrerende antistoff hvor bundet/fri binding er $R/2$, og R er maksimal bundet/fri binding.

4 Oppbygning av cDNA-bibliotek

4.1 Fremstilling av mRNA og syntese av cDNA

OKT3-produserende celler ble dyrket som beskrevet over og $1,2 \times 10^9$ -celler ble høstet og mRNA ble ekstrahert ved anvendelse av guanidin/LiCl ekstraksjonsprosedyren cDNA ble fremstilt ved priming fra Oligo-dT til å danne
5 cDNA med full lengde cDNA ble metylert og EcoRI-linkere ble tilsatt for kloning

4 2 Oppbygning av bibliotek

cDNA-biblioteket ble ligert til pSP65-vektor DNA som var kuttet med EcoRI og 5'-fosfatgruppene ble fjernet ved
10 kalvetarm-fosfatase (EcoRI/CIP) Ligeringen ble anvendt for å transformere Eschericia coli (E coli) HB101 med høy transformasjonseffektivitet Et cDNA-bibliotek ble fremstilt 3 600 kolonier ble screenet for den lette kjede og 10 000 kolonier ble screenet for den tunge
15 kjede

5 Screening

E coli-kolonier som var positive med hensyn til prober for enten tung eller lett kjede ble identifisert ved oligo-nukleotid-screening med anvendelse av oligonukleotidene
20 5'-TCCAGATGTAACTGCTCAC for den lette kjede som er komplementær til en sekvens i den konstante kappa-region i mus, og 5'-CAGGGGCCAGTGGATGGATAGAC for den tunge kjede som er komplementær til en sekvens i den IgG2a konstante CH1-domene-region i mus Tolv lett kjede kloner og ni tung kjede kloner ble
25 identifisert og tatt ut for en ytterligere screening

Positive kloner fra den ytterligere screening ble dyrket og DNA ble fremstilt Størrelsene av geninnskuddene ble estimert ved gelelektroforese og de med en størrelse som er i stand til å inneholde en uforkortet cDNA ble sub-klonet inn i M13
30 for DNA-sekvensering

6 DNA-sekvensering

Kloner som representerer fire størrelsesgrupper for både tunge og lette kjeder ble oppnådd i M13 DNA-sekvensen for de
35 5' ikke-translaterte regioner, signalsekvenser, variable regioner og 3' ikke-translaterte regioner av uforkortede cDNA'er (figurene 1(a) og 2(a)) ble oppnådd og de tilsvarende aminosyresekvenser ble beregnet ((figurene 1(b) og 2(b)) I

fig 1(a) er de ikke-oversatte DNA-regioner vist øverst, og i begge figurene 1 og 2 er signalsekvensene understreket

7 Konstruksjon av cDNA-ekspressjonsvektorer

5 Celltech-ekspressjonsvektorer er basert på plasmidet pEE6hCMV (referanse 14) En polylinker for innskuddet av gener som skal uttrykkes er innført etter den største tidlige direkte promotor/enhancer av det humane Cytomegalovirus (hCMV) Markørgener for seleksjon av plasmidet i transfekterte euka-
 10 ryotiske celler kan innskytes som BamHI-kassetter i det unike BamHI-sete i pEE6hCMV, f eks neomarkøren for å gi pEE6hCMV-neo Det er vanlig praksis å innskyte neo- og gpt-markører før genet av interesse innskytes, mens GS-markøren innskytes til sist pga tilstedeværelse av interne EcoRI-seter i kasset-
 15 ten

De selekterbare markører uttrykkes fra den SV40 sene promoter som også tilveiebringer et replikasjonsorigo slik at vekto-
 20 rene kan anvendes for ekspresjon i det COS-celle transiente ekspresjonssystem

Musesekvensene ble fjernet fra de M13-baserte vektorer som er beskrevet over som EcoRI-fragmenter og klonet inn i enten pEE6-hCMV-neo for den tunge kjede eller inn i EE6-hCMV-gpt
 25 for den lette kjede til å gi henholdsvis vektorene pJA136 og pJA135

8 Ekspresjon av cDNA'er i COS-celler

Plasmidene pJA135 og pJA136 ble ko-transfektet inn i COS-
 30 celler og supernatant fra transient-ekspressjonsforsøket ble vist til å inneholde sammensatt antistoff som bandt til T-celle-anrikede lymfocytter Metabolske merkingsforsøk med anvendelse av ³⁵S-methionin viste ekspresjon og sammensetning av tunge og lette kjeder

35

9 Konstruksjon av chimeriske gener

Konstruksjon av chimeriske gener fulgte en tidligere beskrevet strategi (Whittle et al (referanse 13)) Et restriksjons-
 sete nær 3'-enden av den variable domensekvens identifiseres

og anvendes til å feste en oligonukleotidadapter som koder for resten av den variable region fra mus og et passende restriksjonssete for festing til den valgte konstante region

5 9 1 **Konstruksjon av lett kjede gen**

Lett kjede cDNA-sekvenser fra mus inneholder et *Ava*I-sete nær 3'-enden av den variable region (fig 1(a)) Størsteparten av sekvensen av den variable region ble isolert som et *Eco*RI-*Ava*I-fragment med 396 basepar En oligonukleotid-adapter ble utformet til å erstatte resten av 3'-regionen i den variable region fra *Ava*I-setet og til å inkludere 5'-restene av den humane konstante region opp til og inkluderende et eneste *Nar*I-sete som tidligere var innarbeidet i den konstante region

10 Et *Hind*III-sete ble innført til å virke som en markør for innskyting av linkerens Linkeren ble ligert til V_L -fragmentet og det *Eco*RI-*Nar*I-tilpassede fragment med 413 basepar ble rensset fra ligeringsblandingen

20 Den konstante region ble isolert som et *Nar*I-*Bam*HI-fragment fra et M13-klon-NW361 og ble ligert med det variable region-DNA inn i en *Eco*RI/*Bam*HI/*CIP* pSP65-behandlet vektor i en treveis-reaksjon til å gi plasmid JA143 Kloner ble isolert etter transformasjon inn i *E. coli* og linkerens og koblingssekvenser ble bekreftet ved tilstedeværelse av *Hind*III-setet og ved DNA-sekvensering

30 9 2 **Konstruksjon av lett kjede gen - versjon 2**

Konstruksjonen av det første chimeriske lett kjede gen gir en fusjon av mus- og humane aminosyresekvenser i koblingen variabel-konstant region I tilfellet med OKT3-lett kjede er aminosyrene i den chimere kobling

35 Leu-Glu-Ile-Asn-Arg/-/Thr-Val-Ala-Ala
VARIABEL KONSTANT

40 Dette sekvensarrangement introduserer et potensielt sete for asparagin (Asn) bundet (N-bundet) glykosylering av V-C-koblingen Derfor ble en annen versjon av den chimeriske lett kjede oligonukleotid-adapteren utformet hvor

threonin (Thr), den første aminosyre i den humane konstante region, ble erstattet med den ekvivalente aminosyre fra den konstante region i mus, alanin (Ala)

5 Et internt HindIII-sete var ikke inkludert i denne adapter, for å differensiere de to chimeriske lett kjede gener

Variabel region fragmentet ble isolert som et EcoRI-AvaI-fragment med 376 basepar. Oligonukleotidlinkeren ble ligert til NarI-kuttet pNW361 og deretter ble den tilpassede konstante region med 396 basepar isolert etter at det modifiserte pNW361 var kuttet på nytt med EcoRI. Variabel region fragmentet og det modifiserte konstant region fragmentet ble ligert direkte inn i EcoI/CIP-behandlet pEE6hCMV-neo til å gi pJA137. Opprinnelig hadde alle de undersøkte kloner innskuddet i den ukorrekt orientering. Innskuddet ble derfor isolert på nytt og klonet på nytt for å vende innskuddet om og gi plasmid pJA141. Det ble oppnådd flere kloner med innskudd i korrekt orientering og adapter-sekvensen av ett ble bekreftet ved DNA-sekvensering.

9 3 Konstruksjon av tung kjede gen

9 3 1 Valg av gen-isotype for tung kjede

25 Konstant region isotypen som ble valgt for den tunge kjede var human IgG4

9 3 2 Genkonstruksjon

Tung kjede cDNA-sekvensen viste et BanI-sete nær 3'-enden av den variable region (fig 2(a)). Det meste av sekvensen for den variable region ble isolert som et EcoRI/CIP/BanI-fragment med 426 basepar. En oligonukleotid-adapter ble utformet til å erstatte resten av 3'-regionen av den variable region fra BanI setet opp til og inkluderende et eneste HindIII-sete som tidligere var blitt innført inn i de første to aminosyrer av den konstante region. Linkeren ble ligert til V_H-fragmentet og det EcoRI-HindIII-tilpassede fragment ble rensset fra ligeringsblandingen.

Den variable region ble ligert til den konstante region ved at pJA91 ble kuttet med EcoRI og HindIII med fjerning av intron-fragmentet og erstatning av dette med V_H til å gi pJA142. Kloner ble isolert etter transformasjon inn i *E. coli* JM101 og linker- og koblingssekvenser ble bekreftet ved DNA-sekvensering (Merk HindIII-setet er tapt ved kloning)

10 Konstruksjon av chimeriske ekspresjonsvektorer

10 10 1 Neo-og-gpt-vektorer

Den chimeriske lette kjede (versjon 1) ble fjernet fra pJA143 som et EcoRI-fragment og klonet inn i EcoRI/CIP-behandlet pEE6hCMVneo-ekspresjonsvektor til å gi pJA145. Kloner med innskuddet i korrekt orientering ble identifisert ved restriksjonskartlegging.

Den chimeriske lette kjede (versjon 2) ble konstruert som beskrevet over. Det chimeriske tung kjede gen ble isolert fra pJA142 som et 2,5 kbp EcoRI/BamHI-fragment og klonet inn i det EcoRI/BclI/CIP-behandlede vektorfragment av et derivat av pEE6hCMVgpt til å gi plasmid pJA144.

10 10 2 GS separate vektorer

GS-versjoner av pJA141 og pJA144 ble konstruert ved at neo- og gpt-kassetene ble erstattet ved en BamHI/SalI/CIP-behandling av plasmidene, isolering av vektorfragmentet og ligering til et GS-holdig fragment av plasmidet pRO49 til å gi lett kjede vektoren pJA179 og tung kjede vektoren pJA180.

30 10 3 GS enkeltvektor-konstruksjon

Enkeltvektor-konstruksjoner som inneholder cL (chimerisk lett), cH (chimerisk tung) og GS-gener på ett plasmid i rekkefølgen cL-cH-GS, eller cH-cL-GS og med transkripsjon av genene som er hode til hale ("head to tail") f.eks. cL>cH>GS ble konstruert. Disse plasmider ble fremstilt ved at pJA179 eller pJA180 ble behandlet med BamHI/CIP og ligert i en BglII/HindIII hCMV-promoter-kassett sammen med enten HindIII/BamHI-fragmentet fra pJA141 inn i pJA180 til å gi cH-cL-GS-plasmidet pJA182.

eller HindIII/BamHI-fragmentet fra pJA144 inn i pJA179 til å gi cL-CH-GS-plasmidet pJA181

11 Ekspresjon av chimeriske gener

5 11 1 Ekspresjon i COS-celler

Det chimeriske antistoff-plasmid pJA145 (cL) og pJA144 (cH) ble ko-transfektet inn i COS-celler og supernatant fra transient-ekspressjonsforsøket ble vist til å inneholde sammenstilt ("assembled") antistoff som bandt til den humane T-cellelinje HUT 78. Metabolske merkingsforsøk ved anvendelse av ³⁵S-methionin viste ekspresjon og sammenstilling av tunge og lette kjeder. Mobiliteten av den lette kjede som ses på reduserte geler foreslår imidlertid at det potensielle glykosyleringssete var blitt glykosylert. Ekspresjon i COS-celler i nærvær av tunicamycin viste en reduksjon av den lette kjedes størrelse i forhold til den som er vist for kontroll-chimeriske antistoffer og den OKT3 lette kjede fra mus. Derfor ble JA141 konstruert og uttrykt. I dette tilfelle viste ikke den lette kjede en varierende mobilitet eller endring av størrelsen i nærvær eller fravær av tunicamycin. Denne andre versjon av den chimeriske lette kjede, når den uttrykkes sammen med chimerisk tung (cH) kjede, dannet antistoff som viste god binding til HUT 78-celler. I begge tilfeller var antigenbinding ekvivalent med den for museantistoffet.

11 2 Ekspresjon i ovarie (CHO) celler fra kinesisk hamster

Stabile cellelinjer er fremstilt fra plasmidet pJA141/pJA144 og fra pJA179/pJA180, pJA181 og pJA182 ved transfeksjon inn i CHO-celler.

12 CDR-poding

Den metode som anvendes var et forsøk på å innføre tilstrekkelige muserester inn i et humant variabel region rammeverk for å danne antigen-bindingsaktivitet som var sammenlignbar med museantistoffene og de chimeriske antistoffene.

12 1 Analyser av den variable region

Fra en undersøkelse av en liten database av strukturer av antistoffer og antigen-antistoff-komplekser er det

klart at kun et lite antall antistoffrester er i direkte kontakt med antigenet. Andre rester kan bidra til antigenbinding ved plassering av kontaktrestene i ønskelige konfigurasjoner og også ved å indusere en stabil sammenfolding av de individuelle variable domener og stabil interaksjon av de variable domener i den lette og tunge kjede. De rester som velges for overføring kan identifisering på en rekke måter

- (a) Ved eksaminasjon av antistoff røntgenkrystall-strukturer kan antigen-bindingsoverflaten i alt vesentlig lokaliseres på en rekke sløyfer, tre pr domene, som strekker seg fra B-"barrel" rammeverket
- (b) Ved analyse av variabelt domene sekvenser av antistoffet kan hypervariable regioner (betegnet "the Complementary Determining Region's" (CDR'er) av Wu og Kabat (referanse 5)) identifiseres. I de fleste, men ikke alle tilfeller tilsvarer disse CDR'er, men strekker seg litt utenfor, de overnevnte sløyferegioner
- (c) Rester som ikke identifiseres ved (a) og (b) kan bidra til antigenbinding direkte eller indirekte ved at de påvirker topologien i antigenbindingssetet, eller ved at de induserer en stabil sammenfolding av de individuelle variable domener og en stabilisering av den inter-variable domeneinteraksjon. Disse rester kan enten identifiseres ved at sekvensene for et visst antistoff legges oppå en kjent struktur og man ser på nøkkelrester for deres bidrag, eller ved sekvensoppstillingsanalyser i det man merker seg "idiosynkratiske" rester med etterfølgende undersøkelse av deres strukturelle lokalisering og lignende effekter

12 1 1 Lett kjede

Fig 3 viser en oppstilling av sekvenser for den humane rammeverkregion RE1 og den OKT3-variable region i den lette kjede. De strukturelle sløyfer (LOOP) og CDR'er (Kabat) som man antar svarer til antigenbindingsregionen er markert. En rekke andre rester som også eventuelt bidrar til antigenbinding som beskrevet i 13 1(c) er også markert. Over sekvensene i fig 3 indikerer resttypen den romlige lokalisering av hver

rest-sidekjede, utledet ved eksaminasjon av oppløste strukturer fra røntgenkrystallografi-analyser

Nøkkelen til denne rest-type-angivelse er som følger

N - nær CDR (Fra røntgenstrukturer)

5 P - Sammenfolding B - Begravet ikke-sammenfolding

S - Overflate E - Synlig

I - Grenseflate * - Grenseflate

- Sammenfolding/Synlig del

7 - Ikke-CDR-rester som kan være nødvendig å etterlate
10 som musesekvens

De rester som er understreket i fig 3 er aminosyrer REI ble valgt som det humane rammeverk fordi den lette kjede er en kappa-kjede og de kappa-variable regioner viser større homologi med musesekvensene enn en lambda lett kjede variabel region f eks KOL (se under) REI ble valgt
15 fremfor en annen kappa lett kjede fordi røntgenstrukturen av den lette kjede har vært bestemt slik at en strukturundersøkelse av de individuelle rester vil kunne gjennomføres

20 12 1 2 Tung kjede

Likeledes viser fig 4 en sammenstilling av sekvenser for den humane rammeverkregion KOL og den OKT3 variable region i den tunge kjede De strukturelle sløyfer og CDR'er som antas å korrespondere med antigen-bindingsregionen er markert En rekke andre rester som også kan bidra til
25 antigenbinding er markert, som beskrevet i 12 1(c)

Nøkkel-resttypen og andre indikatorer som anvendes i fig 4 er de samme som dem som ble anvendt i fig 3 KOL ble valgt som tung kjede rammeverket fordi røntgenstrukturen er blitt bestemt til en bedre oppløsning enn f eks NEWM og sekvensoppstillingen av den OKT3 variable region i den tunge kjede viste en noe bedre homologi med KOL enn med
30 NEWM

12 2 Utforming av variable gener

35 Variabel region domenene ble utformet med anvendelse av variabel region optimal kodon fra mus (Grantham og Perrin (referanse 15)) og ved anvendelse av B72 3 signalsekvenser (Whittle et al (referanse 13)) Sekvensene ble utformet til å festes til den konstante region på samme måte som for de

overnevnte chimeriske gener Enkelte sammenstillinger
inneholdt "Kozak Konsensus-sekvensen" (Kozak (referanse
16)) direkte bundet til 5' av signalsekvensen i genet
Dette sekvensmotiv antas å spille en viktig rolle i trans-
5 lasjonsinitiering i eukaryoter

12 3 Genkonstruksjon

For å bygge de variable regioner er forskjellige strategier
tilgjengelig Sekvensen kan sammenstilles ved anvendelse av
oligonukleotider på en lignende måte som hos Jones et al
10 (referanse 17) eller ved samtidig erstatning av alle CDR'er
eller sløyferegioner ved oligonukleotid-rettet setespesi-
fikk mutagenese på samme måte som i henhold til Verhoeyen
et al (referanse 2) Begge strategier ble anvendt og en
liste over konstruksjoner er angitt i tabellene 1 og 2 og i
15 fig 4 og 5 I en rekke tilfeller ble det notert at mutage-
nese-metoden førte til delesjoner og rearrangementet i
genet som remodelleres, mens en vellykket sammenstilling
var meget følsom med hensyn til kvaliteten av oligonukleo-
tidene

20

13 Konstruksjon av ekspresjonsvektorer

Gener ble isolert fra M13- eller SP65-baserte intermediære
vektorer og klonet inn i pEE6hCMVneo for de lette kjeder og
pEE6hCMVgpt for de tunge kjeder på samme måte som for de
25 overnevnte chimeriske gener

TABELL 1 CDR-podede genkonstrukturer

| Kode | Innhold av musesekvens | Konstruksjonsmetode | Kozak-sekvens | |
|--------------------------|--|---|---------------|-----|
| | | | - | + |
| Lett kjede | | All humant rammeverk REI | | |
| 121 | 26-32,50-56,91-96 inklusiv | SDM og gensammenstilling | + | 1 u |
| 121A | 26-32,50-56,91-96 inklusiv +1, 3, 46, 47 | Delvis gensammenstilling | 1 u | + |
| 121B | 26-32,50-56,91-96 inklusiv +46, 47 | Delvis gensammenstilling | 1 u | + |
| 221 | 24-24,50-56,91-96 inklusiv | Delvis gensammenstilling | + | + |
| 221A | 24-34,50-56,91-96 inklusiv +1, 3, 46, 47 | Delvis gensammenstilling | + | + |
| 221B | 24-34,50-56,91-96 inklusiv +1, 3 | Delvis gensammenstilling | + | + |
| 221C | 24-34,50-56,91-96 inklusiv | Delvis gensammenstilling | + | + |
| Tung kjede | | All humant rammeverk KOL | | |
| 121 | 26-32,50-56,95-100B inklusiv | Gensammenstilling | 1 u | + |
| 131 | 26-32,50-58,95-100B inklusiv | Gensammenstilling | 1 u | + |
| 141 | 26-32,50-65,95-100B inklusiv | Delvis gensammenstilling | + | 1 u |
| 321 | 26-35,50-56,95-100B inklusiv | Delvis gensammenstilling | + | 1 u |
| 331 | 26-35,50-58,95-100B inklusiv | Delvis gensammenstilling Gensammenstilling | + | + |
| 341 | 26-35,50-65,95-100B inklusiv | SDM Delvis gensammenstilling | + | + |
| 341A | 26-35,50-65,95-100B inklusiv +6, 23, 24, 48, 49, 71, 73, 76 78, 88, 91 (+63 = human) | Gensammenstilling | 1 u | + |
| 341B | 26-35,50-65,95-100B inklusiv +48, 49, 71, 73, 76, 78, 88, 91 (+63 + human) | Gensammenstilling | 1 u | + |
| Bemerk | | | | |
| 1 u | - | ikke utført | | |
| SDM | - | Seterettet mutagenese | | |
| Gensammenstilling | - | Variabel region sammenstilt helt fra oligonukleotider | | |
| Delvis gensammenstilling | - | Variabel region sammenstilt ved kombinasjon av restriksjonsfragmenter enten fra andre gener som opprinnelig er dannet ved hjelp av SDM og gensammenstilling eller ved oligonukleotid-sammenstilling av en del av den variable region og rekonstruksjon med restriksjonsfragmenter fra andre gener som opprinnelig er dannet ved hjelp av SDM og gensammenstilling | | |

14 Ekspresjon av CDR-podede gener

14 1 Fremstilling av antistoff bestående av podede lette (gL) kjeder med tunge (mH) kjeder fra mus eller chimeriske tunge (cH) kjeder

5 Alle gL-kjeder i forening med mH eller cH ga rimelige mengder antistoff. Innskudd av Kozak-konsensus-sekvensen i en posisjon 5' til ATG (kgL-konstrukt) førte imidlertid til en 2 - 5 dobbel forbedring i netto ekspresjon. Over en omfattende serie med forsøk ble ekspressionsnivåene økt fra omtrent 200 ng/ml til omtrent 500 ng/ml for kgL/cH- eller kgL/mH-kombinasjoner.

Når den direkte binding til antigen på HUT 78-celler ble målt, førte et konstrukt som var utformet til å inkludere musesekvens basert på sløyfelengde (gL121) ikke til aktivt antistoff i forening med mH eller cH. Et konstrukt utformet til å inkludere musesekvens basert på Kabat CDR'er (gL221) viste noe svak binding i forening med mH eller cH. Når rammeverkrester 1, 3, 46, 47 imidlertid ble forandret fra de humane til de murine OKT3-ekvivalenter basert på de argumenter som er angitt i avsnitt 12.1, ble det vist antigen binding når begge de nye konstrukt, som ble betegnet 121A og 221A var ko-

15 uttrykt med cH. Når virkningen av disse rester ble undersøkt mer detaljert, fremkom det at rester 1 og 3 ikke er viktige medvirkende rester da produktet av gL221B-genet viser liten påvisbar bindingsaktivitet sammen med cH. Lett kjede produktet av gL221C, hvor musesekvenser er tilstede i 46 og 47, viser god bindingsaktivitet i forening med cH.

14 2 Fremstilling av antistoff bestående av podede tunge (gH) kjeder med lette (mL) kjeder fra mus eller chimeriske lette (cL) kjeder

35 Ekspresjon av gH-genene viste seg å være vanskeligere å oppnå enn for gL. For det første viste det seg at inkludering av Kozak-sekvensen ikke hadde noen markert virkning på ekspresjon av gH-gener. Ekspresjonen synes å være noe forbedret, men ikke i samme grad som man ser for den podede lette kjede.

Det viste seg også å være vanskelig å demonstrere fremstilling av forventede mengder material når sløyfevalget (aminosyre 26-32) for CDR1 anvendes, f.eks. gH121, 131, 141 og man kan ikke trekke noen konklusjoner i forbindelse med disse konstrukter

5

Ko-ekspressjonen av gH341-genet med cL eller mL har dessuten variert og har hatt en tendens til å danne mindre mengder antistoff enn cH/cL- eller mH/mL-kombinasjoner. Endringene til gH341 for å danne gH341A og gH341B førte til forbedrede ekspressionsnivåer

10

Dette kan enten skyldes en generell økning i muse-sekvens-fraksjonen i den variable region, eller endringen i posisjonen 63 hvor resten er bragt tilbake til den humane aminosyre valin (Val) fra fenylalanin (Phe) for å unngå mulige interne sammenfoldingsproblemer med resten av det humane rammeverk. Dette arrangement forekommer også i gH331 og gH321

15

20

Når gH321 eller gH331 ble uttrykt i forening med cL, ble det dannet antistoff, men antistoff-bindingsaktivitet ble ikke påvist. Når det mer konservative gH341-gen ble anvendt kunne antigen binding påvises sammen med cL eller mL, men aktiviteten var akkurat like over bakgrunnsnivået. Når ytterligere muserester ble substituert basert på argumentene i 12.1, kunne antigen binding klart demonstreres for antistoffet som var dannet når kgH341A og kgH341B ble uttrykt i forening med cL

25

30

14.3 Fremstilling av fullstendig CDR-podet antistoff

kgL221A-genet ble uttrykt sammen med kgH341, kgH341A eller kgH341B. For kombinasjonen kgH221A/kgH341 ble det dannet svært lite material i en normal COS-celleekspressjon. For kombinasjonene kgL221A/kgH341A eller kgH221A/kgH341B ble det dannet antistoffmengder som var tilsvarende dem for gL/cH

35

I flere forsøk kunne ingen antigen-bindingsaktivitet påvises med kgH221A/gH341 eller kgH221A/kgH341-kombi-

nasjoner, skjønt ekspresjonsnivåene var svært lave. Antigen binding ble påvist når kgL221A/kgH341A eller kgH221A/kgH341B-kombinasjoner ble uttrykt. Når antistoffet var dannet fra kombinasjonen kgL221A/kgH341A var antigen bindingen svært lik den for det chimeriske antistoff.

En analyse av de overnevnte resultater er gitt i det etterfølgende

15 Diskusjon i forbindelse med resultatene fra CDR-poding

I utformingen av det fullstendige humaniserte antistoff var målet å overføre det minimale antall muse-aminosyrer som vil gi antigen binding på et humant antistofframmeverk.

15 1 Lett kjede

15 1 1 Omfanget av CDR'ene

For den lette kjede er de regioner som definerer sløyfene og som er kjent fra strukturstudier for andre antistoffer til å inneholde antigen-kontakt-rester, og de hypervariable sekvenser som er definert av Kabat et al (referanser 4 og 5) som "Complementarity Determining Regions" (CDR'er), ekvivalente for CDR2. For CDR1 strekker den hypervariable region seg fra rester 24 til og med 34 mens den strukturelle sløyfe strekker seg fra 26 til og med 32. Når det gjelder OKT3 er der kun en aminosyre som er forskjellig mellom de to valg, ved aminosyre 24, hvor musesekvensen er et serin og den humane struktur REI har glutamin. For CDR3 strekker sløyfen seg fra rest 91 til og med 96 mens Kabat hypervariabiliteten strekker seg fra rester 89 til og med 97. For OKT3, er aminosyrer 89, 90 og 97 de samme mellom OKT3 og REI (fig 3). Når konstruerer basert på sløyfevalget for CDR1 (gL121) og Kabat-valget (gL221) ble gjennomført og uttrykt sammen med mH eller cH, fant man intet bevis for antigen bindingsaktivitet for gL121, men spor av aktivitet kunne påvises for gL221, noe som foreslår at en enkelt ekstra muserest i den podede variable region kunne ha noen påvisbar

effekt Begge genkonstrukter var rimelig godt uttrykt i det transiente ekspresjonssystem

15 1 2 **Rammeverkrester**

De gjenværende rammeverkrester ble deretter ytterligere undersøkt, særlig aminosyrer som var kjent fra røntgenanalyser av andre antistoffer til å være nær CDR'ene og også de aminosyrer som i OKT3 viste forskjeller fra konsensus-rammeverket for musesubgruppen (subgruppe VI) hvortil OKT3 viser mest homologi Fire posisjoner 1, 3, 46 og 47 ble identifisert og deres eventuelle bidrag ble undersøkt ved at den humane aminosyre ble erstattet med aminosyren fra mus i hver posisjon Derfor ble gL221A (gL221 + D1Q, Q3V, L46R, L47W, se fig 3 og tabell 1) dannet, klonet i EE6hCMVneo og ko-uttrykt med cH (pJA144) Det resulterende antistoff var godt ko-uttrykt og viste god bindingsaktivitet Når de relaterte gener gL221B (gL221 + D1Q, Q3V) og gL221C (gL221 + L46R, L47W) ble dannet og likeledes testet, mens begge gener dannet antistoff når ko-uttrykt med cH, viste kun gL221C/cH-kombinasjonen god antigen binding Når gL121A (gL121 + D1Q, Q3V, L46R, L47W) genet ble dannet og ko-uttrykt med cH, ble det dannet antistoff som også bandt til antigenet

25 15 2 **Tung kjede**

15 2 1 **Omfanget av CDR'ene**

For den tunge kjede var analyser av sløyfen og hypervariabilitet kun overensstemmende i CDR3 For CDR1 strakk sløyferegionen seg fra rester 26 til og med 32 mens Kabat-CDR strakk seg fra rester 31 til og med 35 For CDR2 er sløyferegionen fra 50 til og med 58 mens den hypervariable region dekker aminosyrer 50 til og med 65 De humaniserte tunge kjeder ble derfor konstruert ved anvendelse av rammeverket fra antistoff KOL og med forskjellige kombinasjoner av disse CDR-valg, inkluderende et kortere valg for CDR2 av 50 til og med 56 idet der var noe usikkerhet når det gjaldt definisjonen av endepunktet for CDR2-sløyfen rundt rester 56 til 58 Genene ble ko-

uttrykt initialt med mL eller cL. Når det gjaldt gH-genene med sløyfevalg for CDR1 f. eks. gH121, gH131, gH141, ble det dannet svært lite antistoff i kultur-supernatantene. Da det ikke ble påvist noen fri lett kjede ble det antatt at antistoffet var dannet og sammenstilt inne i cellen, men at den tunge kjede på en eller annen måte var avvikende, eventuelt ukorrekt foldet, og derfor ble antistoffet nedbrutt internt. I enkelte forsøk kunne spormengder av antistoff påvises i studier hvor det ble anvendt merking med ³⁵S.

Da intet netto antistoff ble dannet, ble analyser av disse konstrukter ikke videreført ytterligere.

Når en kombinasjon av sløyfevalget og Kabat-valget for CDR1 imidlertid ble testet (muse-aminosyrer 26 til og med 35) og hvor rester 31 (Ser til Arg), 33 (Ala til Thr) og 35 (Tyr til His) ble endret fra humane rester til muserester og sammenlignet med den første serien, ble antistoff dannet for gH321, kgH331 og kgH341 når ko-uttrykt med cL. Ekspresjonen var generelt liten og kunne ikke forbedres særlig ved innskudd av Kozak-konsensus-sekvensen 5' til ATG i signalsekvensen av genet, til forskjell fra tilfellet med gL-genene hvor et slikt innskudd førte til en 2 - 5 dobbel økning i netto antistoffproduksjon. Kun i tilfellet med gH341/mL eller kgH341/cL kunne imidlertid marginal antigen bindingsaktivitet demonstreres. Når kgH341-genet var uttrykt sammen med kgL221A, var nettoutbyttet av antistoff alt for lavt til å gi et signal over bakgrunnsnivået i antigen-bindingsforsøket.

15 2 2 **Rammeverkrester**

Som i tilfellet med den lette kjede ble rammeverkene av den tunge kjede undersøkt på nytt. Muligens pga den mindre opprinnelige homologi mellom de variable domener i den humane tunge kjede og den tunge kjede fra mus sammenlignet med de lette kjeder, viste det

seg at flere aminosyreposisjoner var av interesse
 To gener kgH341A og kgH341B ble konstruert, hvor
 henholdsvis 11 eller 8 humane rester var erstattet
 av muserester sammenlignet med gH341, og med CDR2-
 5 resten 63 tilbake til den humane aminosyre even-
 tuelt for å forbedre domene-sammenfolding Begge
 viste antigen binding når de ble kombinert med cL
 eller kgL221A, idet kgH341A-genet med alle 11 for-
 andringer viste seg å være et overlegent valg

10 15 3 Foreløpelige konklusjoner

Det har derfor blitt demonstrert for OKT3 at for å over-
 føre antigen bindingsevne til det humaniserte antistoff,
 vil muserester utenfor CDR-regionene som definert ved
 Kabat-hypervariabilitet eller strukturelle sløyfevalg
 15 kreves for både de lette og tunge kjeder Færre ekstra
 rester behøves for den lette kjede, noe som eventuelt
 skyldes den større initiale homologi mellom de variable
 humane kappa-regioner og dem fra mus

20 Av forandringene, er syv (1 og 3 fra den lette kjede og
 6, 23, 71, 73 og 76 fra den tunge kjede) forutsagt ut
 fra kjennskap til andre antistoff-strukturer til å være
 enten delvis eksponert eller på antistoff-overflaten
 Det er her blitt vist at rester 1 og 3 i den lette kjede
 25 ikke absolutt nødvendigvis må være musesekvensen, og for
 den tunge kjede dannet den gH341B-tunge kjede i kombina-
 sjon med den 221A-lett kjede kun svak bindingsaktivitet
 Tilstedeværelse av 6, 23 og 24 forandringene er derfor
 viktige for å opprettholde en bindingsaffinitet som er
 30 lik den for det murine antistoff Det var derfor viktig
 å ytterligere studere det individuelle bidrag fra åtte
 andre muserester av kgH341A-genet sammenlignet med
 kgH341

35 16 Ytterligere CDR-podingsforsøk

Ytterligere CDR-podete tung kjede gener ble i alt vesentlig
 fremstilt som beskrevet over Med henvisning til tabell 2 var
 de ytterligere gener for den tunge kjede basert på gH341
 (plasmid pJA178) og gH341A (plasmid pJA185) med enten mus-

OKT3 eller humane KOL-rester i 6, 23, 24, 48, 49, 63, 71, 73, 76, 78, 88 og 91 som indikert De CDR-podede lett kjede gener som ble anvendt i disse ytterligere forsøk var gL221, gL221A, gL221B og gL221C som beskrevet over

5

TABELL 2

OKT3-tung kjede CDR-podinger

I gH341 og derivater

| RES NUM | 6 | 23 | 24 | 48 | 49 | 63 | 71 | 73 | 76 | 78 | 88 | 91 |
|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------------|
| OKT3vh | <u>Q</u> | <u>K</u> | <u>A</u> | <u>I</u> | <u>G</u> | <u>F</u> | <u>T</u> | <u>K</u> | <u>S</u> | <u>A</u> | <u>A</u> | <u>Y</u> |
| gH341 | E | S | S | V | A | F | R | N | N | L | G | F JA178 |
| gH341A | <u>Q</u> | <u>K</u> | <u>A</u> | <u>I</u> | <u>G</u> | <u>V</u> | <u>T</u> | <u>K</u> | <u>S</u> | <u>A</u> | <u>A</u> | <u>Y</u> JA185 |
| gH341E | <u>Q</u> | <u>K</u> | <u>A</u> | <u>I</u> | <u>G</u> | <u>V</u> | <u>T</u> | <u>K</u> | <u>S</u> | <u>A</u> | <u>G</u> | <u>G</u> JA198 |
| gH341* | <u>Q</u> | <u>K</u> | <u>A</u> | <u>I</u> | <u>G</u> | <u>V</u> | <u>T</u> | <u>K</u> | <u>N</u> | <u>A</u> | <u>G</u> | <u>F</u> JA207 |
| gH341* | <u>Q</u> | <u>K</u> | <u>A</u> | <u>I</u> | <u>G</u> | <u>V</u> | <u>R</u> | <u>N</u> | <u>N</u> | <u>A</u> | <u>G</u> | <u>F</u> JA209 |
| gH341D | <u>Q</u> | <u>K</u> | <u>A</u> | <u>I</u> | <u>G</u> | <u>V</u> | <u>T</u> | <u>K</u> | <u>N</u> | <u>L</u> | <u>G</u> | <u>F</u> JA197 |
| gH341* | <u>Q</u> | <u>K</u> | <u>A</u> | <u>I</u> | <u>G</u> | <u>V</u> | <u>R</u> | <u>N</u> | <u>N</u> | <u>L</u> | <u>G</u> | <u>F</u> JA199 |
| gH341C | <u>Q</u> | <u>K</u> | <u>A</u> | <u>V</u> | <u>A</u> | <u>F</u> | <u>R</u> | <u>N</u> | <u>N</u> | <u>L</u> | <u>G</u> | <u>F</u> JA184 |
| gH341* | <u>Q</u> | <u>S</u> | <u>A</u> | <u>I</u> | <u>G</u> | <u>V</u> | <u>T</u> | <u>K</u> | <u>S</u> | <u>A</u> | <u>A</u> | <u>Y</u> JA203 |
| gH341* | E | S | <u>A</u> | <u>I</u> | <u>G</u> | V | <u>T</u> | <u>K</u> | <u>S</u> | <u>A</u> | <u>A</u> | <u>Y</u> JA205 |
| gH341B | E | S | S | <u>I</u> | <u>G</u> | V | <u>T</u> | <u>K</u> | <u>S</u> | <u>A</u> | <u>A</u> | <u>Y</u> JA183 |
| gH341* | <u>Q</u> | <u>S</u> | <u>A</u> | <u>I</u> | <u>G</u> | V | <u>T</u> | <u>K</u> | <u>S</u> | <u>A</u> | <u>G</u> | <u>F</u> JA204 |
| gH341* | E | S | <u>A</u> | <u>I</u> | <u>G</u> | V | <u>T</u> | <u>K</u> | <u>S</u> | <u>A</u> | <u>G</u> | <u>F</u> JA206 |
| gH341* | <u>Q</u> | <u>S</u> | <u>A</u> | <u>I</u> | <u>G</u> | V | <u>T</u> | <u>K</u> | <u>N</u> | <u>A</u> | <u>G</u> | <u>F</u> JA208 |
| YOL | E | S | S | V | A | | R | N | N | L | G | F |

OKT3-lett kjede CDR-podinger

2 gL221 og derivater

30

| RES NUM | 1 | 3 | 46 | 47 |
|---------|----------|----------|----------|-----------------|
| OKT3v1 | <u>Q</u> | <u>V</u> | <u>R</u> | <u>W</u> |
| GL221 | D | Q | L | L DA221 |
| gL221A | <u>Q</u> | <u>V</u> | <u>R</u> | <u>W</u> DA221A |
| gL221B | <u>Q</u> | <u>V</u> | L | L DA221B |
| GL221C | D | Q | <u>R</u> | <u>W</u> DA221C |
| REI | D | Q | L | L |

35

Murine rester er understreket

De CDR-podede tung og lett kjede gener var ko-uttrykt i COS-celler, enten med hverandre i forskjellige kombinasjoner, men også med de tilsvarende murine og chimeriske tung og lett kjede gener, i alt vesentlig som beskrevet over. De oppnådde antistoffprodukter ble deretter analysert i bindings- og blokkeringsanalyser med HPB-ALL-celler som beskrevet over

Resultatene fra forsøkene i forbindelse med de forskjellige podede tunge kjeder ko-uttrykt med den gL221C-lette kjede er gitt i figurene 7 og 8 (for JA184, JA185, JA197 og JA198 sammenstillingene - se tabell 2), i fig 9 (for JA183, JA184, JA185 og JA197 sammenstillingene) i fig 10 (for de chimeriske JA185, JA199, JA204, JA205, JA207, JA208 og JA209 sammenstillinger) og i fig 11 (for JA183, JA184, JA185, JA198, JA203, JA205 og JA206 sammenstillingene)

Det basis-podede produkt uten forandringer fra human til murin i de variable rammeverk, dvs gL221 uttrykt sammen med gH341 (JA178), og også det "fullstendig podede" produkt som mest har humane til murine forandringer i rammeverket av den podede tunge kjede, dvs gL221C ko-uttrykt med gH341A (JA185), ble målt for relativ bindingsaffinitet i et konkurrerende forsøk mot murin OKT3-referansestandard ved anvendelse av HPB-ALL-celler. Forsøket som anvendes var som beskrevet over i avsnitt 3.3. De oppnådde resultater er gitt i fig 12 for det basis-podede produkt og fig 13 for det fullstendig podede produkt. Disse resultater indikerer at det basis-podede produkt hadde ubetydelig bindingsevne sammenlignet med OKT3 murin referansestandard, mens det "fullstendig podede" produkt hadde en bindingsevne som er svært lik den for den OKT3 murine referansestandard.

Bindings- og blokkeringsforsøksresultatene indikerer følgende

JA198- og JA207-sammenstillingene synes å ha de beste bindingsegenskaper og tilsvarende bindingsevner, som begge i alt vesentlig er de samme som for de chimeriske og fullstendig podede gH341A-produkter. Dette indikerer at posisjoner 88 og 91 og posisjon 76 ikke er særdeles kritiske for oppretthol-

delse av OKT3-bindingsevnen, mens minst noen av posisjonene 6, 23, 24, 48, 49, 71, 73 og 78 er svært viktige

5 Dette er et resultat av det funn at JA209 og JA199, skjønt de har lignende bindingsevne til hverandre, har mindre bindingssevne enn JA198- og JA207-sammenstillingene Dette indikerer viktigheten med å ha muserester i posisjonene 71, 73 og 78, som er enten helt eller delvis human i henholdsvis JA199- og JA209-sammenstillingene

10

Ved sammenligning av resultatene oppnådd for JA205- og JA183-sammenstillingene ses det dessuten at det er en reduksjon i binding fra JA205- til JA183-sammenstillingene Dette indikerer viktigheten av å beholde en muserest i posisjon 23, den 15 eneste posisjon som er forandret mellom JA205 og JA183

Disse og andre resultater fører til den konklusjon at av de elleve muse-rammeverkrester som anvendes i gH341A (JA185) sammenstillingen, er det viktig å beholde muserester i alle 20 posisjoner 6, 23, 24, 48, 49, og eventuelt for maksimal bindingsaffinitet i 71, 73 og 78

Tilsvarende forsøk ble gjennomført for å CDR-pode en rekke av gnager-antistoffene inkluderende antistoffer med spesifisitet 25 for CD4 (OKT4), ICAM-1 (R6-5), TAG72 (B72 3), og TNF α (61E71, 101 4, hTNF1, hTNF2 og hTNF3)

EKSEMPEL 2

CDR-poding av et murint anti-CD4 T-celle receptorantistoff, 30 OKT4A

Anti-OKT4A CDR-podede tung og lett kjede gener ble fremstilt, uttrykt og i alt vesentlig testet som beskrevet over i eksempel 1 for CDR-podet OKT3 CDR-poding av OKT4A er beskrevet detaljert i Ortho patentsøknad PCT/GB90 med samme 35 dato som den foreliggende søknad og med tittelen "Humanised Antibodies" En rekke CDR-podede OKT4-antistoffer er blitt fremstilt Det valgte CDR-podede OKT4A er kombinasjonen av den podede lette kjede LCDR2 og den podede tunge kjede HCDR10

Den lette kjede

Det humane akseptorrammeverk anvendt for de podede lette kjeder var REI. Den foretrukne LCDR2-lette kjede har forandringer fra human til mus i posisjoner 33, 34, 38, 49 og 89 i tillegg til strukturell sløyfe CDR'ene. Av disse endrede posisjoner, faller posisjonene 33, 34 og 89 innenfor de foretrukne utstrakte/utvidete CDR'er fremstilt i henhold til oppfinnelsen (posisjoner 33 og 34 i CDR1 og posisjon 89 i CDR3). De humane til murine forandringer i posisjoner 38 og 49 tilsvarer posisjoner hvor aminosyrerestene foretrukket er donor-murine aminosyrerester.

En sammenligning av aminosyresekvensene for det donor-murine variable domene av lett kjede og det REI humane akseptor variable domene av lett kjede viser ytterligere at murine og humane rester er identiske i alle posisjoner 46, 48 og 71 og i alle posisjoner 2, 4, 6, 35, 36, 44, 47, 62, 64 - 69, 85, 87, 98, 99, 101 og 102. Aminosyrerestene i posisjon 58 i LCDR2 er imidlertid den humane REI-rammeverkrest og ikke OKT4-museresten som ville vært foretrukket.

Den tunge kjede

Det humane akseptorrammeverk anvendt for de podede tunge kjeder var KOL.

Den foretrukne CDR-podete HCDR10-tunge kjede har forandringer fra human til mus i posisjonene 24, 35, 57, 58, 60, 88 og 91 i tillegg til strukturell sløyfe CDR'ene. Av disse posisjoner, faller posisjon 35 (CDR1) og posisjoner 57, 58 og 60 (CDR2) innenfor de foretrukne utstrakte CDR'er fremstilt i overensstemmelse med oppfinnelsen. Også forandringen fra human til mus i posisjon 24 tilsvarer en posisjon hvor aminosyreresten er en donor-murin rest. Forandringer fra human til mus i posisjonene 88 og 91 tilsvarer dessuten til posisjoner hvor aminosyrerestene eventuelt er donor-murine rester.

En sammenligning av de murine OKT4A og humane KOL variable aminosyresekvenser av tung kjede viser at de murine og humane rester er identiske i alle posisjoner 23, 49, 71, 73 og 78 og

1 alle posisjoner 2, 4, 6, 25, 36, 37, 39, 47, 48, 93, 94,
103, 104, 106 og 107

Således tilsvarer den OKT4A CDR-podede tunge kjede HCDR10 en
5 særlig foretrukket utførelsesform i forbindelse med den fore-
liggende oppfinnelse

EKSEMPEL 3

CDR-poding av et anti-mucin spesifikt murint antistoff, B72 3
10 Kloning av genet som koder for det anti-mucin spesifikke
murine monoklonale antistoff B72 3 og fremstillingen av B72 3
mus-humane chimeriske antistoffer er tidligere beskrevet
(referanse 13 og WO 89/01783) CDR-podede versjoner av B72 3
ble fremstilt som følger

15 (a) B72 3 Lett kjede

CDR-poding av denne lette kjede ble gjennomført ved
direkte overføring av de murine CDR'er inn i rammeverket
av den humane lette kjede REI De regioner som ble over-
ført var

| 20 | <u>CDR-nummer</u> | <u>Rester</u> |
|----|-------------------|---------------|
| | 1 | 24 - 34 |
| | 2 | 50 - 56 |
| | 3 | 90 - 96 |

25 Aktiviteten av den resulterende podede lette kjede ble målt
ved ko-ekspressjon i COS-celler, av gener for kombinasjo-
nene

B72 3 cH/B72 3 cL
og B72 3 cH/B72 3 gL

30 Supernatanter ble målt for antistoffkonsentrasjon og for
evnen til å binde til mikrotiterplater som var belagt med
mucin De oppnådde resultater indikerte at, i kombinasjonen
med B72 3 cH-kjeden, hadde B72 3 cL og B72 3 gL tilsvarende
bindingsegenskaper

35

Sammenligning av de murine B72 3 og REI aminosyresekvenser av
lett kjede viser at restene er identiske i posisjoner 46, 58
og 71 men er forskjellige i posisjonen 48 Således kan for-
andring av den humane rest til donor-museresten i posisjon 48

ytterligere forbedre bindingsegenskapene av den CDR-podete lette kjede, (B72 3 gL) fremstilt i overensstemmelse med den foreliggende oppfinnelse

5 (b) B72 3 Tung kjede

1 Valg av rammeverk

Det var først nødvendig å gjøre et valg med hensyn til humant rammeverk. Spørsmålet var som følger: var det nødvendig å anvende rammeverkregionene fra et anti-

10 stoff hvis krystallstruktur var kjent eller kunne valget gjøres på bakgrunn av andre kriterier?

For B72 3 tung kjede ble det resonert at, mens kunnskap vedrørende struktur var viktige, kunne overføring av CDR'ene fra mus til humane rammeverk forenkles dersom den totale homologi mellom donor- og reseptorrammeverkene maksimeres. Sammenligning av B72 3 tung kjede sekvensen med den i Kabat (referanse 4) for humane tunge kjeder viste klart at B72 3 hadde dårlig homologi for KOL og NEWM (for hvilke krystallstrukturer er tilgjengelig), men var svært homolog med den tunge kjede for EU. På dette grunnlag, ble EU valgt for CDR-poding og de følgende rester ble overført som CDR'er

| | <u>CDR-nummer</u> | <u>Rester</u> |
|----|-------------------|---------------|
| 25 | 1 | 27 - 36 |
| | 2 | 50 - 63 |
| | 3 | 93 - 102 |

Det ble også notert at FR4-regionen i EU var forskjellig fra den i et hvilket som helst annet humant (eller mus) antistoff. Følgelig, i genene for podet tung kjede var dette også forandret til å gi en "konsensus" human sekvens (Innledende forsøk viste at podet tung kjede gener som inneholdt EU FR4 sekvensen hadde svært dårlig ekspresjon i transiente ekspresjonssystemer)

35

11 Resultater med podet tung kjede gener

Ekspresjon av podet tung kjede gener som inneholdt alle humane rammeverkregioner med enten gL- eller cL-gener ga et podet antistoff med liten evne til å binde til mucin

Det podede antistoff hadde omtrent 1 % av aktiviteten til det chimeriske antistoff. I disse forsøk ble det imidlertid bemerket at aktiviteten av det podede antistoff økte til omtrent 10 % av B72 3 ved eksponering for pH verdier fra 2 - 3,5. Denne observasjon tilveiebragte en pekepinn for hvordan aktiviteten av det podede antistoff kunne forbedres uten syrebehandling. Det ble postulert at syre-eksponering bevirket protonering av en sur rest (pKa for asparaginsyre = 3,86 og glutaminsyre = 4,25) som således ga forandring i strukturen av CDR-sløyfene, eller tillot bedre tilgang for antigen. For sammenligning av sekvensene av B72 3 (referanse 13) og EU (referansene 4 og 5), var det klart at ved å gå fra muse-rammeverkene til humane rammeverk, hadde kun to posisjoner blitt forandret på en slik måte at sure rester var blitt innført. Disse posisjonene er i rester 73 og 81, hvor henholdsvis K til E og Q til E forandringer var blitt gjennomført.

Hvilke av disse posisjoner som kunne være viktige ble bestemt ved at krystallstrukturen av KOL-antistoffet ble undersøkt. I KOL tung kjede, er posisjon 81 langt fra begge CDR-sløyfene. Posisjon 73 er imidlertid nær begge CDR'ene 1 og 3 av den tunge kjede og i denne posisjon var det mulig å tenke seg at en K til E forandring i denne region ville kunne ha en ødeleggende virkning på antigenbinding.

111 Rammeverkforandringer i B72 3 gH-genet

På grunnlag av de ovennevnte analyser ble E73 mutert til et lysin (K). Det ble funnet at denne forandring hadde en dramatisk effekt på den evnen som det podede Ab har til å binde seg til mucin. Videre, var den evnen som det podede B72 3 har, som dannet ved hjelp av den muterte gH/gL-kombinasjon, til å binde til mucin tilsvarende den for det B72 3 chimeriske antistoff.

11V Andre rammeverkforandringer

Under de ovennevnte forsøk ble det gjennomført andre forandringer i rammeverkregionen i den tunge kjede. Innen nøyaktigheten av de anvendte forsøk, synes ingen av forandringene, enten alene eller sammen, å være fordelaktige.

v Andre

Alle de anvendte forsøk målte den evnen som det podede Ab har til å binde til mucin og indikerte som et hele at den enkle rammeformandring i posisjon 33 er tilstrekkelig til å danne et antistoff med tilsvarende bindingsegenskaper som B72 3

Sammenligning av B72 3 murine og EU tung kjede sekvenser viste at muserestene og de humane rester er identiske i posisjonene 23, 24, 71 og 78

Således utgjør den muterte CDR-podete B72 3 tunge kjede en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse

15

EKSEMPEL 4

CDR-poding av et murint anti-ICAM-1 monoklonalt antistoff

Et murint antistoff, R6-5-D6 (EP 0314863) med spesifisitet for intercellulært adhesjonsmolekyl 1 (ICAM-1) ble CDR-podet som hovedsakelig beskrevet over i de foregående eksempler Dette arbeid er beskrevet mer detaljert i den samtidige patentsøknad, GB patentsøknad nr 9009549 8

Det humane EU-rammeverk ble anvendt som akseptor-rammeverket for både tunge og lette kjeder Det aktuelle CDR-podete antistoff tilveiebringes ved ko-eksepresjon av podet lett kjede gL221A og podet tung kjede gH341D som har en bindingsaffinitet for ICAM-1 på omtrent 75 % av den for det tilsvarende mus-humane chimeriske antistoff

30

Lett kjede

gL221A har murine CDR'er i posisjonene 24 - 34 (CDR1), 50 - 56 (CDR2) og 89 - 97 (CDR3) I tillegg er også flere rammeverkrester den murine aminosyre Disse rester velges etter overveielse av disse resters mulig bidrag til domene-sammenfolding og stabilitet av konformasjonen av antigen-bindingsregionen Restene som er beholdt som muserester er i posisjoner 2, 3, 48 (?), 60, 84, 85 og 87 Sammenligning av de murine anti-ICAM-1 og humane EU lett kjede aminosyresekvenser

viser at de murine og humane rester er identiske i posisjonene 46, 58 og 71

Tung kjede

5 gH341D har murine CDR'er i posisjoner 26 - 35 (CDR1), 50 - 56 (CDR2) og 94 - 100B (CDR3) I tillegg ble det anvendt murine rester i gH341D i posisjoner 24, 48, 69, 71, 73, 80, 88 og 91 Sammenligning av de murine anti-ICAM-1 og humane EU aminosyresekvenser av den tunge kjede er identiske i posisjo-

10 ner 23, 49 og 78

EKSEMPEL 5

CDR-poding av murine anti-TNF α -antistoffer

En rekke murine anti-TNF α -monoklonale antistoffer ble CDR-

15 podet som i alt vesentlig beskrevet i de foregående eksempler Disse antistoffer inkluderer de murine monoklonale antistoffer betegnet 61E71, hTNF1, hTNF3 og 101 4 En kort oppsummering av CDR-podingen av hvert av disse antistoffer er gitt i det etterfølgende

20

61E71

En tilsvarende analyse som beskrevet over (eksempel 1, avsnitt 12 1) ble gjennomført for 61E71 og for den tunge kjede ble ti rester identifisert i 23, 24, 48, 49, 68, 69,

25 71, 73, 75 og 88 som rester som eventuelt beholdes som murine De humane strukturer som velges for CDR-poding av dette antistoff, og hTNF3- og 101 4-antistoffene var REI for den lette kjede og KOL for den tunge kjede Det ble dannet tre gener, hvorav det første inneholdt 23, 24, 48, 49, 71 og

30 73 (gH341(6)) som murine rester Det andre genet hadde også 78 og 88 som murine rester (gh341(8)) mens det tredje genet ytterligere hadde 68, 69, 75 og 88 som murine rester (gH341(10)) Hver ble ko-uttrykt med gL221, den minimalt podede lette kjede (bare CDR'er) gL221/gH341(6) og gL221/gH341(8)

35 antistoffene bandt begge like godt til TNF som murint 61E71 gL221/gH341(10) antistoffet uttrykkes ikke og denne kombinasjon ble ikke bragt videre

Deretter ble gL221/gH341(6) antistoffet vurdert i en L929-celle konkurrerende bestemmelse hvor antistoffet konkurrerer mot TNF-reseptoren på L929-celler for binding til TNF i oppløsning. I dette forsøk var gL221/gH341(6) antistoffet omtrent 10 % så aktivt som murint 61E71.

hTNF1

hTNF1 er et monoklonalt antistoff som gjenkjenner en epitop på human TNF. Den EU humane struktur ble anvendt for CDR-poding av både tung og lett kjede variable domener.

Tung kjede

I den CDR-podede tunge kjede (ghTNF1) ble muse-CDR'er anvendt i posisjonene 26 - 35 (CDR1), 50 - 65 (CDR2) og 95 - 102 (CDR3). Muserester ble også anvendt i rammeverket i posisjoner 48, 67, 69, 71, 73, 76, 89, 91, 94 og 108. Sammenligning av TNF1-muse- og EU humane tung kjede rester viser at disse er identiske i posisjoner 23, 24, 29 og 78.

Lett kjede

I den CDR-podede lette kjede (gLhTNF1) ble muse-CDR'er anvendt i posisjonene 24 - 34 (CDR1), 50-56 (CDR2) og 89 - 97 (CDR3). I tillegg ble muserester anvendt i rammeverkene i posisjoner 3, 42, 48, 49, 83, 106 og 108. Sammenligning av hTNF1-muse- og EU humane lett kjede rester viste at disse er identiske posisjonene 46, 58 og 71.

Den podede hTNF1 tunge kjede ble uttrykt sammen med den chimeriske lette kjede og produktets bindingsevne ble sammenlignet med den for produktet med chimerisk lett kjede/chimerisk tung kjede i et TNF-bindingsforsøk. Produktet med den podede tunge kjede viste seg å ha en bindingsevne for TNF som var noe bedre enn det fullstendige chimeriske produkt.

Likeledes ble et produkt av podet tung kjede/podet lett kjede ko-uttrykt og sammenlignet med det fullstendige chimeriske produkt og funnet til å ha nærmest like bindingsegenskaper som det sistnevnte produkt.

hTNF3

hTNF3 gjenkjenner en epitop på human TNF- α . Sekvensen av hTNF3 viser kun 21 forskjeller sammenlignet med 61E71 i de variable regioner av den lette og tunge kjede, 10 i den lette
 5 kjede (2 i CDR'ene i posisjoner 50, 96 og 8 i rammeverket i 1, 19, 40, 45, 46, 76, 103 og 106) og 11 i den tunge kjede (3 i CDR-regionene i posisjoner 52, 60, 95 og 8 i rammeverket i 1, 10, 38, 40, 67, 73, 87 og 105). De lette og tunge kjeder av de 61E71 og hTNF3 chimeriske antistoffer kan byttes uten
 10 tap av aktivitet i det direkte bindingsforsøk. 61E71 har imidlertid mindre evne til å konkurrere med TNF-reseptoren på L929-celler for TNF- α sammenlignet med hTNF3. Basert på 61E71 CDR-podingsdata har gL221 og gH341 (+23, 24, 48, 49, 71 og 73 som mus) gener blitt bygget for hTNF3 og testet og det opp-
 15 nådde podede antistoff binder godt til TNF- α , men konkurrerer svært dårlig i L929-forsøket. Det er mulig at også rammeverk-restene som er identifisert for OKT3-programmet i dette tilfelle kan forbedre den konkurrerende bindingsevnen for dette antistoff.

20

101 4

101 4 er et ytterligere murint monoklonalt antistoff som er i stand til å gjenkjenne humant TNF- α . Den tunge kjede i dette antistoff viser god homologi til KOL og CDR-podingen har
 25 således blitt basert på REI for den lette kjede og KOL for den tunge kjede. En rekke podede gener av den tunge kjede er konstruert med konservative valg for CDR'ene (gH341) og som kun har en eller et lite antall ikke-CDR-rester i stillingene 73, 78 eller 77 til og med 79, som muse-aminosyrene. Disse er
 30 uttrykt sammen med cL eller gL221. I alle tilfeller ses binding til TNF som er ekvivalent med det chimeriske antistoff og ved ko-ekspressjon med cL er de resulterende antistoff i stand til å konkurrere godt i L929-forsøket. Med gL221 er imidlertid de resulterende antistoffer minst en størrelses-
 35 orden mindre i stand til å konkurrere for TNF mot TNF-reseptoren på L929-celler.

Muserester i andre posisjoner i den tunge kjede, f. eks. både 23 og 24 eller i 76 har ikke vist forbedring av den konkurrerende evne for det podede antistoff i L929-forsøket

- 5 En rekke andre antistoffer som inkluderer antistoffer med spesifisitet for interleukiner, f. eks. IL1 og cancer-markører som carcinoembryonisk antigen (CEA) f. eks. det monoklonale antistoff A5B7 (referanse 21), er blitt CDR-podet på en vellykket måte

Referanser

- 1 Kohler & Milstein, Nature, 265, 295-497, 1975.
- 2 Chatenoud et al, (1986), J. Immunol. 137, 830-838.
3. Jeffers et al, (1986), Transplantation, 41, 572-578.
4. Begent et al, Br. J. Cancer 62: 487 (1990).
5. Verhoeyen et al, Science, 239, 1534-1536, 1988
- 6 Riechmann et al, Nature, 332, 323-324, 1988.
- 7 Kabat, E.A., Wu, T.T., Reid-Miller, M., Perry, H.M., Gottesman, K.S., 1987, in Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA.
- 8 Wu, T T., and Kabat, E A , 1970, J. Exp. Med 132 211-250
- 9 Queen et al, (1989), Proc Natl. Acad. Sci USA, 86, 10029-10033 and WO 90/07861
- 10 Maniatis et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, New York, 1989
- 11 Primrose and Old, Principles of Gene Manipulation, Blackwell, Oxford, 1980
12. Sanger, F , Nicklen, S , Coulson, A R , 1977, Proc Natl Acad. Sci USA, 74 5463

- 13 Kramer, W , Drutsa, V , Jansen, H.-W , Kramer, B , Plugfelder, M , Fritz, H.-J , 1984, Nucl Acids Res 12, 9441
- 14 Whittle, N., Adair, J., Lloyd, J.C., Jenkins, E , Devine, J., Schlom, J., Raubitshek, A., Colcher, D., Bodmer, M., 1987, Protein Engineering 1, 499
15. Sikder, S.S., Akolkar, P N., Kaledas, P.M., Morrison, S.L., Kabat, E.A., 1985, J. Immunol. 135, 4215.
- 16 Wallick, S C., Kabat, E.A., Morrison, S.L., 1988, J. Exp. Med. 168, 1099
- 17 Bebbington, C R , Published International Patent Application WO 89/01036.
18. Granthan and Perrin 1986, Immunology Today 7, 160
- 19 Kozak, M., 1987, J Mol. Biol. 196, 947
- 20 Jones, T.P , Dear, P H , Foote, J., Neuberger, M S , Winter, G , 1986, Nature, 321, 522
- 21 Harwood et al, Br J Cancer, 54, 75-82 (1986)

PATENTKRAV

1 Fremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt
CDR-podet antistoffmolekyl omfattende en tung kjede og/eller
5 en lett kjede med et variabel region domene omfattende
akseptor-rammeverk og donor-antigenbindende regioner hvor
rammeverket av den tunge kjede omfatter donorrester i minst
en av posisjonene 6, 23 og/eller 24, 48 og/eller 49, 71 og/
eller 73, 75 og/eller 76 og/eller 78 og 88 og/eller 91, og
10 hvor rammeverket av den lette kjede omfatter donorrester i
minst en av posisjonene 1 og/eller 3 og 46 og/eller 47,
med den betingelse at det CDR-podede antistoff ikke binder
p55 Tac proteinet av IL-2 reseptoren
k a r a k t e r i s e r t v e d at det benyttes en
15 rekombinant genteknologisk fremgangsmåte

2 Fremgangsmåte som angitt i krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den tunge kjede
omfatter donorrester i posisjonene 23, 24, 49, 71, 73 og 78
20 eller i posisjonene 23, 24 og 49

3 Fremgangsmåte som angitt i krav 1 og 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den lette kjede
omfatter donorrester i posisjonene 46 og 47
25

4 Fremgangsmåte som angitt i ett eller flere av de
foregående krav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at rammeverket av den
lette kjede omfatter donorrester i minst en av posisjonene
30 46, 48, 58 og 71

5 Fremgangsmåte som angitt i krav 4,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den lette kjede
omfatter donorrester i posisjonene 46, 48, 58 og 71
35

6 Fremgangsmåte som angitt i ett eller flere av de
foregående krav,

k a r a k t e r i s e r t v e d at antistoffmolekylet
omfatter minst en CDR-podet tung kjede og minst en CDR-podet
lett kjede

5 7 Fremgangsmåte som angitt i ett eller flere av de
foregående krav,

k a r a k t e r i s e r t v e d at antistoffmolekylet
omfatter humane akseptorrester og ikke-humane donorrester

10 8 DNA-molekyl,

k a r a k t e r i s e r t v e d at en DNA-sekvens som
koder for antistoffmolekylet fremstilt ifølge ett eller flere
av kravene 1 - 7 er i kombinasjon med translasjons-,
transkripsjons- og reguleringssekvenser

15

9 Klonings- eller ekspresjonsvektor,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den inneholder DNA-
sekvensen som angitt i krav 8

20 10 Vertscelle,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den er transformert
med et DNA-molekyl som angitt i krav 8, og som er i stand til
å uttrykke DNA-sekvensen

1 GAATTCCCAA AGACAAAatg gattttcaag tgcagatttt cagcttctctg
 51 ctaatacagtg cctcagtcac aatatccaga ggacaaattg ttctcaccca
 101 gtctccagca atcatgtctg catctccagg ggagaaggct accatgacct
 151 gcagtgccag ctcaagtgt agttacatga actggtacca gcagaagtca
 201 ggcacctccc ccaaaagatg gatttatgac acatccaaac tggcttctgg
 251 agtccctgct cacttcaggg gcagtgggctc tgggacctct tactctctca
 301 caatcagcgg catggaggct gaagatgctg ccacttatta ctgccagcag
 351 tggagtagta acccattcac gttcggctcg gggacaaagt tggaaataaa
 401 cgggctgat actgcaccaa ctgtatccat ctccacca tccagtgagc
 451 agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac
 501 cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa
 551 tggcgtcctg aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca
 601 gcatgagcag caccctcacg ttgaccaagg acgagtatga acgacataac
 651 agctatacct gtgaggccac tcacaagaca tcaacttcac ccattgtcaa
 701 gagcttcaac aggaatgagt gtTAGAGACA AAGGTCCTGA GACGCCACCA
 751 CCAGCTCCCA GCTCCATCCT ATCTCCCTT CTAAGGTCTT GGAGGCTTCC
 801 CCACAAGCGC tTACCACTGT TGCGGTGCTC TAAACCTCCT CCCACCTCCT
 851 TCTCCTCCTC CTCCCTTCC TTGGCTTTTA TCATGCTAAT ATTTGCAGAA
 901 AATATTCAAT AAAGTGAGTC TTTGCCTTGA AAAAAAAAAA AAA

Fig 1(a)

1 MDFOVOIFSF LLISASVIIS RGOIVLTQSP AIMSASPGEK VTMTCSASSS
 51 VSYMNWYQOK SGTSPKRWIY DTSKLAGVVP AHFRGSGSGT SYSLTISGME
 101 AEDAATYYCQ QWSSNPFTFG SGTKLEINRA DTAPTVSIFP PSSEQLTSGG
 151 ASVVCFLNNF YPKDINVKWK IDGSERQNGV LNSWTDQDSK DSTYSMSSTL
 201 TLTKEYERH NSYTCEATHK TSTSPIVKSF NRNEC*

Fig 1(b)

1 GAATTCCCCT CTCCACAGAC ACTGAAAACCT CTGACTCAAC ATGGAAAGGC
 51 ACTGGATCTT TCTACTCCTG TTGTCAGTAA CTGCAGGTGT CCACTCCCAG
 101 GTCCAGCTGC AGCAGTCTGG GGCTGAACTG GCAAGACCTG GGGCCTCAGT
 151 GAAGATGTCC TGCAAGGCTT CTGGCTACAC CTTTACTAGG TACACGATGC
 201 ACTGGGTAAA ACAGAGGCCT GGACAGGGTC TGGAAATGGAT TGGATACATT
 251 AATCCTAGCC GTGGTTATAC TAATTACAAT CAGAAGTTCA AGGACAAGGC
 301 CACATTGACT ACAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCTACATG CAACTGAGCA
 351 GCCTGACATC TGAGGACTCT GCAGTCTATT ACTGTGCAAG ATATTATGAT
 401 GATCATTACT GCCTTGACTA CTGGGGCCAA GGCACCACTC TCACAGTCTC
 451 CTCAGCCAAA ACAACAGCCC CATCGGTCTA TCCACTGGCC CCTGTGTGTG
 501 GAGATACAAC TGGCTCCTCG GTGACTCTAG GATGCCTGGT CAAGGGTTAT
 551 TTCCCTGAGC CAGTGACCTT GACCTGGAAC TCTGGATCCC TGTCCAGTGG
 601 TGTGCACACC TTCCCAGCTG TCCTGCAGTC TGACCTCTAC ACCCTCAGCA
 651 GCTCAGTGAC TGTAACCTCG AGCACCTGGC CCAGCCAGTC CATCACCTGC
 701 AATGTGGCCC ACCCGGCAAG CAGCACCAAG GTGGACAAGA AAATTGAGCC
 751 CAGAGGGCCC ACAATCAAGC CCTGTCTCTC ATGCAAATGC CCAGCACCTA
 801 ACCTCTTGGG TGGACCATCC GTCTTCATCT TCCCTCCAAA GATCAAGGAT
 851 GTACTCATGA TCTCCCTGAG CCCCATAGTC ACATGTGTGG TGGTGGATGT
 901 GAGCGAGGAT GACCCAGATG TCCAGATCAG CTGGTTTGTG AACAACTGG
 951 AAGTACACAC AGCTCAGACA CAAACCCATA GAGAGGATTA CAACAGTACT
 1001 CTCCGGGTGG TCAGTGCCCT CCCCATCCAG CACCAGGACT GGATGAGTGG
 1051 CAAGGAGTTC AAATGCAAGG TCAACAACAA AGACCTCCCA GCGCCCATCG
 1101 AGAGAACCAT CTCAAAACCC AAAGGGTCAG TAAGAGCTCC ACAGGTATAT
 1151 GTCTTGCCCTC CACCAGAAGA AGAGATGACT AAGAAACAGG TCACTCTGAC
 1201 CTGCATGGTC ACAGACTTCA TGCCTGAAGA CATTTACGTG GAGTGGACCA
 1251 ACAACGGGAA AACAGAGCTA AACTACAAGA ACACTGAACC AGTCCTGGAC
 1301 TCTGATGGTT CTTACTTCAT GTACAGCAAG CTGAGAGTGG AAAAGAAGAA
 1351 CTGGGTGGAA AGAAATAGCT ACTCCTGTTC AGTGGTCCAC GAGGGTCTGC
 1401 ACAATCACCA CACGACTAAG AGCTTCTCCC GGACTCCGGG TAAATGAGCT
 1451 CAGCACCCAC AAAACTCTCA GGTCCAAAGA GACACCCACA CTCATCTCCA
 1501 TGCTTCCCTT GTATAAATAA AGCACCCAGC AATGCCTGGG ACCATGTAAA
 1551 AAAAAAAAAA AAAGGAATTC

Fig 2(a)

OKT3 Proteinsekvens av tung kjede utledet fra DNA-sekvens

1 MERHWIFLLL LSVTAGVHSQ VQLQQSGAEL ARPGASVKMS CKASGYTFTR
 51 YTMHWVKQRP GQGLEWIGYI NPSRGYTNYN QKFKDKATLT TDKSSSTAYM
 101 QLSSLTSEDS AVYYCARYYD DHYCLDYWGQ GTTLTVSSAK TTAPSVYPLA
 151 PVCGDTTGSS VTLGCLVKGY FPEPVTLTWN SGSLSSGVHT FPAVLQSDLY
 201 TLSSSVTVTS STWPSQSITC NVAHPASSTK VDKKIEPRGP TIKPCPPCKC
 251 PAPANLLGGPS VFIFPPKIKD VLMISLSPIV TCVVVDVSED DPDVQISWVW
 301 NNVEVHTAQT QTHREDYNST LRVVSALPIQ HQDWMSGKEF KCKVNNKDLP
 351 APIERTISKP KGSVRAPQVY VLPPPEEEMT KKQVTLTCMV TDFMPEDIYV
 401 EWTNNGKTEL NYKNTEPVL DSDGSYFMYSK LRVEKKNWVE RNSYSCSVVH
 451 EGLHNHHTTK SFSRTPGK*

Fig 2(b)

| | | | | | |
|----------|--|----------|-------|---|----|
| | 1 | | 23 | | 42 |
| | NN | N | N | N | N |
| RES TYPE | SBspSPESssBSbSsSssPSPSPsPSsse*s*p*P1`ISsSe | | | | |
| Okt3v1 | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASS.SVSYMNWYQQKSGT | | | | |
| REI | DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASQDIKYLWYQQTPGK | | | | |
| | ? ? | | | | |
| | CDR1 | (SLØYFE) | ***** | | |
| | CDR1 | (KABAT) | ***** | | |

| | | | | |
|----------|--|----|-----|----|
| | | 56 | | 85 |
| | N | NN | | |
| RES TYPE | *Is1PpIeesesssSBesePsPSBSEsPspPsseesSPePb | | | |
| Okt3v1 | SPKRWIYDTSKLAGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEAAAT | | | |
| REI | APKLLIYEASNLOAGVPSRFRSGSGSGTDYTYTISLQPEDIAAT | | | |
| | ? ?? | | ? ? | |
| | ***** CDR2(SLØYFE /KABAT) | | | |

| | | | |
|----------|--------------------------|---------------|-----|
| | | 102 | 108 |
| RES TYPE | P1PIPl es**1PIIsPPSPSPSS | | |
| Okt3v1 | YYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR | | |
| REIv1 | YYCQQYQSLPYTFGQGTKLQITR | | |
| | ? ? | | |
| | ***** | CDR3 (SLØYFE) | |
| | ***** | CRD3 (KABAT) | |

Fig 3

```

                NN N                23 26      32 35 N39  43
RES TYPE  SESPsSBssSsSSssSpSpSPsPSEbSBssBePiPiPiesss
Okt3h     QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQG
KOL       QVQLVESGGGYVQPGRSLRLSCSSGFIsFSSYAMYWVRQAPGK
                ?                ??

                                ***** CDR1 (SLØYFE)
                                ***** CDR1 (KABAT)

                52a      60 65      N N N      82abc      89
RES TYPE  IIeIpppssssssssspsspSSsbSpseSsSseSpspSpsSBssSsePs
Okt3vh    GLEWIGYINPSRGYTNTNQKFKDKATLTsTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAV
KOL       GLEWVAIIWDDGSDQHsYADSVKGRFTISRDNsSKNTLFLQMDSLRsPEDTG
                ??                ? ? ? ?                ?

                                ***** CDR2 (SLØYFE)
                                ***** CDR2 (KABAT)

                92 N                107      113
RES TYPE  PiPiEissss111sssb1b1*EIPiP*spSBSS
Okt3vh    YYCARYYDDHY                CLDYWGQGTTLTVSS
KOL       YFCARDGGHGFCSSASCsFGPDYWGQGTsTVTVSS
                ***** CRD3 (KABAT/SLØYFE)

```

Fig 4

CDR-poding av tung kjede av OKT3
 1. gh341 og derivater

| | 1 | 26 | 35 | 39 | 43 | |
|--------|---|----|----|----|----|-------|
| Okt3vh | QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKORPGQ | | | | | |
| gh341 | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSGYTFTRYTMHWVRQAPGK | | | | | JA178 |
| gh341A | QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK | | | | | JA185 |
| gh341E | QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK | | | | | JA198 |
| gh341* | QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK | | | | | JA207 |
| gh341* | QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK | | | | | JA209 |
| gh341D | QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK | | | | | JA197 |
| gh341* | QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK | | | | | JA199 |
| gh341C | QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK | | | | | JA184 |
| gh341* | QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCSASGYTFTRYTMHWVRQAPGK | | | | | JA203 |
| gh341* | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGYTFTRYTMHWVRQAPGK | | | | | JA205 |
| gh341B | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSGYTFTRYTMHWVRQAPGK | | | | | JA183 |
| gh341* | QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCSASGYTFTRYTMHWVRQAPGK | | | | | JA204 |
| gh341* | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGYTFTRYTMHWVRQAPGK | | | | | JA206 |
| gh341* | QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCSASGYTFTRYTMHWVRQAPGK | | | | | JA208 |
| KOL | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFIFSSYAMYWVRQAPGK | | | | | |

Fig 5(i)

| | 44 | 50 | 65 | 83 |
|--------|---|----|----|----|
| Okt3vh | GLEWIGYINPSRGYTNYNOKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLT | | | |
| gH341 | GLEWVAYINPSRGYTNYNOKFKDRFTISRDN SKNTLFLQMDSL R JA178 | | | |
| gH341A | GLEWIGYINPSRGYTNYNOKVKDRFTISTDKSKSTAF LQMDSL R JA185 | | | |
| gH341E | GLEWIGYINPSRGYTNYNOKVKDRFTISTDKSKSTAF LQMDSL R JA198 | | | |
| gH341* | GLEWIGYINPSRGYTNYNOKVKDRFTISTDKSKNTAF LQMDSL R JA207 | | | |
| gH341* | GLEWIGYINPSRGYTNYNOKVKDRFTISRDN SKNTAF LQMDSL R JA209 | | | |
| gH341D | GLEWIGYINPSRGYTNYNOKVKDRFTISTDKSKNTLFLQMDSL R JA197 | | | |
| gH341* | GLEWIGYINPSRGYTNYNOKVKDRFTISRDN SKNTLFLQMDSL R JA199 | | | |
| gH341C | GLEWVAYINPSRGYTNYNOKFKDRFTISRDN SKNTLFLQMDSL R JA184 | | | |
| gH341* | GLEWIGYINPSRGYTNYNOKVKDRFTISTDKSKSTAF LQMDSL R JA207 | | | |
| gH341* | GLEWIGYINPSRGYTNYNOKVKDRFTISTDKSKSTAF LQMDSL R JA205 | | | |
| gH341B | GLEWIGYINPSRGYTNYNOKVKDRFTISTDKSKSTAF LQMDSL R JA183 | | | |
| gH341* | GLEWIGYINPSRGYTNYNOKVKDRFTISTDKSKSTAF LQMDSL R JA204 | | | |
| gH341* | GLEWIGYINPSRGYTNYNOKVKDRFTISTDKSKSTAF LQMDSL R JA206 | | | |
| gH341* | GLEWIGYINPSRGYTNYNOKVKDRFTISTDKSKNTAF LQMDSL R JA208 | | | |
| KOL | GLEWVAIIWDDGSDQHYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMDSL R | | | |

Fig 5(ii)

| | 84 | 95 | 102 | 113 | |
|--------|-------------------------|----|-----|-------------------|-------|
| Okt3vh | SEDSAVYYCARYYDDHY..... | | | CLDYWGQGTTLTVSS | |
| gH341 | PEDTGVYFCARYYDDHY . . . | | | CLDYWGQGTTLTVSS | JA178 |
| gH341A | PEDTAVYYCARYYDDHY . . . | | | CLDYWGQGTTLTVSS | JA185 |
| gH341E | PEDTGVYFCARYYDDHY . . . | | | CLDYWGQGTTLTVSS | JA198 |
| gH341* | PEDTGVYFCARYYDDHY . . . | | | CLDYWGQGTTLTVSS | JA207 |
| gH341D | PEDTGVYFCARYYDDHY . . . | | | CLDYWGQGTTLTVSS | JA197 |
| gH341* | PEDTGVYFCARYYDDHY . . . | | | CLDYWGQGTTLTVSS | JA209 |
| gH341* | PEDTGVYFCARYYDDHY . . . | | | CLDYWGQGTTLTVSS | JA199 |
| gH341C | PEDTGVYFCARYYDDHY . . . | | | CLDYWGQGTTLTVSS | JA184 |
| gH341* | PEDTAVYYCARYYDDHY . . . | | | CLDYWGQGTTLTVSS | JA203 |
| gH341* | PEDTAVYYCARYYDDHY . . . | | | CLDYWGQGTTLTVSS | JA205 |
| gH341B | PEDTAVYYCARYYDDHY . . . | | | CLDYWGQGTTLTVSS | JA183 |
| gH341* | PEDTGVYFCARYYDDHY . . . | | | CLDYWGQGTTLTVSS | JA204 |
| gH341* | PEDTGVYFCARYYDDHY . . . | | | CLDYWGQGTTLTVSS | JA206 |
| gH341* | PEDTGVYFCARYYDDHY . . . | | | CLDYWGQGTTLTVSS | JA208 |
| KOL | PEDTGVYFCARDGGHGFSSASC | | | FGPDYWGQGTPTVTVSS | |

Fig 5 (iii)

CDR-poding av lett kjede av OKT3

1. gL221 og derivater

| | 1 | 24 | 34 | 42 |
|--------|-------------------------------------|-----------------------|----|-----|
| Okt3v1 | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASS. | SVSYMNWYQQKSGT | | |
| gL221 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASS. | <u>SVSYMNWYQQTPGK</u> | | |
| gL221A | <u>QIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASS</u> | <u>SVSYMNWYQQTPGK</u> | | |
| gL221B | <u>QIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASS.</u> | <u>SVSYMNWYQQTPGK</u> | | |
| gL221C | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASS | <u>SVSYMNWYQQTPGK</u> | | |
| REI | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDI | IKYLNWYQQTPGK | | |
| | 43 | 50 | 56 | 85 |
| Okt3v1 | SPKRWIYDTSKLAGVPAHFRGSGSGT | SYSLTISGMEAEDAAT | | |
| gL221 | APKLLIYDTSKLAGVPSRFSGSGSGT | DYFTFISSLQPEDIAT | | |
| gL221A | APKRWIYDTSKLAGVPSRFSGSGSGT | DYFTFISSLQPEDIAT | | |
| gL221B | APKRWIYDTSKLAGVPSRFSGSGSGT | DYFTFISSLQPEDIAT | | |
| gL221C | APKRWIYDTSKLAGVPSRFSGSGSGT | DYFTFISSLQPEDIAT | | |
| REI | APKLLIYEASNQAGVPSRFSGSGSGT | DYFTFISSLQPEDIAT | | |
| | 86 | 91 | 96 | 108 |
| Okt3v1 | YYCQWSSNPFTFGSGTKLEINR | | | |
| gL221 | <u>YYCQWSSNPFTFGQGTKLQITR</u> | | | |
| gL221A | <u>YYCQWSSNPFTFGQGTKLQITR</u> | | | |
| gL221B | <u>YYCQWSSNPFTFGQGTKLQITR</u> | | | |
| gL221C | <u>YYCQWSSNPFTFGQGTKLQITR</u> | | | |
| REI | YYCQYQSLPYTFGQGTKLQITR | | | |

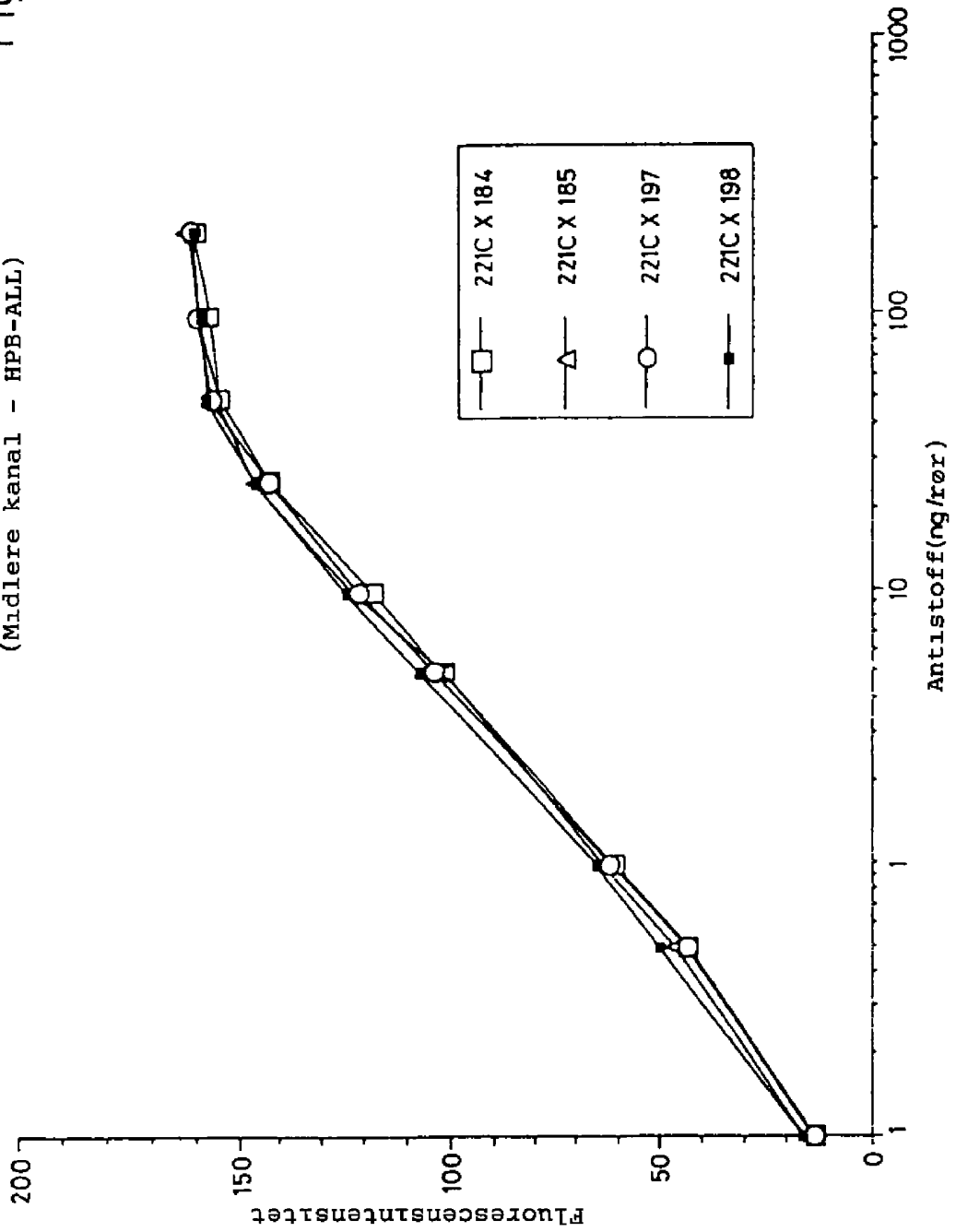
CDR'er er understreket

Strukturrester inkludert i genet er dobbelt understreket

Fig 6

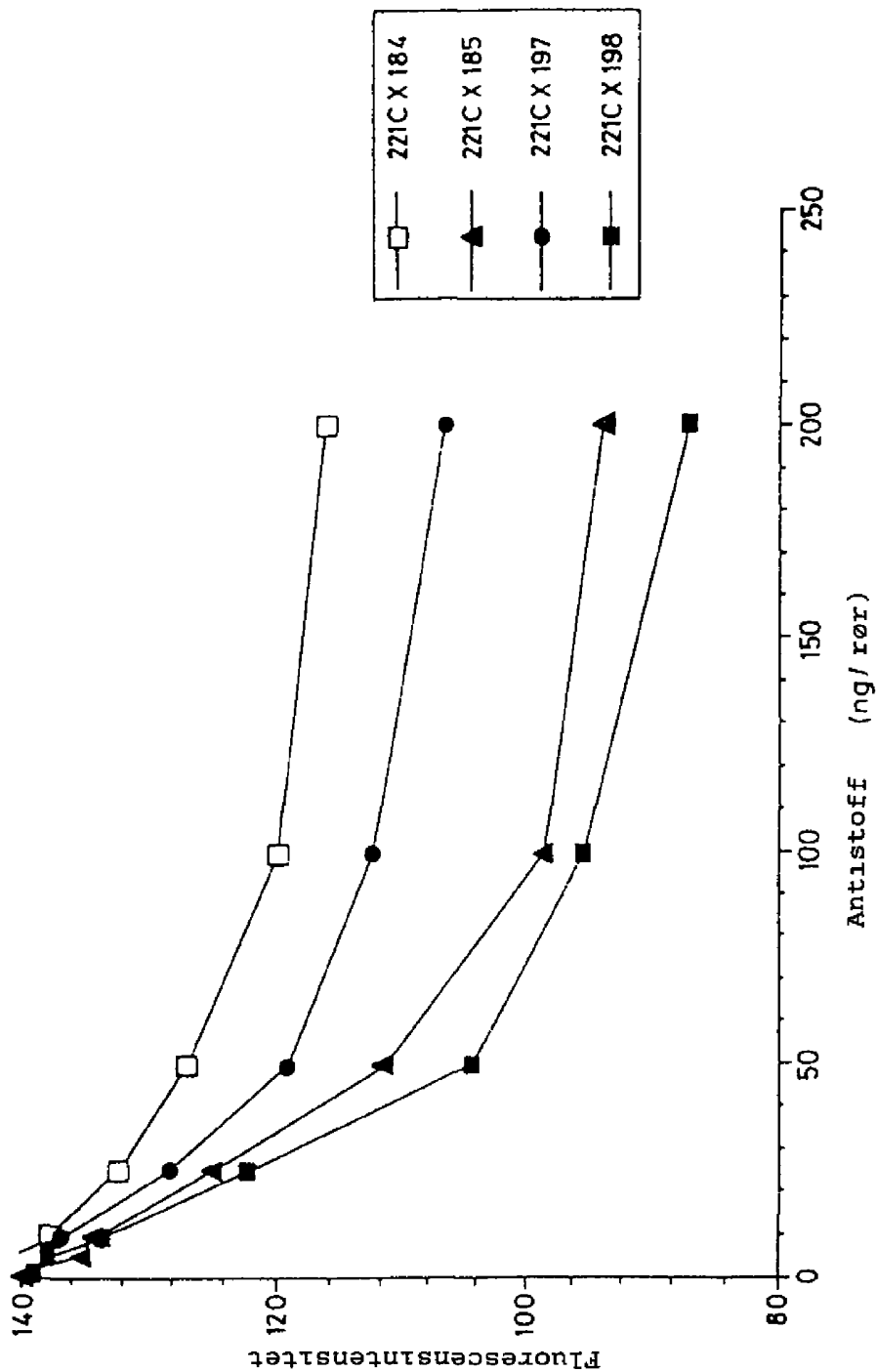
OKT3 - pJA198 evaluering
Bindingsforsøk
(Midlere kanal - HPB-ALL)

Fig 7



OKT3 - pJA198 evaluering
Blokkeringsforsøk
(Midlere kanal -HPB-ALL)

Fig 8



Blokkeringsforøk
(Midlere kanal - HPB-ALL)

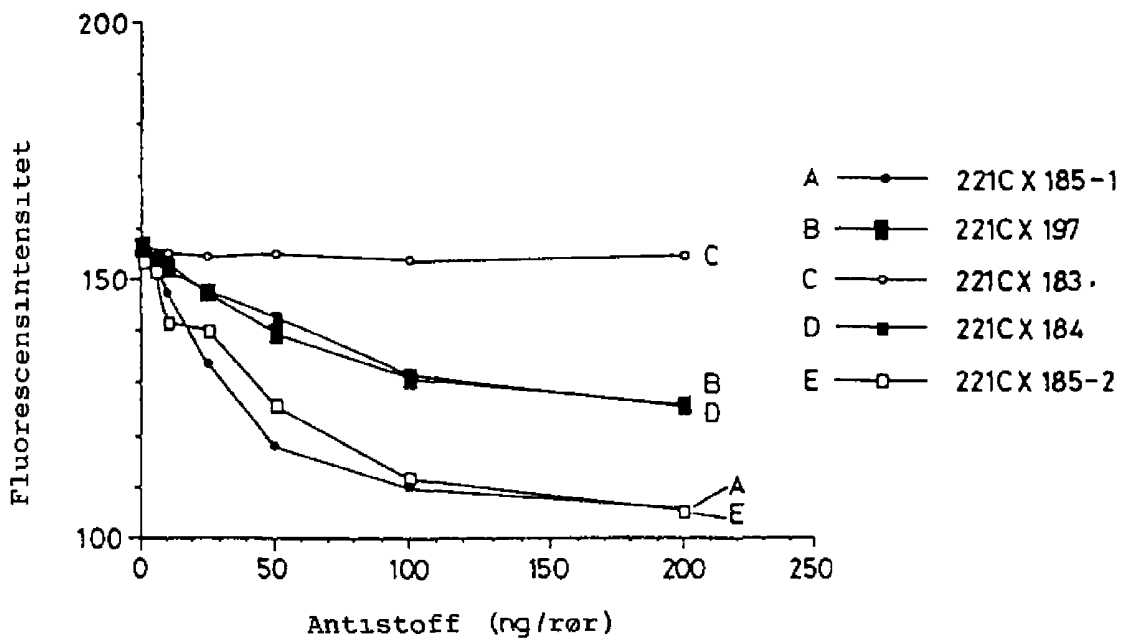
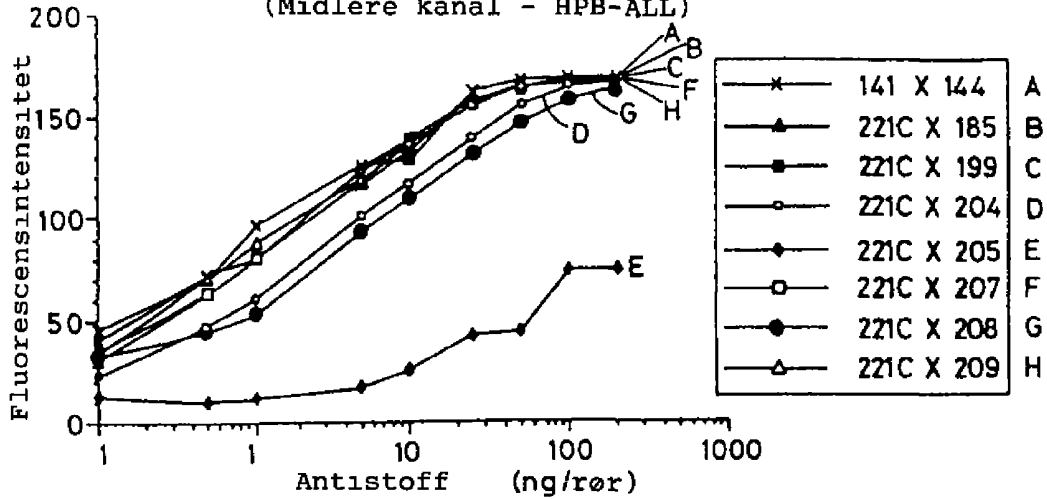


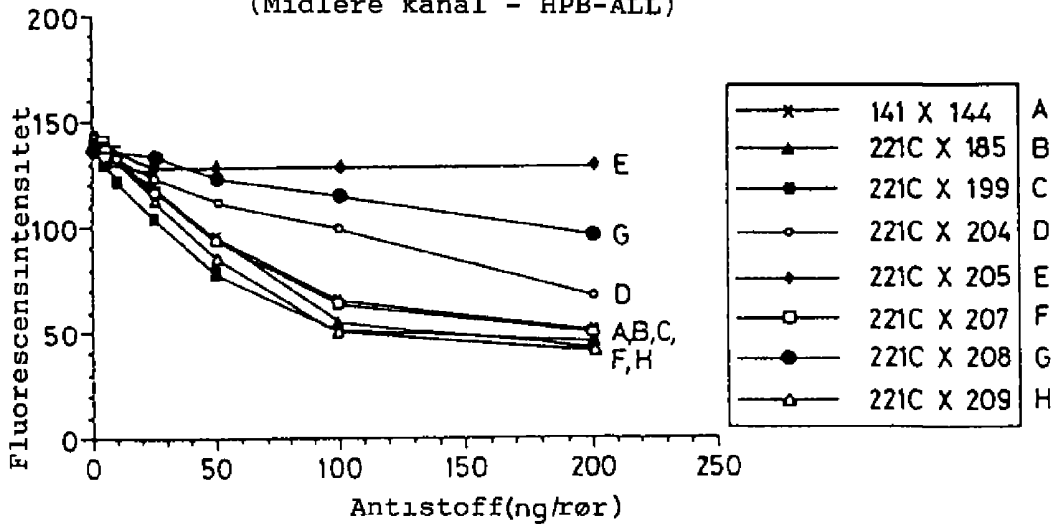
Fig 9

Fig 10

OKT3 - podede tunge kjeder
 Bindingsforsøk
 (Midlere kanal - HPB-ALL)



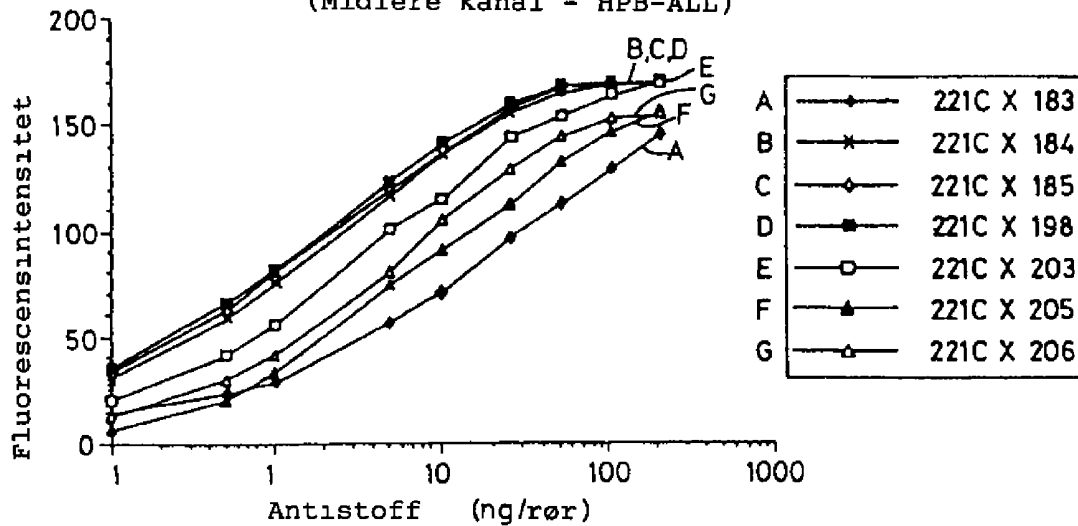
OKT3 - podede tunge kjeder
 Blokkeringsforsøk
 (Midlere kanal - HPB-ALL)



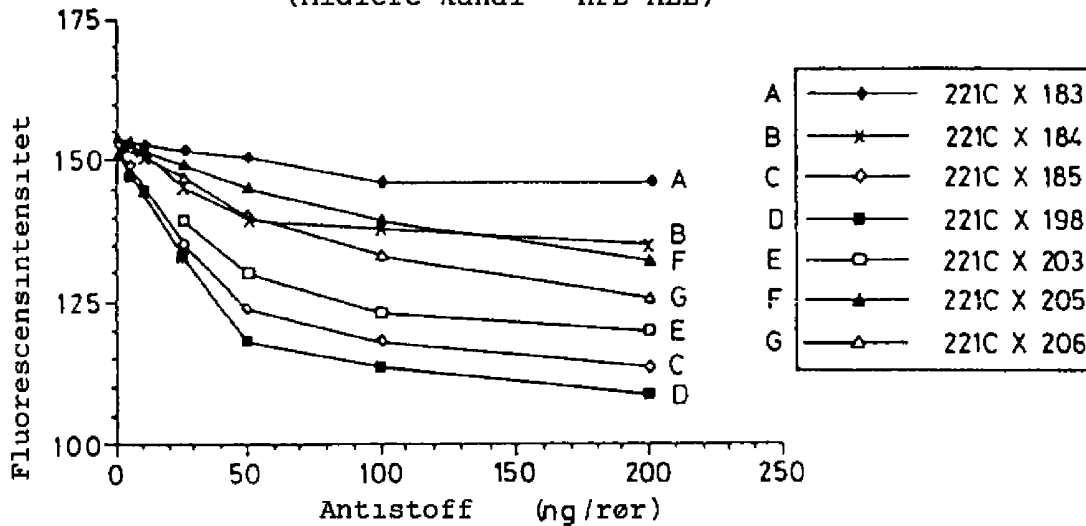
| | | |
|-----|-----------|---|
| —◆— | (205) | —, —, —, 24, 48, 49, 71, 73, 76, 78, 88, 91, |
| —●— | (208) | 6, —, —, 24, 48, 49, 71, 73, —, —, 78, —, —, —, |
| —○— | (204) | 6, —, —, 24, 48, 49, 71, 73, 76, 78, —, —, —, |
| —■— | (199) | 6, 23, 24, 48, 49, —, —, —, —, —, —, —, —, |
| —□— | (207) | 6, 23, 24, 48, 49, 71, 73, —, —, 78, —, —, —, |
| —▲— | (185) | 6, 23, 24, 48, 49, 71, 73, 76, 78, 88, 91, |
| —◇— | (209) | 6, 23, 24, 48, 49, —, —, —, —, —, 78, —, —, —, |
| —×— | 141 X 144 | |

Fig 11

OKT3 - podede tunge kjeder
 Bindingsforsøk
 (Midlere kanal - HPB-ALL)



OKT3 - podede tunge kjeder
 Blokkeringsforsøk
 (Midlere kanal - HPB-ALL)



| | | |
|-----|-------|-------------------------------------|
| —◆— | (183) |,48,49,71,73,76,78,88,91, |
| —▲— | (205) |,24,48,49,71,73,76,78,88,91, |
| —×— | (184) | 6.23,24,.....,.....,....., |
| —△— | (206) |,24,48,49,71,73,76,78,....., |
| —□— | (203) | 6,.....,24,48,49,71,73,76,78,88,91, |
| —◇— | (185) | 6.23,24,48,49,71,73,76,78,88,91, |
| —■— | (198) | 6.23,24,48,49,71,73,76,78,....., |

OKT3 Konkurransse
 Murin ref. standard mot CDR-podet OKT3

Fig 12

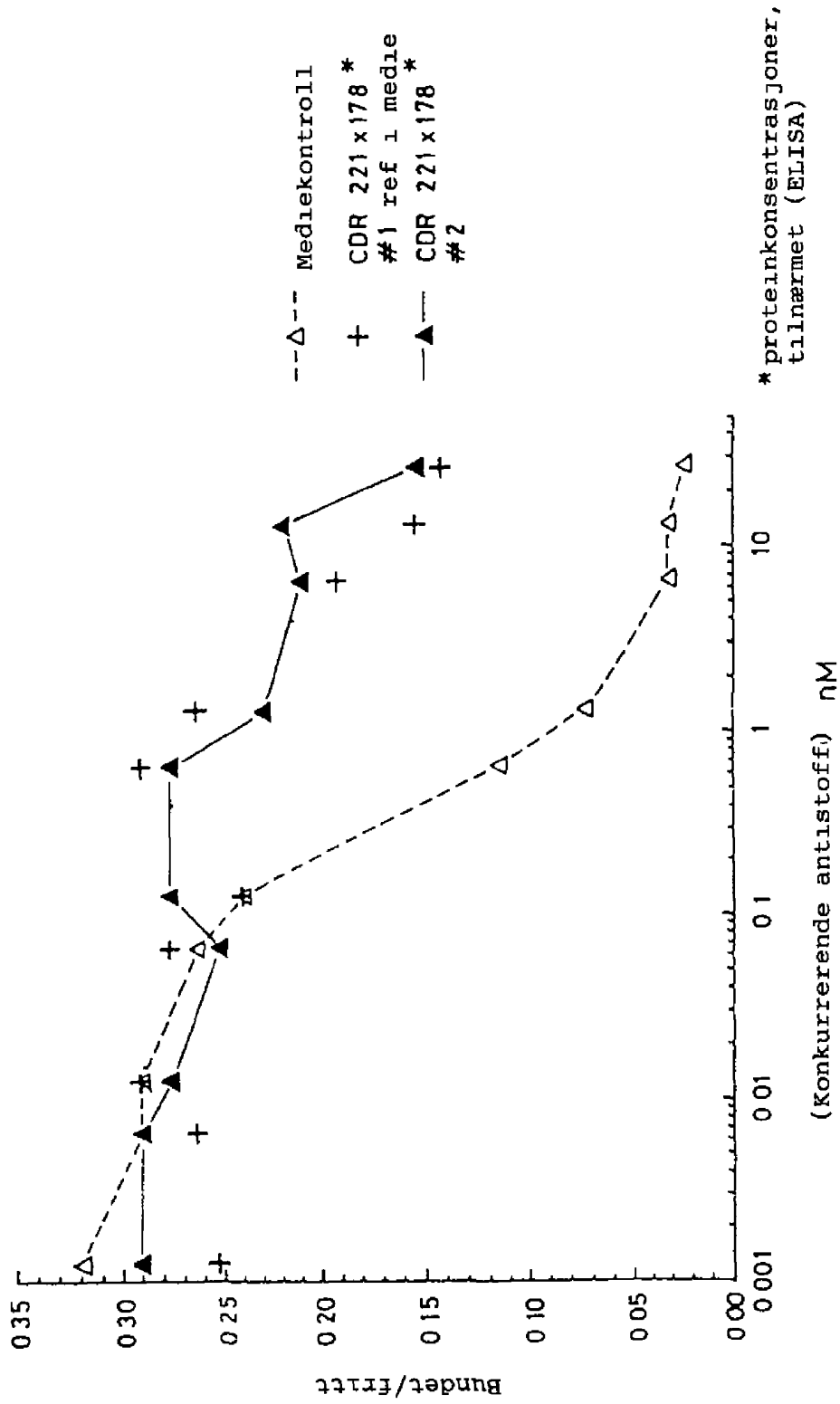


Fig 13

OKT Konkurransse
Murin Ref standard mot CDR-podet OKT3

