



(12) PATENT

(19) NO

(11) 328554

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 16/28 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61P 17/00 (2006.01)  
A61P 29/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61P 37/00 (2006.01)  
C12N 15/09 (2006.01)

### Patentstyret

---

(21)	Søknadsnr	19975598	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1996.06.06 PCT/US96/10053
(22)	Inng.dag	1997.12.03	(85)	Videreføringsdag	1997.12.03
(24)	Løpedag	1996.06.06	(30)	Prioritet	1995.06.07, US, 487550
(41)	Alm.tilgj	1998.02.09			
(45)	Meddelt	2010.03.22			
(73)	Innehaver	Biogen Idec Inc, 14 Cambridge Center, US-MA02142 CAMBRIDGE, USA			
(72)	Oppfinner	Nabil Hanna, 3255 Fortuna Ranch Road, US-CA92024 OLIVENHAIN, USA Darrell R Anderson, 1851 Navato Place, US-CA92029 ESCONDIDO, USA Peter Brams, San Diego, CA, US-, USA Willaim S. Shestowsky, San Diego, CA, US-, USA			
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua, 0306 OSLO, Norge			

---

(54)	Benevnelse	<b>Monoklonale ape-antistoffer som er spesifikke for primatiserte humane B7.1- og/eller B7.2-former, samt anvendelse derav og farmasøytiske sammensetninger omfattende slike</b>
(56)	Anførte publikasjoner	INABA, K. et al., The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: Abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro, J. Exp. Med., November 1994, Vol. 180, side 1849-1860, HATHCOCK, K.S., et al., Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands expression and function, J. Exp. Med., august 1994, Vol. 180, side 631-640., KUCHROO, V.K., et al., B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 development pathways: Application to autoimmune disease therapy, Cell, mars 1995, Vol. 80, side 707-718, LENSCHOW, D. J., et al., Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse, J Exp. Med, mars 1995, Vol 181, side 1145-1155., NEWMAN, R., et al., "Primatization" of recombinant antibodies for immunotherapy of human diseases: a macaque/human chimeric antibody against human CD4, Biotechnology, november 1992, Vol. 10, side 1455-1460.
(57)	Sammendrag	

Foreliggende oppfinnelse vedrører identifikasjonen av javaape-antistoffer mot humant B7.1 og B7.2 ved å si le fag-fremvisningssamlinger eller ape-heterohybridomaer som erholdes med B-lymfocytter fra B7.1- og/eller B7.2- immuniserte aper. Nærmere bestemt frembringer oppfinnelsen fire monoklonale ape-antistoffer, nemlig 7B6, 16C10, 7C10 og 20C9, som hemmer B7:CD28-banen og dermed virker som immunosuppressiva. Oppfinnelsen frembringer dessuten den fullstendige DNA- og aminosyresekvens for den lette og tunge kjede av tre primatiserte antistoffer som er avledet fra disse monoklonale ape-antistoffer som binder B7.1 og muligens B7.2, nemlig primatisert 7C10, primatisert 7B6 og primatisert 16C10. Disse ape-antistoffer og primatiserte antistoffer kan brukes som spesifikke immunosuppressiva, f.eks. ved behandling av autoimmune sykdommer og ved forebygging av utstøtningen av transplanterte organer.

Foreliggende oppfinnelse vedrører monoklonalt ape-antistoff, en primatisert form derav eller et fragment av det monoklonale ape-antistoffet og som har de særtrekk som er angitt i krav 1. Slike ape-antistoffer kan være  
5 javaapeantistoffer mot humant B7, dvs. humant B7.1 og humant B7.2, og som fremstilles ved utvelgelse fra fagfremvisningssamlinger og apeheterohybridomaer ved bruk av B-lymfocytter som erholdes fra B7-immuniserte aper.

Oppfinnelsen vedrører dessuten spesifikke primatiserte antistoffer av den type som er forklart ovenfor og som bindes  
10 til humant B7, dvs. humant B7.1 og B7.2 og deres tilsvarende aminosyre- og nukleinsyresekvenser.

Foreliggende oppfinnelse vedrører dessuten farmasøytiske blandinger som inneholder slike monoklonale ape-antistoffer eller primatiserte antistoffer som er spesifikke for humant  
15 B7.1 og/eller humant B7.2, og deres bruk til fremstilling av immunosuppressive midler som modulerer B7:CD28-banen, f.eks. til behandling av autoimmune forstyrrelser og forebygging av organutstøtning.

20

#### BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

Man har lenge vært oppmerksom på det kliniske grensesnitt mellom immunologi, hematologi og onkologi. Mange tilstander som behandles av hematologer eller onkologer, har en enten autoimmun eller immunosviktkomponent i sin patofysiologi,  
25 og dette har ført til en omfattende bruk av immunosuppressive legemidler av hematologer, mens onkologer har søkt etter immunologiske hjelpestoffer som kan bedre den endogene immunitet mot svulster. Inntil i dag har disse inngrep generelt bestått av ikke-spesifikke former for immuno-  
30 suppresjon og immunstimulering. I tillegg til at denne type inngrep har en begrenset virkning, har også deres toksisitet i tillegg til deres ikke-spesifisitet, begrenset deres fremgang. Derfor har man søkt etter alternative strategier.

En utredning av den funksjonelle rolle av et raskt stigende antall celleoverflatemolekyler har bidratt sterkt til integrasjonen av immunologien i den kliniske hematologi og onkologi. Nærmere 200 celleoverflateantigener er blitt identifisert på celler av immunsystemet og det hematopoetiske system (Schlossman, S.F.; Boumsell, L.; Gilks, J.M.; Harlan, T.; Kishimoto, C.; Morimoto, C.; Ritz, J.; Shaw, S.; Silverstein, R.L.; Springer, T.A.; Tedder, T.F.; Todd, R.F.: CD antigens (1993), Blood 83: 879, 1994).

Disse antigener representerer både molekyler med begrenset avstamning og mer vidt spredte molekyler som er innblandet i diverse prosesser, bl.a. cellegjenkjenning, adhesjon, induksjon og vedlikehold av proliferasjon, cytokinutsondring, effektorfunksjon og t.o.m. celledød.

Forståelsen for de funksjonelle attributter for disse molekyler har ført til nye forsøk på å manipulere immunresponsen. Selv om molekyler som er innblandet i den cellulære adhesjon og antigenspesifikke gjenkjenning, tidligere er blitt vurdert som målmolekyler for terapeutiske immunologiske inngrep, har oppmerksomheten i den senere tid vært fokusert på en undergruppe av celleflatemolekyler som benevnes ko-stimulatoriske molekyler (Bretscher, P.: "The two-signal model of lymphocyte activation twenty-one years later", Immunol. Today 13: 73 (1992); Jenkins, M.K.; Johnson, J.G.: "Molecules involved in T-cell co-stimulation", Curr. Opin. Immunol., 5: 351, 1993; Gepfert, T.; Davis, L.; Gur, H.; Wacholtz, M.; Lipsky, P.: "Accessory cell signals involved in T-cell activation", Immunol. Rev., 117: 5 (1990); Weaver, C.T.; Unanue, E.R.: "The co-stimulatory function of antigen-presenting cells", Immunol. Today 11: 49 (1990); Stennam, R.M., Young, J.W.: "Signals arising from antigen-presenting cells", Curr. Opin. Immunol. 3: 361 (1991)). Kostimulatoriske molekyler utløser ikke, men muliggjør heller en generering og amplifikasjon av antigenspesifikke T-celleresponser og effektorfunksjoner (Bretscher, P.: "The two-signal model of lymphocyte activation twenty-one years later", Immunol. Today 13: 73 (1992); Jenkins, M.K.; Johnson, J.G.: "Molecules in-

involved in T-cell co-stimulation", Curr. Opin. Immunol. 5: 351 (1993); Geppert, T.; Davis, L.; Gur H.; Wacholtz, M.; Lipsky, P.: "Accessory cell signals involved in T-cell activation", Immunol. Rev. 117: 5 (1990); Weaver, C.T.; Unanue, E.R.: "The co-stimulatory function of antigen-presenting cells", Immunol. Today 11: 49 (1990); Stennam, R.M.; Young, J.W.: "Signals arising from antigen-presenting cells", Curr. Opin. Immunol. 3: 361 (1991); June, C.H.; Bluestone, J.A., Linsley, P.S., Thompson, C.D.: "Role of the CD28 receptor in T-cell activation", Immunol. Today 15: 321 (1994)).

Forskjellige forskningsgrupper har nylig undersøkt en bestemt kostimulatorisk bane som benevnes B7:CD28, fordi denne spiller en vesentlig rolle ved B- og T-celleaktivering (June, C.H.; Bluestone, J.A.; Linsley, P.S.; Thompson, C.D.: "Role of the CD28 receptor in T-cell activation", Immunol. Today 15: 321 (1994); June, C.H.; Ledbetter, J.A.: "The role of the CD28 receptor during T-cell responses to antigen", Annu. Rev. Immunol. 11: 191 (1993); Schwartz, R.H.: "Co-stimulation of T lymphocytes: The role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy", Cell 71: 1065 (1992)). Etter at denne ligand:receptor-bane ble oppdaget for fire år siden, har det nå samlet seg opp mange tegn som tyder på at B7:CD28-vekselspill representerer en av de kritiske punkter for opptreden av immunreaktivitet vs. anergi (June, C.H.; Bluestone, J.A.; Linsley, P.S.; Thompson, C.D.: "Role of the CD28 receptor during T-cell activation", Immunol. Today, 15:321 (1994); June, C.H.; Ledbetter, J.A.: "The role of the CD28 receptor during T-cell responses to antigen", Annu. Rev. Immunol. 11: 191 (1993); Schwartz, R.H.: "Co-stimulation of T lymphocytes: The role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy", Cell 71: 1065 (1992); Cohen, J.: "Mounting a targeted strike on unwanted immune responses", (news; comment). Science 257: 751 (1992); Cohen, J.: "New protein steals the show as 'co-stimulator' of T cells", (news; comment). Science 262: 844 (1993)).

Spesielt er det beskrevet at humane B7-antigener, dvs. humant B7.1 og B7.2, spiller en kostimulatorisk rolle ved T-celleaktivering.

1. Den kostimulatoriske rolle av B7.1 og B7.2 ved T-celleaktivering

Utarbeidelsen av en fremgangsrik immunrespons er avhengig av en rekke bestemte vekselvirkninger mellom en T-celle og en antigenpresenterende celle. Selv om det vesentlige første trinn i denne prosess er avhengig av at antigenet bindes til T-cellereceptoren, er i sammenheng med MHC klasse II-molekylet (Lane, P.J.L.; F.M. McConnell, G.L. Schieven, E.A. Clark og J.A. Ledbetter (1990): "The Role of Class II Molecules in Human B Cell Activation", The Journal of Immunology 144: 3684-3692), denne vekselvirkning i og for seg ikke tilstrekkelig for å indusere alle hendelsene som er nødvendige for en vedvarende respons på et gitt antigen (Schwartz, R.H. (1990): "A Cell Culture Model for T Lymphocyte Clonal Anergy", Science, 248: 1349; Jenkins, M.K. (1992): "The Role of Cell Division in the Induction of Clonal Anergy", Immunology Today, 13: 69; Azuma, M.; M. Catabyab, D. Buck, J.H. Phillips og L.L. Lanier (1992): "Involvement of CD28 in MHC-unrestricted Cytotoxicity Mediated by a Human Natural Killer Leukemia Cell Line", The Journal of Immunology, 149: 1556-1561; Azuma, M.; M. Catabyab, D. Buck, J.H. Phillips og L.L. Lanier (1992): "CD28 Interaction with B7 Costimulates Primary Allogeneic Proliferative Responses and Cytotoxicity Mediated by Small Resting T Lymphocytes", J. Exp. Med., 175: 353-360).

Innblandingen av visse andre kostimulatoriske molekyler er nødvendig (Norton, S.D.; L. Zuckerman, K.B. Urdahl, R. Shefner, J. Miller og M.K. Jenkins (1992): "The CD28 Ligand, B7, Enhances IL-2 Production by Providing A Costimulatory Signal to T Cells", The Journal of Immunology, 149: 1556-1561). Homodimerene CD28 og CTLA-4 som uttrykkes på T-celler (June, C.H.; J.A. Ledbetter, P.S. Linsley og C.B.

Thompson (1990): "Role of the CD28 Receptor in T-Cell Activation", Immunology Today, 11: 211-216; Linsley, P.S.; W. Brady, M. Urnes, L.S. Grosmaire, N.K. Damle og J.A. Ledbetter (1991): "CTLA-4 is a Second Receptor for the B Cell Activation Antigen B7", J. Exp. Med., 174: 561), sammen med B7.1 (CD80) og B7.2 (CD86) som uttrykkes på antigenpresenterende celler, er viktige kostimulatoriske molekyllpar som er nødvendige for en vedvarende immunrespons (Azuma, M.; H. Yssel, J.H. Phillips, H. Spits og L.L. Lanier (1993):

10 "Functional Expression of B7/BB1 on Activated T Lymphocytes", J. Exp. Med., 177: 845-850; Freeman, G.J.; A.S. Freedman, J.M. Segil, G. Lee, J.F. Whitman og L.M. Nadler (1989): "B7, A New Member of the Ig Superfamily with Unique Expression on Activated and Neoplastic B Cells", The Journal of Immunology, 143: 2714-2722; Hathcock, K.S.; G.

15 Laslo, H.B. Dickler, J. Bradshaw, P. Linsley og R.J. Hodes (1993): "Identification of an Alternative CTLA-4 Ligand Costimulatory for T Cell Activation", Science 262: 905-911; Hart, D.N.J.; G.C. Starling, V.L. Calder og N.S. Fernando

20 (1993): "B7/BB-1 is a Leucocyte Differentiation Antigen on Human Dendritic Cells Induced by Activation", Immunology 79: 616-620). Det kan vises *in vitro* at fraværet av disse kostimulatoriske signaler fører til en avbrutt T-celleaktiveringsbane og utvikling av en responsmangel på det spesifikke antigen, dvs. til anergi (jfr. f.eks. Harding, F.A.; J.G. McArthur, J.A. Gross, D.M. Raulet og J.P. Allison

25 (1992): "CD28 Mediated Signalling Co-stimulates Murine T Cells and Prevents Induction of Anergy in T Cell Clones", Nature, 356: 607-609; Gimmi, C.D.; G.J. Freeman, J.G. Gribben, G. Gray og L.M. Nadler (1993): "Human T-Cell Clonal Anergy is Induced by Antigen Presentation in the Absence of B7 Costimulation", Proc. Natl. Acad. Sci., 90: 6586-6590; Tan, P.; C. Anasefti, J.A. Hansen, J. Melrose, M. Brunvand, J. Bradshaw, J.A. Ledbetter og P.S. Linsley (1993): "Induction of Alloantigen-specific Hyporesponsiveness in Human T Lymphocytes by Blocking Interaction of CD28 with Its Natural Ligand B7/BB1", J. Exp. Med., 177: 165-173). Oppnåelsen av en *in vivo*-toleranse utgjør en mekanisme for immuno-

30

suppresjon og en levedyktig terapi for organtransplantatutstøtning og for behandling av autoimmune sykdommer. Dette er blitt oppnådd i eksperimentelle modeller etter administrering av CTLA4-Ig (Lenschow, D.J.; Y. Zeng, R.J. Thistlethwaite, A. Montag, W. Brady, M.G. Gibson, P.S. Linsley og J.A. Bluestone (1992): "Long-Term Survival of Xenogeneic Pancreatic Islet Grafts Induced by CTLA-4Ig", Science, 257: 789-795).

Molekylene B7.1 og B7.2 kan bindes til enten CD28 eller CTLA-4, selv om B7.1 bindes til CD28 med en Kd-verdi på 200 Nm, og til CTLA-4 med en 20 ganger høyere affinitet (Linsley, P.S.; E.A. Clark og J.A. Ledbetter (1990): "T-Cell Antigen CD28 Mediates Adhesion with B Cells by Interacting with Activation Antigen B7/BB-1", Proc. Natl. Acad. Sci., 87: 5031-5035; Linsley et al. (1993): "The Role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen", Annu. Rev. Immunol., 11: 191-192; Linesley et al. (1993): "CD28 Engagement by B7/BB-1 Induces Transient Down-Regulation of CD28 Synthesis and Prolonged Unresponsiveness to CD28 Signaling", The Journal of Immunology, 150: 3151-3169). B7.2 uttrykkes på aktiverte B-celler og på interferoninduserte monocytter, men ikke på hvilende B-celler (Freeman, G.J.; G.S. Gray, C.D. Gimmi, D.B. Lomarrd, L.-J. Zhou, M. White, J.D. Fingerroth, J.G. Gribben og L.M. Nadler (1991): "Structure, Expression and T Cell Costimulatory Activity of the Murine Homologue of the Human B Lymphocyte Activation Antigen B7", J. Exp. Med., 174: 625-631). B7.2 derimot, uttrykkes som en grunnbestanddel i meget lave mengder på hvilende monocytter, dendrittceller og B-celler, og dens ekspresjon er høyere på aktiverte T-celler, NK-celler og B-lymfocytter (Azuma, M.; D. Ito, H. Yagita, K. Okumura, J.H. Phillips, L.L. Lanier og C. Somoza (1993): "B70 Antigen is a Second Ligand for CTLA-4 and CD28", Nature, 366: 76-79). Selv om B7.1 og B7.2 kan uttrykkes på samme type celler, opptrer deres ekspresjon på B-celler med forskjellig kinetikk (Lenschow, D.J.; G.H. Su, L.A. Zuckerman, N. Nabavi, C.L. Jellis, G.S. Gray, J. Miller og J.A.

Bluestone (1993): "Expression and Functional Significance of an Additional Ligand for CTLA-4", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 11054-11058; Boussiotis, V.A.; G.J. Freeman, J.G. Gribben, J. Daley, G. Gray og L.M. Nadler (1993): "Activated Human B Lymphocytes Express Three CTLA-4 Counter-receptors that Co-stimulate T-cell Activation", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 11059-11063). Ytterligere analyser av RNA-nivåene har vist at B7.2-mRNA uttrykkes som en grunnbestanddel, mens B7.1-mRNA påvises 4 timer etter en aktivering, og de opprinnelig lave mengder B7.1-protein kan ikke påvises før 24 timer etter stimuleringen (Boussiotis, V.A.; G.J. Freeman, J.G. Gribben, J. Daley, G. Gray og L.M. Nadler (1993): "Activated Human B Lymphocytes Express Three CTLA-4 Counter-receptors that Co-stimulate T-Cell Activation", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 11059-11063). CTLA-4/CD28-receptormotstykker kan derfor uttrykkes ved forskjellige tidspunkter etter B-celleaktivering.

Den tidsmessig forskjellige ekspresjon av B7.1 og B7.2 tyder på at vekselvirkningen av disse to molekyler med CTLA-4 og/eller CD28 gir forskjellige, men beslektede, signaler til T-cellen (LaSalle, J.M.; P.J. Tolentino, G.J. Freeman, L.M. Nadler og D.A. Hafler (1992): "CD28 and T Cell Antigen Receptor Signal Transduction Coordinately Regulate Interleukin 2 Gene Expression In Response to Superantigen Stimulation", J. Exp. Med., 176: 177-186; Vandenberghe, P.; G.J. Freeman, L.M. Nadler, M.C. Fletcher, M. Kamoun, L.A. Turka, J.A. Ledbetter, C.B. Thompson og C.H. June (1992): "Antibody and B7/BB1-mediated Ligation of the CD28 Receptor Induces Tyrosine Phosphorylation in Human T Cells", The Journal of Experimental Medicine, 175: 951-960). De nøyaktige signaliseringsfunksjoner av CTLA-4 og CD28 på T-cellen er idag ukjent (Janeway, C.A., Jr.; og K. Bottomly (1994): "Signals and Signs for Lymphocyte Responses", Cell, 76: 275-285). Det er imidlertid mulig at et receptorsett gir utgangsstimuleringen for T-celleaktivering, mens det andre receptorsett gir et vedvarende signal for å tillate en ytterligere utvikling av banen og en klonal ekspansjon



(Linsley, P.S.; J.L. Greene, P. Tan, J. Bradshaw, J.A. Ledbetter, C. Anasetti og N.K. Damle (1992): "Coexpression and Functional Cooperation of CTLA-4 and CD28 on Activated T Lymphocytes", J. Exp. Med., 176: 1595-1604). Dagens viten  
 5 støtter hypotesen om to signaler som foreslås av Jenkins og Schwartz (Schwartz, R.H. (1990): "A Cell Culture Model for T Lymphocyte Clonal Anergy", Science, 248: 1349; Jenkins, M.K. (1992): "The Role of Cell Division in the Induction of Clonal Anergy", Immunology Today, 13: 69), som går ut på at  
 10 det er nødvendig med både et TCR-signal og et kostimulato- risk signal for å oppnå T-cellekspansjon, lymfokinutsond- ring og en fullstendig utvikling av effektorfunksjonen (Greenan, V.; og G. Kroemer (1993): "Multiple Ways to Cel- lular Immune Tolerance", Immunology Today, 14: 573). En  
 15 sviktende levering av det andre signal fører til at T-cel- lene blir ute av stand til å utsondre IL-2, og gjør cellen passiv mot antigenet.

Strukturelt inneholder både B7.1 og B7.2 ekstracellulære immunoglobulin-superfamilie V- og C-lignende domener, et  
 20 hydrofobt transmembranparti og en cytoplasmatisk hale (Freeman, G.J.; J.G. Gribben, V.A. Boussiotis, J.W. Ng, V. Restivo, Jr., L.A. Lombard, G.S. Gray og L.M. Nadler (1993): "Cloning of B7-2: A CTLA-4 Counter-receptor that Co-stimulates Human T Cell Proliferation", Science, 262:  
 25 909). Både B7.1 og B7.2 er sterkt glykosylert. B7.1 er et 44-54 kDa langt glykoprotein som består av en 223 amino- syrer lang ekstracellulær domene, en 23 aminosyrer lang transmembran domene og en 61 aminosyrer lang cytoplasmatisk hale. B7.1 inneholder 3 potensielle protein kinase-fosfory-  
 30 lasjonsstillinger (Azuma, M.; H. Yssel, J.H. Phillips, H. Spits og L.L. Lanier (1993): "Functional Expression of B7/BB1 on Activated T Lymphocytes", J. Exp. Med., 177: 845- 850). B7.2 er et 306 aminosyrer langt membran-glykoprotein. Det består av et 220 aminosyrer langt ekstracellulært  
 35 parti, en 23 aminosyrer lang hydrofob transmembran domene og en 60 aminosyrer lang cytoplasmatisk hale (Freeman, G.J.; A.S. Freedman, J.M. Segil, G. Lee, J.F. Whitman og

L.M. Nadler (1989): "B7, A New Member of the Ig Superfamily with Unique Expression on Activated and Neoplastic B Cells", The Journal of Immunology, 143: 2714-2722). Selv om både B7.1- og B7.2-genet finnes i det samme kromosomale parti (Freeman, G.J.; D.B. Lombard, C.D. Gimmi, S.A. Brod, L. Lee, J.C. Laning, D.A. Hafler, M.E. Dorf, G.S. Gray, H. Reiser, C.H. June, C.B. Thompson og L.M. Nadler (1992): "CTLA-4 and CD28 mRNA are Coexpressed on Most T Cells After Activation", The Journal of Immunology, 149: 3795-3801; Schwartz, R.H. (1992): "Costimulation of T Lymphocytes: The Role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1", i: Selvakumar, A.; B.K. Mohanraj, R.L. Eddy, T.B. Shows, P.C. White, C. Perrin og B. Dupont (1992): "Genomic Organization and Chromosomal Location of the Human Gene Encoding the B-Lymphocyte Activation Antigen B7", Immunogenetics, 36: 175-181), har disse antigener ingen høy homologigrad. Den samlede homologi mellom B7.1 og B7.2 er 26%, og mellom murint B7.1 og humant S7 er den 27% (Azuma, M.; H. Yssel, J.H. Phillips, H. Spits og L.L. Lanier (1993): "Functional Expression of B7/BB1 on Activated T Lymphocytes", J. Exp. Med., 177: 845-850; Freeman, G.J.; A.S. Freedman, J.M. Segil, G. Lee, J.F. Whitman og L.M. Nadler (1989): "B7, A New Member of the Ig Superfamily with Unique Expression on Activated and Neoplastic B Cells", The Journal of Immunology, 143: 2714-2722). Selv om en oppstilling av sekvensene for humant B7.1, humant B7.2 og murint B.1 viser noen få strekninger med en lengre homologi, er det kjent at alle tre molekyler bindes til humant CTLA-4 og CD28. Dermed finnes det sannsynligvis et felles, dvs. nært homologt, parti som deles av disse tre molekyler, og dette parti kan være enten sammenhengende eller konformasjonelt. Dette parti kan utgjøre bindingsstillingen av B7.1- og B7.2-molekylene til sine receptormotstykker. Antistoffer som dyrkes mot disse epitoper, kan kanskje hemme vekselspillet av B7 med receptormotstykket på T-cellen. Antistoffer som kryssreagerer med dette parti på både B7.1- og B7.2-molekyler, ville dessuten muligens ha praktiske fordeler

overfor antistoffene som er rettet mot enten B7.1 eller B7.2.

## 2. Blokkering av B7/CD28-vekselspillet

Blokkering av B7/CD28-vekselspillet gjør det mulig å indu-  
 5 sere en spesifikk immunosuppresjon, med en mulighet for å  
 generere vedvarende antigenspesifikke terapeutiske virknin-  
 ger. Antistoffer mot enten B7.1 eller B7.2 har vist seg å  
 blokkere T-celleaktivering, målt ifølge hemmingen av  
 IL-2-produksjonen *in vitro* (DeBoer, M.; P. Parren, J. Dove,  
 10 F. Ossendorp, G. van der Horst og J. Reeder (1992): "Func-  
 tional Characterization of a Novel Anti-B7 Monoclonal Anti-  
 body", Eur. Journal of Immunology, 22: 3071-3075; Azuma,  
 M.; H. Yssel, J.H. Phillips, H. Spits og L.L. Lanier  
 (1993): "Functional Expression of B7/BB1 on Activated T  
 15 Lymphocytes", J. Exp. Med., 177: 845-850). Imidlertid har  
 forskjellige antistoffer vist seg å ha forskjellige immuno-  
 suppressiv styrke, hvilket kan gjenspeile enten deres af-  
 finitet eller epitopspesifisitet. CTLA-4/Ig-fusjonsprotei-  
 net og anti-CD28-Fab'er har vist seg å ha lignende virknin-  
 20 ger på nedreguleringen av IL-2-produksjonen.

*In vivo*-administrering av et oppløselig CTLA-4/Ig-fusjons-  
 protein har vist seg å hemme T-celleavhengige antistoff-  
 responser i mus (Linsley, P.S.; J.L. Greene, P. Tan, J.  
 Bradshaw, J.A. Ledbetter, C. Anasetti og N.K. Damle (1992):  
 25 "Coexpression and Functional Cooperation of CTLA-4 and CD28  
 on Activated T Lymphocytes", J. Exp. Med., 176: 1595-1604;  
 Lin, H.; S.F. Builing, P.S. Linsley, R.O. Wei, C.D. Thomp-  
 son og L.A. Turka (1993): "Long-term Acceptance of Major  
 Histocompatibility Complex Mismatched Cardiac Allografts  
 30 Induced by CTLA-4-Ig Plus Donor Specific Transfusion", J.  
 Exp. Med., 178: 1801), og dessuten hadde større doser også  
 evnen til å hemme responsen på en andre immunisering, hvil-  
 ket demonstrerte troverdigheten av denne fremgangsmåte ved  
 behandling av antistoffmediert autoimmun sykdom. I tillegg  
 35 kunne CTLA-4/Ig forebygge utstøtningen av Langerhans øy-

celler i mus ved å direkte hemme vekselspillet mellom T-celler og B7.1/B7.2-antigenpresenterende celler (Lenschow, D.J.; G.H. Su, L.A. Zuckerman, N. Nabavi, C.L. Jellis, G.S. Gray, J. Miller og J.A. Bluestone (1993):

- 5 "Expression and Functional Significance of an Additional Ligand for CTLA-4", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 11054-11058). I dette tilfellet oppnådde man en langsiktig donorspesifikk toleranse.

10 3. Rekombinant fag-fremvisningsteknologi for valg av antistoff

Det er hittil ikke beskrevet noen monoklonale antistoffer som kryssreagerer med både B7.1 og B7.2. Som bemerket, ville slike antistoffer potensielt kunne være meget ønskelige som immunosuppressive midler. Fag-fremvisningsteknologien begynner å erstatte de tradisjonelle metoder ved isolasjon av antistoffer som genereres under immunresponsen, fordi det dermed er mulig å bedømme en meget høyere andel av immunutvalget enn hva som er mulig med de tradisjonelle metoder. Dette skyldes til dels en uvirksom PEG-fusjon, kromosomal instabilitet og den store mengde vevkulturer og siling som er forbundet med fremstillingen av heterohybridomer. Fag-fremvisningsteknologien avhenger derimot av molekylære teknikker for å potensielt fange inn hele utvalget av immunoglobulin-gener som er forbundet med responsen på et gitt antigen.

Denne teknikk beskrives av Barber et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 7978-7982 (1991). Kort sagt PCR-amplifiseres genene for immunoglobulinets tunge kjede, og klones inn i en vektor som inneholder genet som koder for det mindre belegningsprotein av den filamentøse fag M13, på en slik måte at det dannes et tung kjede-fusjonsprotein. Dette tung kjede-fusjonsprotein innlemmes i M13-fagpartiklen sammen med genene for den lette kjede idet den settes sammen. Hver rekombinante fag inneholder sammen med sitt genom, genene for et forskjellig antistoff-Fab-molekyl, som den fremviser

på sin flate. Innen disse samlinger kan over  $10^6$  forskjellige antistoffer kloneres og fremvises. Fagsamlingen strykes på antigenbestrøkte mikroliterbrønner, ikke-spesifikke fager vaskes bort, og de antigenbindende fager elueres. Genomet fra de antigenspesifikke kloner isoleres, og gen III skjæres ut, således at antistoffet kan uttrykkes i oppløselig Fab-form for ytterligere karakterisering. Så snart man har identifisert et enkelt Fab som en potensiell terapeutisk kandidat, kan dette lett omdannes til et fullstendig antistoff. Et tidligere beskrevet ekspresjonssystem for omdannelse av Fab-sekvenser til fullstendige antistoffer, er IDEC's pattedyr-ekspresjonsvektor NEOSPLA. Denne vektor inneholder genene for enten humant gamma 1- eller gamma 4-konstant parti. CHO-celler transfiseres med NEOSPLA-vektorene, og etter amplifikasjon er det blitt beskrevet at man med dette vektorsystem kan oppnå meget høye ekspresjonsnivåer ( $> 30$  pg/celle/dag).

#### 4. Primatiserte antistoffer

En annen meget effektiv måte å generere rekombinante antistoffer, beskrives av Newman (1992), Biotechnology, 10, 1455-1460. Nærmere bestemt fører denne teknikk til genereringen av primatiserte antistoffer som inneholder variable domener fra ape og humane konstante sekvenser.

Denne teknikk modifierer antistoffer således at de ikke utstøtes antigent etter å ha blitt administrert til mennesker. Denne teknikk er avhengig av en immunisering av synomolge aper med humane antigener eller receptorer. Denne teknikk ble utviklet for å danne høyaffinitets monoklonale antistoffer som er rettet mot humane celleflateantigener.

Antistoffer som genereres på denne måte, er tidligere blitt beskrevet å oppvise humane effektorfunksjoner, ha en ned-satt immunogenisitet og en lang halveringstid i serum. Denne teknologi støtter seg på at selv om synomolge aper fylogenetisk ligner på mennesker, gjenkjenner de fortsatt

mange humane proteiner som fremmedproteiner, og starter derfor en immunrespons. Fordi synomolge aper er fylogenetisk nært beslektet med mennesket, har antistoffene som genereres i disse aper, vist seg å ha en høy grads aminosyrehomologi med antistoffene som produseres i mennesker. Etter sekvensiering av javaapers gener for immunoglobulinets variable parti av lett og tung kjede, fant man at sekvensen av hver genfamilie var 85-98% homolog med sitt humane motstykke (Newman et al. (1992), Biotechnology, 10, 1455-1460). Det første antistoff som ble generert på denne måte, nemlig et anti-CD4-antistoff, var 91-92% homologt med konsenssekvensen for humane immunoglobulin-rammepartier (Newman et al. (1992), Biotechnology, 10, 1458-1460).

Monoklonale antistoffer som er spesifikke for humant B7-antigen, er beskrevet i litteraturen. F.eks. beskriver Weyl et al. Hum. Immunol., 31 (4), 271-276 (1991) epitopkartlegging av humane monoklonale antistoffer mot HLA-B-27 ved bruk av naturlige og muterte antigene varianter. Også Toubert et al., Clin. Exp. Immunol., 82 (1), 16-20 (1990) beskriver epitopkartlegging av et monoklonalt HLA-B27-antistoff, som også reagerer med et 35 kDa langt bakterielt ytre membranprotein. Valle et al., Immunol., 69 (4), 531-535 (1990) beskriver dessuten et monoklonalt antistoff fra underklassen IgG1, som gjenkjenner B7-antigenet når det uttrykkes i aktiverte B-celler og HTLV-1-transformerte T-celler. Toubert et al., J. Immunol., 141 (7), 2503-2509 (1988) beskriver videre en epitopkartlegging av HLA-B27- og HLA-B7-antigener ved bruk av intradomene-rekombinanter som ble konstruert ved å fremstille hybridgener mellom disse to alleler i *E. coli*.

Noen forskere har funnet at en høy ekspresjon av B7-antigener korrelerer med autoimmune sykdommer. F.eks. beskriver Ionesco-Tirgoviste et al., Med. Interre, 24 (1), 11-17 (1986), en økt B7-antigenekspresjon i insulinavhengig diabetes type 1. Dessuten er det blitt beskrevet en B7-antigenekspresjon på dermale dendrittceller som ble fjernet fra

psoriasis-pasienter (Nestle et al., J. Clin. Invest., 94 (1), 202-209 (1994)).

Videre beskrives det i litteraturen en hemming av anti-  
HLA-B7-alloreaktivt CTL ved bruk av affinitetsrenset opplø-  
5 selig HLA-B7 (Zavazava et al., Transplantation, 51 (4),  
838-842 (1991)). Anvendelsen av B7-receptors oppløselige  
ligand, CTLA-4-Ig, for å blokkere B7-aktiviteten (jfr.  
f.eks. Lenschow et al., Science, 257, 789, 7955 (1992)) i  
dyremodeller, og et B7-1-Ig-fusjonsprotein som har evnen  
10 til å hemme B7, er også blitt beskrevet.

Det er fra artikkelen Inaba et. al., 1994, J. Exp. Med.,  
Vol. 180, s. 1849-1860 kjent bruk av antistoffer mot B7-1  
og B7-2 hvor det beskrives bruk av anti-mus monoklonale  
antistoffer. Fra artiklene Hathcock et. al., 1994, J. Exp.  
15 Med., Vol. 180, s. 631-640; Kuchroo et. al., mars 1995,  
Cell, Vol. 80, s. 707-718 og Lenschow et. al., mars 1995,  
J. Exp. Med., Vol. 181, s. 1145-1155 er det også kjent  
virkningen av B7-molekylene i immunsystemet og den  
terapeutiske nytteverdien av å blokkere disse molekylene  
20 ved hjelp av antistoffer.

#### SAMMENFATNING OG FORMÅL FOR OPPFINNELSEN

Det er et formål for oppfinnelsen å fremstille og identifi-  
sere nye monoklonale javaape-antistoffer mot humant B7-  
antigen, nærmere bestemt mot humant B7.1-antigen og/eller  
25 humant B7.2-antigen, av den type som er angitt i krav 1  
eller krav 2.

Slike antistoffer kan isoleres, ved å undersøke fag-  
fremvisningssamlinger og/eller ape-heterohybridomaer ved  
bruk av B-lymfocytter som erholdes fra aper som er blitt  
30 immunisert med humant B7-antigen, dvs. humant B7.1- eller  
B7.2-antigen.

Slike antistoffer kan også hemme B7/CD86-banen og en B7-stimulering av aktiverte T-celler, hvorved de hemmer IL-2-produksjonen og T-celleproliferasjonen, og dermed virker som effektive immunosuppressiva.

- 5 De aktuelle antistoffene kan også hemme antigendrevne responser i donor-miltcellekulturer, f.eks. antigenspesifikke IgG-responser, IL-2-produksjonen og celleproliferasjonen.

Videre kan disse ape-antistoffer og primatiserte former  
10 derav brukes f.eks. til fremstilling av medikamenter som immunosuppressiva, dvs. for å blokkere antigendrevne immunresponser, for behandling av autoimmune sykdommer såsom psoriasis, rhaumatoid artritt, systemisk erytematose (SLE), diabetes mellitus type 1, idiopatisk trombocytopenia purpura (ITP), og for å forebygge organutstøtning, hvor slik  
15 anvendelse er angitt i krav 14-17 samt krav 20-22.

Det er et ytterligere formål for oppfinnelsen å frembringe farmasøytiske blandinger som inneholder et eller flere monoklonale ape-antistoffer som er spesifikke for humant B7-  
20 antigen, dvs. humant B7.1- og/eller humant B7.2-antigen, eller primatiserte former derav, og et farmasøytisk akseptabelt bærerstoff eller hjelpestoff som angitt i krav 13 og 18-19 samt 24. Disse blandinger skal brukes f.eks. som immunosuppressiva for å behandle autoimmune sykdommer,  
25 f.eks. idiopatisk trombocytopenia purpura (ITP) og systemisk lupus erytematose (SLE) for å blokkere antigendrevne immunresponser, og for å forebygge organutstøtning i transplantatmottakere, samt autoimmune sykdommer såsom idiopatisk trombocytopenia purpura (ITP), systemisk  
30 lupus erytematose (SLE), diabetes mellitus type 1, psoriasis, rheumatoid artritt, multippel sklerose, aplastisk anemi, og for å forebygge utstøtning i transplantatmottakere.



Det er enda et ytterligere formål for oppfinnelsen å frembringe transfektanter, f.eks. CHO-celler, som uttrykker i det minste de variable tunge og lette domener av monoklonale ape-antistoffer av den type som er forklart ovenfor og som er spesifikke for humant B7.1- og/eller B7.2-antigen.

Det er et ytterligere formål for oppfinnelsen å frembringe nukleinsyresekvenser som angitt i krav 8 og som koder for de variable tunge og/eller lette domener av monoklonale ape-antistoffer som er spesifikke for humant B7.1- og/eller humant B7.2-antigen, hvor sekvensene kan settes inn i ekspresjonsvektorer som tilrettelegger for ekspresjonen av primatiserte antistoffer som inneholder disse nukleinsyresekvenser.

#### Definisjoner

De følgende begreper skal defineres, slik at oppfinnelsen kan forstås bedre.

Utarmende antistoff: et antistoff som dreper aktiverte B-celler eller andre antigenpresenterende celler.

Ikke-utarmende antistoff: et antistoff som blokkerer den kostimulatoriske virkning av B7 og de T-celleaktiverende ligander CD28 og CTLA-4. Det anergiserer således, men fjerner ikke, den antigenpresenterende celle.

Primatisert antistoff: et rekombinant antistoff som er utviklet således at det inneholder de variable tunge og lette domener av et ape-antistoff, spesielt et antistoff fra en synomolg ape, og som inneholder sekvenser for human konstant domene, fortrinnsvis human immunoglobulin gamma 1- eller gamma-4-konstant domene (eller PE-variant derav). Fremstillingen av slike antistoffer beskrives av Newman et al. (1992): "Primatization of Recombinant Antibodies for Immunotherapy of Human Diseases: A Macaque/Human Chimeric Antibody Against Human CDH", Biotechnology, 10: 1458-1460;

og også i USSN 08/379.072. Disse antistoffer beskrives å oppvise en høy homologigrad med humane antistoffer, dvs. 85-98 %, oppvise humane effektorfunksjoner, ha en nedsatt immunogenisitet, og de kan oppvise en høy affinitet for humane antigener.

B7-antigener: B7-antigener omfatter f.eks. humane B7-, B7.1- og B7.2-antigener. Disse antigener bindes til CD28 og/eller CTLA-4. Disse antigener har en kostimulerende rolle ved T-celleaktivering. Disse B7-antigener inneholder dessuten ekstracellulære immunoglobulin-superfamilie V- og C-lignende domener, et hydrofobt transmembrant parti og en cytoplasmatisk hale (jfr. Freeman et al., Science, 262: 909 (1993)), og de er sterkt glykosylert.

Anti-B7-antistoffer: Monoklonale ape-antistoffer eller primatiserte former derav, som spesifikt binder humane B7-antigener, f.eks. humant B7.1- og/eller B7.2-antigen, med en tilstrekkelig affinitet for å blokkere B7:CD28-vekselspillet og dermed å indusere immunosuppresjon.

#### KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

Figur 1 viser pMS-vektoren som brukes for å velge ut fremstilte rekombinante immunoglobulin-samlinger mot B7 som fremvises på flaten av en filamentøs fag som inneholder primere på grunnlag av javaape-immunoglobulinsekvensene.

Figur 2 viser NEOSPLA-ekspresjonsvektoren som brukes for å uttrykke primatiserte antistoffer ifølge oppfinnelsen som er spesifikke for humant B7.1-antigen.

Figur 3 viser anti-B7.1-titere i apeserum som er rettet mot celleflate-B7.1 på transfiserte CHO-celler.

Figur 4 viser hemmingen av bindingen av radiomerket SB7.1 med affinitetsrensede SB7.1-antistoffer fra ape, i nærvær av umerket SB7 og Mab L307.4 murint anti-B7.1.

Figur 5 viser hemmingen av bindingen av radiomerkede ape-135 og L3707.4 anti-B7.1-antistoffer til B7-positive humane SB-celler ved at de konkurrerer med affinitetsrenset SB7.1.

- 5 Figur 6 viser hemmingen av bindingen av radiomerket B7-Ig til aktiverte humane perifere blod-T-celler ved at de konkurrerer med umerket SB7.1 murint anti-B7.1 (L307.4) og ape-1127 affinitetsrensede serumantistoffer.

10 Figur 7 viser hemmingen av IL-2-protein i blandede lymfocyttkulturer med affinitetsrensede anti-B7.1-antistoffer fra apeserum.

Figur 8a viser aminosyre- og nukleinsyresekvensen for en primatisert form av lett kjede av 7C10, hvis variable område har en sekvens tilsvarende SEQ ID NO:1.

- 15 Figur 8b viser aminosyre- og nukleinsyresekvensen for en primatisert form av tung kjede av 7C10, hvis variable område har en sekvens tilsvarende SEQ ID NO:2.

20 Figur 9a viser aminosyre- og nukleinsyresekvensen for en primatisert form av lett kjede av 7B6, hvis variable område har en sekvens tilsvarende SEQ ID NO:3.

Figur 9b viser aminosyre- og nukleinsyresekvensen for en primatisert form av tung kjede av 7B6, hvis variable område har en sekvens tilsvarende SEQ ID NO:4.

25 Figur 10a viser aminosyre- og nukleinsyresekvensen for en primatisert lett kjede 16C10, hvis variable område har en sekvens tilsvarende SEQ ID NO:5.

Figur 10b viser aminosyre- og nukleinsyresekvensen for en primatisert tung kjede 16C10, hvis variable område har en sekvens tilsvarende SEQ ID NO:6.

DETALJERT BESKRIVELSE AVOPPFINNELSEN

Som beskrevet ovenfor, vedrører foreliggende oppfinnelse fremstillingen av nye monoklonale ape-antistoffer som spesifikt binder humant B7.1- og/eller humant B7.2-antigen, samt primatiserte antistoffer som er avledet derav som angitt i krav 1. Disse antistoffer har en høy affinitet med humant B7.1 og/eller B7.2, og kan derfor brukes som immunosuppressiva som hemmer B7:CD86-banen.

Fremstillingen av monoklonale ape-antistoffer skal fortrinnsvis utføres ved å undersøke fag-fremvisningssamlinger eller ved å fremstille ape-heterohybridomaer ved bruk av B-lymfocytter som erholdes fra aper som er blitt immunisert med B7 (f.eks. humant B7.1 og/eller B7.2).

Som sagt, omfatter den første fremgangsmåte ved generering av anti-B7-antistoffer rekombinant fag-fremvisningsteknikk. Denne teknikk ble beskrevet i grove trekk ovenfor.

I hovedsak vil dette omfatte syntesen av rekombinante immunoglobulinsamlinger mot B7-antigen som fremvises på flaten av filamentøse fager, og utvalg av fager som utsondrer antistoffer med en høy affinitet for B7.1- og/eller B7.2-antigener. Som nevnt ovenfor, skal det fortrinnsvis utvelges antistoffer som bindes til både humant B7.1 og B7.2. For å utføre en slik metode, har foreliggende oppfinnere satt sammen en ensartet samling for ape-samlinger, som nedsetter muligheten for en rekombinasjon, og som bedrer stabiliteten. Denne vektor, som benevnes pMS, skal beskrives i detalj i det følgende, og vises på Figur 1.

For å tilpasse fag-fremvisning for bruk med javaape-samlinger, inneholder denne vektor spesifikke primere for PCR-amplifikasjon av ape-immunoglobulin-gener. Disse primere baserer seg på javaape-sekvenser som ble erholdt mens man utviklet den primatiserte teknologi og databaser som inneholder humane sekvenser.

Egnede primere beskrives i patentsøknad US08/379.072.

Den andre metode omfatter å immunisere aper, dvs. javaaper, mot humant B7-antigen, fortrinnsvis mot humant B7.1- og B7.2-antigen. Den grunnleggende fordelaktighet av javaaper for generering av monoklonale antistoffer ble beskrevet ovenfor. Nærmere bestemt kan slike aper, dvs. synomolge aper, immuniseres mot humane antigener eller receptorer. De erholdte antistoffer kan brukes ved fremstilling av primatiserte antistoffer ifølge metoden som beskrives av Newman et al., Biotechnology, 10, 1455-1460 (1992), og USSN 08/379.072, innlevert den 25. januar 1995.

Den betydelige fordel av antistoffer som erholdes fra synomolge aper, er at disse aper gjenkjenner fremmedheten av flere humane proteiner, og dermed tilrettelegger for dannelsen av antistoffer, hvorav enkelte har en høy affinitet for de ønskede humane antigener, f.eks. humane overflateproteiner og cellereceptorer. Fordi de er fylogenetisk nært beslektet med mennesker, oppviser de dannede antistoffer en høy aminosyre-homologigrad med antistoffene som produseres i mennesker. Som beskrevet ovenfor fant man etter sekvensiering av javaape-genenes immunoglobulin-lett og tungt variabelt parti, at sekvensen for hver genfamilie var 85-88 % homolog med sitt humane motstykke (Newman et al. (1992), Biotechnology, 10, 1455-1460).

I det vesentlige administrerer man humant B7-antigen, f.eks. humant B7.1- og/eller humant B7.2-antigen, til synomolge javaaper, B-celler isoleres fra dyrene, f.eks. kan man ta lymfeknutebiopsier fra dem, og B-lymfocytterne smeltes deretter sammen med KH6/B5-heteromyelomaceller (murine x humane) ved bruk av polyetylenglykol (PEG). Heterohybridomaer som utsondrer antistoffer som binder humant B7-antigen, f.eks. humant B7.1- og/eller humant B7.2-antigen, identifiseres deretter.

Antistoffer som bindes til både B7.1 og B7.2, er ønskelige, fordi disse antistoffer eventuelt kan brukes for å hemme vekselspillet av B7.1 og B7.2, samt av B7, med deres receptormotstykker, dvs. humant CTLA-4 og CD28.

- 5 Antistoffer mot disse epitoper kan hemme vekselspillet av både humant B7.1 og humant B7.2 med sine receptormotstykker på T-cellen. Dette kan eventuelt gi synergistiske virkninger.

- 10 Antistoffer som kun bindes til enten av de humane B7-antigener, nemlig til B7.1-antigen eller til B7.2-antigen, er imidlertid også høyt ønskelige pga. disse molekylers innblanding i T-celleaktivering, klonal ekspansjon lymfokintutsondring (IL-2-utsondring) og responsstyrke på antigener. Idet både humant B7.1 og B7.2 bindes til humant CTLA-4 og  
15 CD28, er det sannsynlig at det finnes minst ett felles eller homologt parti (muligens en eller flere felles konformasjonelle epitoper) som man eventuelt kan dyrke javapeantistoffer mot.

- 20 Foreliggende oppfinnere valgte å immunisere javaaper mot humant B7.1-antigen ved bruk av rekombinant oppløselig B7.1-antigen som ble fremstilt i CHO-celler og renses ved affinitetskromatografi ved bruk av en L307.4-sepharose-affinitetskolonne. Hvilken bestemte kilde som brukes for humant B7-antigen, humant B7.1-antigen eller humant B7.2-antigen, er imidlertid ikke vesentlig, forutsatt at antigenet er tilstrekkelig rent for å forårsake en spesifikk anti-  
25 stoffrespons mot det bestemte administrerte B7-antigen og eventuelt mot andre B7-antigener.

- 30 Genene for det humane B7-antigen, humant B7.1-antigen (også benevnt CD80) og humant B7.2-antigen (også benevnt CD86) er blitt klonet og sekvensiert, og kan dermed lett fremstilles ved rekombinante metoder.

Fortrinnsvis administreres det humane B7-antigen, det humane B7.1-antigen og/eller det humane B7.2-antigen i oppløse-

lig form, f.eks. ved ekspresjon av et B7-, B7.1- eller B7.2-gen hvor man har fjernet de transmembrane og cytoplasmatiske domener og kun har beholdt det ekstracellulære parti, dvs. de ekstracellulære superfamilie V- og C-lignende domener (jfr. f.eks. Grumet et al., Hum. Immunol., 40 (3), s. 228-234, 1994, som beskriver ekspresjonen av en oppløselig form av humant B7, og som i sin helhet er innlemmet heri ved henvisning).

Javaapene skal immuniseres med B7-, B7.1- og/eller B7.2-antigenet, fortrinnsvis en oppløselig form derav, under betingelser som fører til en produksjon av antistoffer som er spesifikke for dem. Det oppløselige humane B7-, B7.1- eller B7.2-antigen skal fortrinnsvis administreres sammen med et hjelpestoff, f.eks. Freund's fullstendige adjuvans (CFA), Alum, Saponin eller et annet kjent hjelpestoff, eller kombinasjoner derav. Generelt vil dette kreve gjentatte immuniseringer, f.eks. ved gjentatte injeksjoner, i løpet av flere måneder. F.eks. utførte man en administrering av oppløselig B7.1-antigen i hjelpestoffer, med boosterimmuniseringer i løpet av 3-4 måneder, og induserte dermed en produksjon av antistoffer som bandt humant B7.1-antigen, i serum.

Etter immuniseringen samler man B-cellene, f.eks. ved lymfeknutebiopsier som tas fra de immuniserte dyr, og B-lymfocytene smeltes sammen med KH6/B5-heteromyelomaceller (murine x humane) ved bruk av polyetylenglykol. Fremgangsmåter ved fremstilling av slike heteromyelomaer er kjente, og kan f.eks. finnes i USSN 08/379.072, Newman et al., innlevert den 25. januar 1995, som er innlemmet heri ved henvisning.

Heterohybridomaer som utsondrer antistoffer som binder humant B7, B7.1 og/eller B7.2, identifiseres deretter. Dette kan utføres ved kjente teknikker. Det kan f.eks. bestemmes ved ELISA-undersøkelse eller radioimmunoassay ved bruk av enzym- eller radionuklid-merket humant B7-, B7.1- og/eller B7.2-antigen.

Cellelinjer som utsondrer antistoffer med den ønskede spesifisitet for humant B7-, B7.1- og/eller B7.2-antigen, subklones deretter til monoklonalitet.

5 Under utviklingen av foreliggende oppfinnelse testet opp-  
finnerne rensede antistoffer for å bestemme deres evne til  
å binde oppløselig B7.1-antigen-bestrøkte plater i en  
ELISA-undersøkelse, antigenpositive B-celler og CHO-trans-  
fektomaer som uttrykker humant B7.1-antigen på sin celle-  
flate. I tillegg testet man antistoffene for å bestemme de-  
10 res evne til å blokkere B-celle/T-celle-vekselspill, målt  
ifølge IL-2-produksjonen og opptaket av tritiert tymidin i  
en blandet lymfocytreaksjon (MLR) idet B7-bindingen ble  
påvist ved bruk av <sup>125</sup>I-radiomerket oppløselig B7.1 (SB7.1).

15 Dessuten testet man affinitetsrensede antistoffer fra java-  
aper for å bestemme deres reaktivitet mot CHO-transfektan-  
ter som uttrykte B7.1/Ig-fusjonsproteiner, og mot CHO-cel-  
ler som produserte humant B7.2-antigen. Disse resultater  
tydet på at B7.1-immunseraene ble bundet til B7.2-trans-  
fektomaene. Bindingen av antistoffene til B7.2-antigen kan  
20 bekreftes ved bruk av oppløselig B7.2/Ig-reagenser. Som  
skal beskrives i de følgende eksempler, kan dette utføres  
ved å fremstille og rense B7.2-Ig fra CHO-transfektomaer i  
tilstrekkelig store mengder for å fremstille en B7.2-Ig-  
sepharose-affinitetskolon. De antistoffer som kryssreage-  
25 rer med B7.2, vil bindes til B7.2-Ig-sepharose-kolonnen.

Cellelinjer som uttrykker antistoffer som bindes spesifikt  
til humant B7-antigen, B7.1-antigen og/eller B7.2-antigen,  
brukes deretter for å klonse sekvensene av variabel domene,  
for fremstilling av primatiserte antistoffer, hovedsaklig  
30 som beskrevet i Newman et al. (1992), Biotechnology, 10,  
1455-1460; og Newman et al., USSN 379.072, innlevert den  
25. januar 1995. I det vesentlige omfatter dette en  
ekstraksjon av RNA'et derfra, omdannelse derav til cDNA og  
amplifikasjon derav ved PCR ved anvendelse av Ig-spesifikke  
35 primere. Egnede primere beskrives i Newman et al. (1992),



Biotechnology, 10, 1455- 1460, og i USSN 379.072 (jfr. spesielt Figur 1 av USSN 379.072).

De klonede variable gener fra ape innføres deretter i en ekspresjonsvektor som inneholder humane gener for human  
5 tung og lett kjedes konstante partier. Dette utføres for-  
trinnsvis ved å bruke den patenterte ekspresjonsvektor fra  
IDEC, Inc., som benevnes NEOSPLA. Denne vektor vises på Fi-  
gur 2, og inneholder cytomegalovirus-promoter/fremmer, mu-  
rin betaglobulin-hovedpromoter, SV40-opphav for replika-  
10 sjon, bovint veksthormon-polyadenylasjonssekvensen, neo-  
mycin-fosfotransferase-ekson 1 og ekson 2, humant immuno-  
globulin kappa- eller lambda-konstant parti, dihydrofolat  
reduktase-genet, humant immunoglobulin gamma 1- eller gamma  
4-PE-konstant parti og ledersekvens. Man har funnet at  
15 denne vektor fører til et meget høyt ekspresjonsnivå av  
primatiserte antistoffer etter innlemmelse av ape-variabelt  
parti-gener og transfeksjon i CHO-celler, etterfulgt av ut-  
valg i G418-holdig medium og metotreksat-amplifikasjon.

F.eks. er det blitt beskrevet at dette ekspresjonssystem  
20 fører til primatiserte antistoffer med en høy aviditet ( $K_d$   
 $\leq 10^{-10}$  M) mot CD4 og andre humane celleflatereceptorer. Vi-  
dere har man funnet at antistoffene oppviser samme affi-  
nitet, spesifisitet og funksjonelle aktivitet som de opp-  
rinnelige ape-antistoffer. Dette vektorsystem beskrives i  
25 det vesentlige i USSN 379.072 og i USSN 08/149.099,  
innlevert den 3. november 1993. Dette system gir høye  
ekspresjonsnivåer, dvs. > 30 pg/celle/dag.

Som ble beskrevet ovenfor, har foreliggende oppfinnere  
valgt fire ledende monoklonale kandidatantistoffer fra ape,  
30 som spesifikt binder B7.1-antigenet, og som også kan binde  
B7.2-antigenet. Disse monoklonale ape-antistoffer benevnes  
heri 7B6, 16C10 og 7C10.

Som skal beskrives i større detalj i det følgende, ble  
disse antistoffers evne til å blokkere B-celle/T-celle-vek-

selspillet bedømt, ifølge målinger av IL-2-produksjon og tritiert tymidininntak i en blandet lymfocytptomsetning for T-cellebindingseksperimenter. For T-celle-binding dyrket man poser med humane perifere blodlymfocytter i 3-6  
 5 dager i nærvær av en PHA-stimulator. B7-bindingen ble testet med  $^{125}\text{I}$ -radiomerket oppløselig B7.1. De observerte resultater tyder på at alle disse antistoffer binder B7.1-antigen med en høy affinitet, og virksomt blokkerer B-celle/T-celle-vekselspillet, hvilket observeres ved en  
 10 nedsatt IL-2-produksjon og en nedsatt proliferasjon av blandede lymfocyttkulturer.

Egenskapene av disse bestemte monoklonale ape-antistoffer skal oppsummeres i det følgende:

1. For å demonstrere ape-antistoffenes evne til å blokkere det fysiske vekselspill mellom CTLA4-Ig, inkuberte man forskjellige konsentrasjoner av ape-anti-B7.1-antistoffene og umerket CTLA4-Ig sammen med radiomerket CTLA4-Ig $^{125}$ . Resultatene av hemmingsassayet viste at IC50 (den konsentrasjon av hemmer som fører til 50 %  
 15 hemming) for ape-antistoffene er:
 

a:	7C10:	0,39 $\mu\text{g}/\text{Ml}$
b:	16C10:	1,60 $\mu\text{g}/\text{Ml}$
d:	7B6:	39,0 $\mu\text{g}/\text{Ml}$
  
2. Schatchard-analyse viste at de tilsynelatende affinitetskonstanter (Kd) for ape-antistoffenes binding til B7-Ig-bestrøkne plater var omtrent:
 

a:	7C10:	$6,2 \times 10^{-9}$ M
b:	16C10:	$8,1 \times 10^{-9}$ M
c:	7B6:	$10,7 \times 10^{-9}$ M
  
3. Antistoffene ble testet *in vitro* i et blandet lymfocytt-reaksjonsassay (MLR). MLR-undersøkelsen viste at alle fire anti-B7.1-antistoffer hemmer IL-2-produksjonen i forskjellig grad, ifølge de følgende Ibgo-ver-



ren som vises på Figur 2, og som i det vesentlige beskrives i USSN 08/379.072 og 08/149.099.

De primatiserte antistoffer skal fortrinnsvis inneholde enten humant immunoglobulin gamma 1- eller gamma 4-konstant parti, idet gamma 4 fortrinnsvis er mutert i to stillinger for å danne gamma 4-PE. Gamma 4-PE-mutanten inneholder to mutasjoner, nemlig en glutamsyre i CH<sub>2</sub>-partiet som ble innføyd for å eliminere en rest-FCR-binding, og en prolinsubstitusjon i hengselpartiet som skal bedre stabiliteten av den tunge kjedes disulfidbindingsvekselspill (jfr. Alegre et al., J. Immunol. 148, 3461-3468 (1992); og Angel et al., Mol. Immunol. 30, 105-158 (1993)).

Om de primatiserte antistoffer skal inneholde gamma 1-, gamma 4- eller gamma 4-PE-konstant parti, er til stor del avhengig av den bestemte målsykdom. Fortrinnsvis danner man utarmende og ikke-utarmende primatiserte IgG1- og IgG4-antistoffer, og tester disse mot forskjellige målsykdommer.

Med den beskrevne binding og de funksjonelle egenskaper av de monoklonale ape-antistoffer ifølge oppfinnelsen, vil disse anti-B7.1-monoklonale antistoffer og primatiserte former derav antakelig vise seg å være godt egnet som terapeutiske midler for å blokkere B7:CD28-vekselspillet og dermed å tilveiebringe immunosuppresjon. Med sin høye affinitet for B7.1-antigen og sin evne til å blokkere B-celle/T-celle-vekselvirkningene ifølge målinger av IL-2-produksjonen og opptak av tritiert tymidin i blandede lymfocyttkulturer, og deres evne til å virksomt hemme antigendrevne responser i donor-miltcellekulturer som ble vist ved nedsatte antigenspesifikke IgG-responser, nedsatt IL-2-produksjon og nedsatt celleproliferasjon, vil disse monoklonale ape-antistoffer og primatiserte former derav sannsynligvis virke som effektive immunosuppressiva som modulerer B7:CD28-banen. Dette er viktig for behandling av mange sykdommer hvor det er terapeutisk ønskelig med en immunosuppresjon, f.eks. autoimmune sykdommer, for å hemme

uønskede antigenspesifikke IgG-responser og også for forebyggelse av organutstøtning og "graft-vs.-host-disease".

5 De viktigste terapeutiske indikasjoner for anti-B7.1-antistoffene ifølge oppfinnelsen omfatter f.eks. autoimmune sykdommer, såsom idiopatisk trombocytopenia purpura (ITP), systemisk lupus erytematose (SLE), diabetes mellitus type 1, multippel sklerose, aplastisk anemi, psoriasis og reumatoid artritt.

10 En annen viktig terapeutisk indikasjon for de aktuelle anti-B7.1-antistoffene er forebyggelse av "graft-vs.-host-disease" (GVHD) ved organtransplantasjoner eller benmargtransplantasjoner (BMT). De aktuelle antistoffene kan brukes for å indusere toleranse hos verten for donor-  
15 spesifikke alloantigener, og dermed forenkle innpodingen og nedsette hyppigheten for transplantatutstøtning. I en murin modell av allogeneisk hjertetransplantasjon har man vist at en intravenøs administrering av CTLA4-Ig kan føre til en immunosuppresjon, eller t.o.m. kan indusere toleranse for  
20 alloantigenet (Lin et al., J. Exp. Med. 178: 1801, 1993; Torka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 11102, 1992). Det forventes at de primatiserte anti-B7.1-antistoffer vil oppvise en lignende eller sterkere aktivitet.

Antistoffene som fremstilles som beskrevet ovenfor, eller  
25 ved likeverdige teknikker, kan renses ved en kombinasjon av affinitets- og størrelsesutelukkende kromatografi for karakterisering i funksjonelle biologiske assayer. Disse assayer omfatter bestemmelsen av spesifisiteten og bindingsaffiniteten, samt effektorfunksjonen som forbindes med den  
30 uttrykte isotype, f.eks. ADCC, eller komplementfiksering. Slike antistoffer kan brukes som passive eller aktive terapeutiske midler mot et antall humane sykdommer, bl.a. B-celle-lymfom, smittelige sykdommer såsom AIDS, autoimmune og inflammatoriske sykdommer samt transplantasjon. Anti-  
35 stoffene kan brukes enten i sin native form, eller som en

del av et antistoff/chelat-, antistoff/legemiddel- eller antistoff/toksin-kompleks. I tillegg kan hele antistoffer eller antistoff-fragmenter (Fab<sub>2</sub>, Fab, Fv) brukes som avbildningsreagenser eller som potensielle vaksiner eller immunogener ved aktiv immunoterapi for generering av anti-idiotypiske responser.

Hvilken mengde antistoff som kan være nyttig for å frembringe en terapeutisk virkning, kan bestemmes ved standard teknikker som er velkjent for fagmannen. Antistoffene vil generelt fremstilles ved standardteknikker innen en farmasøytisk akseptabel buffer, og kan administreres ved hvilken som helst ønsket rute. Fordi antistoffene ifølge oppfinnelsen er meget virksomme og tolereres av mennesker, er det mulig å administrere antistoffene flere ganger for å bekjempe forskjellige sykdommer eller sykdomstilstander i et menneske.

De aktuelle anti-B7.1-antistoffene (eller fragmenter derav) er nyttige ved indusering av immunosuppresjon, dvs. indusering av en suppresjon av immunsystemet i et menneske eller dyr.

Evnen av de aktuelle antistoffene til å indusere immunosuppresjon er blitt demonstrert i standardtester som brukes med dette formål, f.eks. en blandet lymfocytreaksjonstest eller en test som måler hemmingen av T-celleproliferasjonen ifølge tymidinopptaket.

Det faktum at antistoffene ifølge foreliggende oppfinnelse er nyttige ved indusering av immunosuppresjon, tyder på at de kan være nyttige ved behandling eller forebyggelse av en resistens mot eller utstøtning av transplanterte organer eller vev (f.eks. nyre, hjerte, lunge, benmarg, hud, hornhinne osv); behandling eller forebyggelse av autoimmune, inflammatoriske, proliferative og hyperproliferative sykdommer, og av kutane manifestasjoner av immunologisk medierte sykdommer (f.eks. rheumatoid artritt, lupus erytema-

tose, systemisk lupus erytematose, Hashimotos tyroiditt, multippel sklerose, myastenia gravis, type 1-diabetes, uveitis, nefrotisk syndrom, psoriasis, atopisk dermatitt, kontaktdermatitt og andre eksematøse

5 dermatitter, seboréisk dermatitt, lichen planus, pemfigus, blæret pemfigus, epidermolysis bullosa, urtikaria, angioødem, vaskulitter, erytem, kutan eosinofilia, alopecia areata osv.); behandling av reversibel obstruktiv luftveisykdom, tarmbetennelser og allergier (f.eks.

10 cøliaki, proktitt, eosinofil gastroenteritt, mastocytose, Crohns sykdom og ulcerativ kolitt) og matallergier (f.eks. migrene, rhinitt og eksem).

En fagman vil ved rutinemessig eksperimentering kunne bestemme hvor høy en virksom, ikke-toksisk mengde antistoffer vil være med sikte på å indusere immunosuppresjon. Generelt vil en virksom dose imidlertid ligge i området på ca. 0,05-100 mg pr. kg kroppsvekt pr. dag.

Antistoffene (eller fragmenter derav) ifølge oppfinnelsen vil sannsynligvis også være nyttige ved behandling av svulster i pattedyr. Nærmere bestemt vil de sannsynligvis være nyttige ved reduksjon av svulststørrelsen, hemming av svulstveksten og/eller forlengelse av overlevelsestiden av svulstbærende dyr. En fagman vil ved rutinemessig eksperimentering kunne bestemme hvor høy en virksom, ikke-toksisk mengde av de aktuelle anti-B7-antistoffer vil være for behandling av karsinogene svulster. Generelt forventes det imidlertid at en virksom dosering være 0,05-100 mg pr. kg kroppsvekt pr. dag.

Antistoffene ifølge oppfinnelsen kan administreres til et menneske eller et annet dyr ifølge de ovennevnte behandlingsmetoder, i en mengde som er tilstrekkelig for å virke i terapeutisk eller profylaktisk grad. Slike antistoffer ifølge oppfinnelsen kan administreres til et menneske eller et annet dyr i en konvensjonell doseringsform som fremstilles ved å kombinere antistoffet ifølge oppfinnelsen med et

konvensjonelt farmasøytisk akseptabelt bærerstoff eller fortynningsmiddel ifølge kjente teknikker. En fagman vil være klar over at formen og egenskapene av et farmasøytisk akseptabelt bærerstoff eller tynningsmiddel bestemmes av  
5 hvilken mengde aktiv ingrediens som det skal kombineres med, administreringsruten og andre velkjente variabler.

Administreringsruten for antistoffet (eller fragmentet derav) ifølge oppfinnelsen kan være oral, parenteral, ved inhalasjon eller topisk. Begrepet parenteral som brukes  
10 her, omfatter intravenøs, intraperitoneal, intramuskulær, subkutan, rektal eller vaginal administrering. De subkutane og intramuskulære former for parenteral administrering foretrekkes generelt.

Det daglige parenterale og orale doseringsområde for bruk  
15 av forbindelsene ifølge oppfinnelsen ved profylaktisk eller terapeutisk induksjon av immunosuppresjon eller ved terapeutisk behandling av karsinogene svulster, vil generelt ligge i området 0,05-100, fortrinnsvis 0,5-10, mg pr. kg kroppsvekt pr. dag.

20 Antistoffene ifølge oppfinnelsen kan også administreres ved inhalasjon. Med "inhalasjon" menes intranasal eller oral inhalasjonsadministrering. Egnede doseringsformer for en slik administrering, såsom en aerosolformulering eller en inhalator med oppmålte doser, kan fremstilles ved konvensjonelle teknikker. Den foretrukne doseringsmengde som skal  
25 brukes for en forbindelse ifølge oppfinnelsen, ligger generelt innen området 10-100 mg.

Antistoffene ifølge oppfinnelsen kan også administreres topisk. Med topisk administrering menes ikke-systemisk administrering, og dette omfatter påføringen av en forbindelse  
30 av et antistoff (eller et fragment derav) ifølge oppfinnelsen eksternt på epidermis, i kinnhulrommet eller inndryping av et slikt antistoff i øret, øyet eller nesen, og hvor antistoffet ikke i noen signifikant grad trenger seg



inn i blodstrømmen. Med systemisk administrering menes oral, intravenøs, intraperitoneal eller intramuskulær administrering. Mengden antistoff som er nødvendig for den terapeutiske eller profylaktiske virkning, vil såklart variere med det valgte antistoff, naturen og alvoret av tilstanden som skal behandles og dyret som skal behandles, og bestemmes endelig av den behandlende lege. En egnet topisk dose av et antistoff ifølge oppfinnelsen vil generelt ligge innen området 1-100 mg pr. kg kroppsvekt daglig.

#### 10 Formuleringer

Mens det er mulig å administrere et antistoff eller et fragment derav for seg selv, foretrekkes det å innlemme det i en farmasøytisk formulering. Den aktive ingrediens kan for en topisk administrering utgjøre 0,001-10 vekt%, f.eks. 1-2 vekt% av formuleringen, selv om den kan utgjøre inntil 10 vekt%, men fortrinnsvis ikke over 5 vekt%, og mer foretrukket utgjør den 0,1-1 vekt% av formuleringen.

De topiske formuleringer ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter en aktiv ingrediens sammen med et eller flere akseptable bærerstoff for ingrediensen, og valgfritt også andre terapeutiske ingredienser. Bærerstoffet eller -stoffene må være "akseptable" i den forstand at de er kompatible med de andre ingredienser i formuleringen, og ikke er skadelige for mottakeren.

Formuleringer som er egnet for en topisk administrering, omfatter flytende eller halvfaste preparater som er egnet for penetrasjon gjennom huden til det sted hvor det er nødvendig med en behandling, såsom linimenter, losjoner, kremer, salver eller pastaer, og dråper som er egnet for administrering til øyet, øret eller nesen.

Dråpene ifølge foreliggende oppfinnelse kan være sterile vandige eller oljeaktige oppløsninger eller suspensjoner, og de kan fremstilles ved å oppløse den aktive ingrediens i

en egnet vandig oppløsning av et baktericid og/eller fungicid middel og/eller hvilket som helst annet egnet konserveringsmiddel, og de omfatter fortrinnsvis også et overflateaktivt middel. Den erholdte oppløsning kan  
5 deretter klarnes ved filtrering og overføres til en egnet beholder, som deretter forsegles og steriliseres i en autoklav eller ved å holde den ved 90-100°C i en halv time. Alternativt kan oppløsningen steriliseres ved filtrering og overføres til beholderen ved en aseptisk teknikk. Eksempler  
10 på baktericide og fungicide midler som er egnet for å innlemmes i dråpene, er fenylmerkurinitrat eller -acetat (0,002 %), benzalkoniumklorid (0,01%) og klorheksidinacetat (0,01%). Egnede oppløsningsmidler for fremstilling av en oljeaktig oppløsning omfatter glycerol, fortynnet alkohol  
15 og propylenglykol.

Losjoner ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter slike som er egnet for påføring på huden eller øyet. En øyelosjon kan være en steril vandig oppløsning, som valgfritt kan inneholde et baktericid, og den kan fremstilles ved metoder som  
20 ligner metodene ved fremstilling av dråper. Losjoner eller linimenter for påføring på huden kan også omfatte et middel som fremskynder tørkingen og avkjøler huden, såsom en alkohol eller aceton, og/eller et fuktemiddel, såsom glycerol, eller en olje, såsom ricinusolje eller arachinolje.

25 Kremer, salver eller pastaer ifølge foreliggende oppfinnelse er halvfaste formuleringer av den aktive ingrediens for ekstern påføring. De kan fremstilles ved å blande den aktive ingrediens i fint oppdelt eller pulverisert form, for seg selv eller i oppløsning eller suspensjon i et vandig  
30 eller ikke-vandig fluidum, ved hjelp av egnet maskineri, på fet eller ikke-fet base. Basen kan omfatte hydrokarboner, såsom hard, bløt eller flytende parafin, glycerol, bivoks, en metallisk såpe; en slimet masse; en olje av naturlig opphav såsom mandelolje, kornolje, arachinolje, ricinusolje  
35 eller olivenolje; ullfett eller dens derivater, eller en fettsyre, såsom stearinsyre eller oleinsyre, sammen med en

alkohol såsom propylenglykol eller makrogoler.

Formuleringen kan innlemme hvilket som helst egnet overflateaktivt middel, såsom et anionisk, kationisk eller ikke-ionisk overflateaktivt middel, såsom sorbitanestere eller polyoksyetylenderivater derav. Suspensjonsmidler såsom naturlige gummier, cellulosederivater eller uorganiske materialer, såsom silikaholdig silisiumdioksyd, og andre ingredienser såsom lanolin, kan også innlemmes.

Anti-B7.1-antistoffene eller fragmentene derav ifølge oppfinnelsen kan også administreres sammen med andre komponenter som modulerer B7:CD28-banen. Slike komponenter omfatter f.eks. cytokiner, såsom IL-7 og IL-10, CTLA4-Ig, oppløselig CTLA-4 og anti-CD28-antistoffer og fragmenter derav.

En fagman vil være klar over at den optimale mengde og tidsrommet mellom de enkelte doser av et antistoff eller fragment derav ifølge oppfinnelsen vil bestemmes ifølge naturen og utstrekningen av tilstanden som behandles, formen, ruten og stedet for administreringen og av det bestemte dyr som skal behandles, og at slike optima kan bestemmes ved konvensjonelle teknikker. En fagman vil også forstå at det optimale forløp av behandlingen, dvs. antallet doser av et antistoff eller fragment derav ifølge oppfinnelsen som skal gis pr. dag i et bestemt antall dager, kan bestemmes av en fagman ved konvensjonelle bestemmelsestester for behandlingsforløpet.

#### Kapselsammensetning

En farmasøytisk blanding ifølge foreliggende oppfinnelse i form av en kapsel fremstilles ved å fylle en standard todelt hårdgelatinkapsel med 50 mg av et antistoff eller fragment derav ifølge oppfinnelsen i pulverisert form, 100 mg laktose, 32 mg talkum og 8 mg magnesiumstearat.

Injiserbar parenteralsammensetning

En farmasøytisk blanding ifølge foreliggende oppfinnelse som foreligger i en form som er egnet for administrering ved injeksjon, fremstilles ved å omrøre 1,5 vekt% antistoff eller fragment derav ifølge oppfinnelsen i 10 vol% propylenglykol og vann. Oppløsningen steriliseres ved filtrering.

Salvesammensetning

Antistoff eller fragment derav  
 10 ifølge oppfinnelsen..... 1,0 g  
 Hvitt bløtparafin..... ad 100,0 g

Antistoffet eller fragmentet derav ifølge oppfinnelsen dispergeres i en liten mengde bærerstoff for å gi et glatt, homogent produkt. Sammenpressbare metalltuber fylles deretter med dispergeringen.

Topisk krem-sammensetning

Antistoff eller fragment derav  
 ifølge oppfinnelsen..... 1,0 g  
 20 "Polawax" GP 200..... 20,0 g  
 Vannfritt lanolin..... 2,0 g  
 Hvit bivoks..... 2,5 g  
 Metylhydroksybenzoat..... 0,1 g  
 Destillert vann..... ad 100,0 g

25 "Polawax", bivoksen og lanolinet oppvarmes sammen til 60°C. En oppløsning av metylhydroksybenzoat tilsettes, og man utfører homogenisering ved omrøring med høy hastighet. Temperaturen får deretter falle til 50°C. Antistoffet eller  
 30 fragmentet derav ifølge oppfinnelsen tilsettes deretter og dispergeres gjennom blandingen, og sammensetningen for avkjøles under omrøring med lav hastighet.

Topisk losjon-sammensetning

	Antistoff eller fragment derav	
	ifølge oppfinnelsen.....	1,0 g
	Sorbitan monolaurat.....	0,6 g
5	Polysorbat 20.....	0,6 g
	Cetostearylalkohol.....	1,2 g
	Glycerin.....	6,0 g
	Metylhydroksybenzoat.....	0,2 g
	Renset vann B.P.....	ad 100,00 ml
10	(B.P. = British Pharmacopeia)	

Metylhydroksybenzoatet og glycerinet oppløses i 70 ml vann ved 75°C. Sorbitanmonolauratet, polysorbat 20 og cetostearylalkoholen smeltes sammen ved 75°C, og tilføres til den vandige oppløsning. Den erholdte emulsjon homogeniseres og får avkjøles under kontinuerlig omrøring, og antistoffet eller fragmentet derav ifølge oppfinnelsen tilsettes i form av en suspensjon i resten av vannet. Hele suspensjonen omrøres inntil den er homogen.

20 Øyedråpesammensetning

	Antistoff eller fragment derav	
	ifølge oppfinnelsen.....	0,5 g
	Metylhydroksybenzoat.....	0,01 g
	Propylhydroksybenzoat.....	0,04 g
25	Renset vann B.P.....	ad 100,00 ml

Metyl- og propylhydroksybenzoatene oppløses i 70 ml renset vann ved 75°C, og den erholdte oppløsning får avkjøles. Antistoffet eller fragmentet derav ifølge oppfinnelsen tilsettes deretter, og oppløsningen steriliseres ved filtrering gjennom et membranfilter (0,022 µm porestørrelse) og pakkes aseptisk i egnede sterile beholdere.

Sammensetning for administrering ved inhalasjon

For en aerosolbeholder med en kapasitet på 15-20 ml: bland 10 mg antistoff eller fragment derav ifølge oppfinnelsen med 0,2-0,5% smøremiddel, såsom polysorbat 85 eller oleinsyre, og disperger blandingen i et drivstoff, såsom freon, fortrinnsvis sammen med (1,2-diklortetrafluoretan) og difluorklormetan, og fyll i en egnet aerosolbeholder som er tilpasset enten en intranasal eller oral inhalasjonsadministrering.

Sammensetning for administrering ved inhalasjon

For en aerosolbeholder med en kapasitet på 15-20 ml: oppløs 10 mg antistoff eller fragment derav ifølge oppfinnelsen i etanol (6-8 ml), tilsett 0,1-0,2% smøremiddel, såsom polysorbat 85 eller oleinsyre; og disperger det hele i et drivstoff, såsom freon, fortrinnsvis sammen med en kombinasjon av (1,2-diklortetrafluoretan) og difluorklormetan, og fyll på en egnet aerosolbeholder som er tilpasset enten en intranasal eller oral inhalasjonsadministrering.

Antistoffene og de farmasøytiske blandinger ifølge oppfinnelsen er spesielt nyttige ved parenteral administrering, dvs. subkutant, intramuskulært eller intravenøst. Sammensetningene for parenteral administrering vil vanligvis omfatte en oppløsning av et antistoff eller fragment derav ifølge oppfinnelsen, eller en blanding derav, oppløst i et akseptabelt bærerstoff, fortrinnsvis et vandig bærerstoff. Forskjellige vandige bærerstoffer kan brukes, f.eks. vann, bufret vann, 0,4 % saltvann, 0,3% glycin og lignende. Disse oppløsninger er sterile, og generelt frie for partikkelformet materiale. Disse oppløsninger kan steriliseres ved konvensjonelle, velkjente sterilisasjonsteknikker. Blandningene kan inneholde farmasøytisk akseptable hjelpestoffer som er nødvendige for å tilpasse løsningen de fysiologiske betingelser, såsom pH-justerende og bufrende midler osv.

Konsentrasjonen av antistoffet eller fragmentet derav ifølge oppfinnelsen i en slik farmasøytisk formulering kan variere innen vide rammer, dvs. fra under 0,5 vekt%, vanligvis ca. eller minst 1 vekt%, inntil 15 eller 20 vekt%, og velges primært på grunnlag av fluidenes volum, viskositet osv., ifølge den bestemte valgte administreringsform.

En farmasøytisk blanding ifølge oppfinnelsen for intramuskulær injeksjon, kan dermed f.eks. fremstilles således at den inneholder 1 ml sterilt bufret vann og 50 mg antistoff eller fragment derav ifølge oppfinnelsen. På lignende måte kan en farmasøytisk blanding ifølge oppfinnelsen for intravenøs infusjon fremstilles således at den inneholder 250 ml steril Ringers oppløsning og 150 mg antistoff eller fragment derav ifølge oppfinnelsen. De faktiske metoder ved fremstilling av parenteralt administrerbare blandinger er velkjent, eller vil være åpenbare for fagmannen, og de beskrives i større detalj i f.eks. Remington's Pharmaceutical Science, 15. utg., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, USA.

Antistoffene (eller fragmentene derav) ifølge oppfinnelsen kan lyofiliseres for lagring, og rekondisjoneres i et egnet bærerstoff før bruk. Denne teknikk har vist seg å være virksom med konvensjonelle immunoglobuliner, og man kan bruke lyofiliserings- og rekondisjoneringssteknikker som er kjent innen faget.

Avhengig av det ønskede resultat kan de farmasøytiske blandinger ifølge oppfinnelsen administreres for profylaktisk og/eller terapeutisk behandling. Ved terapeutisk applikasjon administreres blandingene til en pasient som allerede lider av en sykdom, i en mengde som er tilstrekkelig for å kurere eller i det minste delvis stanse sykdommen og dens komplikasjoner. Ved profylaktisk bruk administreres blandingene som inneholder antistoffene ifølge oppfinnelsen el-

ler en blanding derav, til en pasient som ikke enda er syk, for å styrke pasientens motstandsevne.

En enkelt eller flere administreringer av de farmasøytiske blandinger kan utføres, idet doseringsmengden og mønstret velges av den behandelende lege. I hvert tilfelle bør den farmasøytiske blanding ifølge oppfinnelsen levere en tilstrekkelig mengde av de endrede antistoffer (eller fragmenter derav) ifølge oppfinnelsen for å virksomt behandle pasienten.

10 Det bør også merkes at antistoffene ifølge oppfinnelsen kan brukes for utvikling og syntese av enten peptid- eller ikke-peptid-forbindelser (mimetika), som kan være nyttige ved samme terapi som antistoffene. Jfr. f.eks. Saragovi et al., Science, 253, 792-795 (1991).

15 For å ytterligere illustrere oppfinnelsen frembringes de følgende eksempler.

#### Eksempel 1

Rekombinante immunoglobulinsamlinger som fremvises på flaten av filamentøse fager, ble først beskrevet av McCafferty et al., Nature, 348: 552-554, 1990, og Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7978-7982, 1991. Med denne teknologi har man isolert høyaffinitets antistoffer fra humane rekombinante samlinger (Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 589: 10164-10168, 1992). Selv om fag-fremvisningskonseptet som brukes, ialt vesentlig ligner konseptet som beskrives av Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7978-7982, 1991, har man modifisert teknikken ved å bruke en ensartet vektor for ape-samlinger for å nedsette muligheten for rekombinasjon og å øke stabiliteten. Denne vektor, pMS, Figur 1, inneholder en enkelt lac-promoter/operatør for en virksom transkripsjon og translasjon av polycistronisk tung og lett kjedet ape-DNA. Denne vektor inneholder to forskjellige ledersekvenser, nemlig omp A



(Movva et al., J. Biol. Chem., 255: 27-29 (1980) for den lette kjede, og pel B (Lei, J. Bact., 109: 4379-4383 (1987) for den tunge kjede Fd. Begge ledersekvenser oversettes til hydrofobe signalpeptider som regulerer

5 utsondringen av klonede produkter av lett og tung kjede ut i det periplasmatiske rom. I det oksydative miljø av periplasma, folder seg de to kjeder, og det dannes disulfidbindinger, for å danne stabile Fab-fragmenter. Vi avledet stammen av vektoren fra fagemidlet "Bluescript"

10 (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Den inneholder genet for enzymet beta-laktamase, som gir ampicillinresistens (carbenicillinresistens) til bakterier som inneholder pMS-DNA. Vi avledet, også fra "Bluescript", også opphavet for replikasjonen for flerkopi-plasmidet ColE1 og opphavet for

15 replikasjon av den filamentøse bakteriofag fl. Opphavet for replikasjon av fagen fl (det såkalte intragen-parti) signaliserer en initiering av syntesen av enkeltkjedet pMS-DNA, en initiering av kapsiddannelsen, og termineringen av RNA-syntesen, ved virale enzymer. Replikasjonen og

20 sammensetningen av pMS-DNA-kjeder til fagpartikler er avhengig av virale proteiner, som må leveres av en hjelperfag. Vi har brukt hjelperfagen VCSM13, som er spesielt godt egnet for dette formål, fordi den også inneholder et gen som koder for kanamycinresistens. Bakterier som er in-

25 fisert med VCSM13 og pMS, kan velges ved å tilsette både kanamycin og carbenicillin til vekstmediet. Bakterien vil endelig fremstille filamentøse fag-partikler som inneholder enten pMS- eller VCSM13-genomer. Innpakkingen av hjelperfagen er mindre virksom enn for pMS, og fører til en blanded fag-populasjon som inneholder hovedsaklig rekombinante

30 pMS-fager. Endene av fagen plukker opp mindre belegningsproteiner som er spesifikke for hver ende. Av spesiell interesse er her gen III-produktet, som foreligger i 3-5 kopier i den ene ende av fagen. Gen III-produktet er 406

35 aminosyrer langt, og er nødvendig for en fag-infeksjon av *E. coli* via F pili. De første to domener av den tunge kjede, nemlig den variable domene og CH1-domenen, kombinerer med gen III-proteinets karboksyterminale halv-

del. Dette rekombinante pili-protein, som rettes av pel B-lederen, utsondres til peroplasma, hvor den akkumuleres og danner disulfidbindinger med lett kjede før den innlemmes i fag-belegningen. Dessuten inneholder en annen vektor FLAG-sekvensen, innføydd nedstrøms for gen III. FLAG er et 8 aminosyrer langt peptid som uttrykkes i karboksyende av Fd-proteinet. Vi bruker kommersielt tilgjengelig monoklonalt anti-FLAG M2 både for rensing og påvisning av fag-Fab ved ELISA (Brizzard, Bio Techniques, 16 (4): 730-731 (1994)).

Etter konstruksjon av vektoren pMS, testet vi dens evne til å fremstille fag-bundet Fab ved bruk av kontroll-antistoffgener. Vi klonet et anti-tetanustoksin-antistoff (erholdt fra Dr. Carlos Barbas) inn i pMS og transformert "XLI-blue". Vi ko-infiserte våre celler med VCSM13 og genererte en fag som fremviste anti-tetanustoksin-antistoffet. Vi utførte effisiens-eksperimenter hvor anti-tetanustoksin-fagen ble slått sammen med en fag som oppviste et irrelevant antistoff, i forholdet 1:100.000. Vi utførte tre vaskeomganger ved å tilføre 50 µl av den blandede fag til antigenbestrøkne (tetanustoksin) polystyrenbrønner. Ikke-klebende fager ble vasket bort, og de fastklebende fager ble eluert med syre. De eluerte fager ble brukt for å infisere en fersk alikvot av XLI-Blue-bakterier, og man tilsatte hjelper-fag. Etter amplifikasjon over natten fremstilte man fager, og rensset dem igjen på antigenbestrøkne plater. Etter tre vaskeomganger kunne vi vise at vi fremgangsrikt hadde anriket anti-tetanustoksin-fagen. Fremgangen av denne teknologi er også avhengig av evnen til å fremstille oppløselige Fab'er for en karakterisering av det endelig rensede produkt. Dette ble oppnådd ved å skjære ut gen III fra pMS-DNA ved bruk av restriksjonsenzymet Nhe I, etterfulgt av en re-ligering. Etter at gen III ble skåret ut, ble Fab'en ikke lenger fremvist på fag-overflaten, men samlet seg opp i det periplasmatiske rom. Lysater ble fremstilt fra bakterier som uttrykte oppløselig Fab, og testet for antigen-

spesifisiteten ifølge ELISA. Man påviste store mengder oppløselig Fab.

For å tilpasse fag-fremvisningsteknologien for bruk med javaape-samlinger, utviklet vi spesifikke primere for PCR-amplifikasjon av ape-immunoglobulin-gener. Disse baserte seg på javaape-sekvensen som vi dannet mens vi utviklet "PRIMATIZED"-antistoffteknologien (jfr. USSN 08/379.072) og databaser som inneholdt humane sekvenser (Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Dept. of Health and Human Services, National Institute of Health).

Vi utviklet tre primersett for å dekke amplifikasjonen av javaape-samlingen. Vårt første primersett ble utviklet for amplifikasjon av tung kjede VH- og CH1- (Fd-) domenene. Det bestod av en 3'-CH1-domenepriemer og seks 5'-VH-familiespesifikke primere som ble bundet i ramme 1-partiet. Vårt andre primersett, utviklet for å amplifisere hele lambda-kjeden, dekker de mange lambda-kjede-undergrupper. Det består av en 3'-priemer og tre 5'-avledede primere som bindes i VL-ramme 1-partiet. Vårt tredje primersett ble utviklet for en amplifikasjon av kappa-kjede-undergruppene. Det består av en 3'-priemer og fem VK-ramme 1-primere. Ved bruk av hvert av disse sett ble PCR-parametrene optimert for å erholde tilstrekkelig sterke signaler fra hvert primerpar for at det ble gjort tilstrekkelig materiale tilgjengelig for å klonе samlingen. Vi satte nylig sammen javaape-kombinatoriske samlinger i vår pMS-vektor ved bruk av disse optimer-te PCR-betingelser. Benmargbiopsier ble tatt fra CD4-immune aper, som kilde for immunoglobulin-RNA. Samlingene inneholdt ca.  $10^6$  elementer, og gjennomgås for tiden ved rensing for å finne spesifikke bindere, på antigenbestrøknе brønner.

Eksempel 2*Utvikling av B7/CTLA-4-reagenser*

Vi har generert et antall reagenser med det formål å immunisere aper, utvikle bindings- og funksjonelle assayer *in vitro*, velge ut heterohybridomaer og gjennomgå fagsamlinger. I Tabell 1 er hver reagens og dens formål oppført. I tilfellet av B7.1 trakk man ut RNA fra SB-cellene og omdannet dette til cDNA ved revers transkriptase. Den første cDNA-kjede ble PCR-amplifisert ved bruk av B7.1-spesifikke primere og klonet inn i IDEC's NEOSPLA-pattedyr-ekspresjonsvektorer. CHO-celler ble transfisert med B7.1-NEOSPLA-DNA, og kloner som uttrykte membranforbundet B7.1, ble identifisert. B7.1-fusjonsproteinet ble generert på lignende måte, unntatt at det PCR-amplifiserte B7.1-gen ble klonet inn i en NEOSPLA-kassetvektor som inneholdt humane CH2- og CH3-immunoglobulin-gener. CHO-celler ble omdannet med B7.1/Ig-NEOSPLA-DNA, og stabile kloner som utsondret B7.1/Ig-fusjonsprotein, ble amplifisert. Generelt ble B7.2 og CTLA4-reagensene generert på samme måte, unntatt at man for B7.2 isolerte RNA'et fra humane miltceller som var blitt stimulert i 24 timer med anti-Ig og IL-4, og for CTLA4-konstruksjonene var kilden for genene PHA-aktiverte humane T-celler.

Tabell 1

Reagens	Formål	CHO-ekspressjon
Oppløselig B7.1	Immunisering, immunoassayer	Ja
B7.1-transfektant	Siling, ELISA	Ja
B7.1/Ig-fusjonsprotein	Hemmingsundersøkelser, vasking	Ja
B7.2-transfektant	Siling, ELISA	Ja
B7.2/Ig-fusjonsprotein	Hemmingsundersøkelser, vasking	Ikke enda fullført
CTLA4-transfektant	Hemmingsundersøkelser	Ikke enda fullført
CTLA4/Ig	Hemmingsundersøkelser	Ikke enda fullført

Tilgjengeligheten av disse reagenser, sammen med monoklonale antistoffer mot B7.1 (L3074) (Becton Dickinson, 1994) og B7.2 (Fun-1) (Engel et al., Blood, 84, 1402-1407 (1994)) og rensset geite- og kanin-antiserum, spesielt utviklet for å påvise ape-Fab-fragmenter, forenkler identifikasjonen av antistoffer som har de ønskede egenskaper.

### Eksempel 3

10 *Undersøkelse av immunresponsen i synomolge aper på oppløselig og celleforbundet humant B7.1*

For å bedømme mulighetene for å fremstille ape-antistoffer mot humant B7.1-antigen, rensset vi først rekombinant SB7.1 fra CHO-cellemedium ved affinitetskromatografi med en L307.4-sepharose-affinitetskolonne. SB7.1 ble deretter injisert sammen med et hjelpestoff til fem voksne synomolge javaaper. Etter et tidsrom på 3-4 måneder med booster-immuniseringer, ble serum fra apene som var blitt immunisert med SB7.1 eller humane SB-celler, testet for antigenbinding.

Serumprøver fra de fem apene som var blitt immunisert med SB7.1, og fra tre ytterligere dyr som var blitt immunisert med B7.1-positive humane SB-celler, ble testet for å be-

stemme antistofftiteren mot membranforbundet B7.1 som ble uttrykt i transfiserte CHO-celler. Resultatene som er oppsummert på Figur 3, viste at fire av fem aper som var blitt immunisert med affinitetsrenset SB7.1, produserte antistofftitere på over 1:5000. De tre dyrene som var blitt immunisert med SB-celler som inneholdt cellebundet B7.1, uttrykte lavere antistofftitere som varierte fra 1:1400 til 1:2800.

#### Eksempel 4

10 Vi rensset antistoffer fra seraene fra alle åtte immuniserte aper, ved bruk av SB7.1-sepharose, og testet deretter deres evne til å bindes til 1) SB7.1-bestrøkne plater i en ELISA-undersøkelse; 2) antigenpositive B-celler og 3) B7.1-CHO-transfektomaer. I tillegg ble de bedømt for sin evne til å  
15 blokkere B-celle-vekselspill, målt ifølge IL-2-produksjonen og opptaket av tritiert tymidin i en blandet lymfocytreaksjon (MLR). For T-celle bindingseksperimenter dyrket man humane perifere blodlymfocytter med "buffy coat" i 3-6 dager i nærvær av PHA-stimulator. B7-bindingen ble påvist ved  
20 et radioassay ved bruk av <sup>125</sup>I-radiomerket oppløselig B7.1 (SB7.1).

#### Eksempel 5

*Direkte binding av ape-antistoffer til radiomerket SB7*

<sup>125</sup>I-radiomerket SB7.1 ble testet for sin binding til anti-B7.1-antistoffer med 4, 1 og 0,25 µg/ml i oppløsning. Resultatene som vises i Tabell 2, tyder på at de fleste antistoffer som ble fremstilt av aper som var blitt immunisert med SB7.1, hadde evnen til å binde det affinitetsrensede <sup>125</sup>I-SB7.1 på en konsentrasjonavhengig måte. For å bedømme  
30 spesifisiteten av bindingen til merket SB7.1, utførte man konkurranseeksperimenter med umerket SB7.1 med antistoffene fra to dyr. Affinitetsrensede antistoffer fra apene 1133 og 1144 ble bestrøket på mikrobrønnplater med 400 ng/brønn.

Affinitetsrenset umerket SB7.1 (500 og 100 ng/brønn) ble brukt som konkurrent. Resultatene som vises på Figur 4, demonstrerer at SB7.1-preparater virksomt hemmer  $^{125}\text{I}$ -SB7.1 i å bindes til antistoffene.

5

Tabell 2

Binding av SB7-I $^{125}$  til ape-antistoffer som var blitt affinitetsrenset på en SB7-sepharose-affinitetskolonne

Antistoff ( $\mu\text{g/ml}$ )	Ape nr.							
	769	908	1133	1135	1137	1139	1144	1146
4	175	213	9056	12771	4318	226	5781	108
1	106	142	6569	7940	3401	110	3901	80
0,25	95	104	1803	2673	1219	100	1186	94

Dataen angir de midlere verdier for to tester, og representerer det bundne SB7-I $^{125}$  i cpm.

10

Eksempel 6

*Direkte binding av radiomerkede affinitetsrensede ape-antistoffer til B7 $^+$ -celler og hemming med SB7.1.*

Affinitetsrensede og radiomerkede ape-anti-B7.1-antistoffer fra ape-PR135 ble sammenlignet med radiomerkede L307.4-MAb'er for sin direkte binding til B7-positive humane SB-celler. Som spesifisitettskontroll tilsatte man umerket SB7.1 (0,002-20  $\mu\text{g/ml}$ ) for å konkurrere med begge de radiomerkede antistoffer. Vi demonstrerte at ape-antistoffene kan binde celleforbundet B7.1, og at de hemmes med SB7.1, som vist på Figur 5. En hemming på inntil 90% ble observert for SB7.1.

15

20

Eksempel 7

*Direkte binding av radiomerket B7-Ig-fusjonsprotein til aktiverte T-celler, og hemming med affinitetsrensede ape-antistoffer*

5 Humane perifere blod-T-lymfocytter ble aktivert i 3-6 dager og testet for en direkte binding av <sup>125</sup>I-B7.1-Ig. På grunn av oppreguleringen av Fc-receptor på aktiverte humane T-celler, var det nødvendig å på forhånd inkubere cellene med varme-aggregert immunoglobulin fra før immuniseringen for å  
10 blokkere Fc-bindingsstillingene før tilsetning av B7.1-Ig til cellene. En bakgrunnskontroll som brukte SP2/0-murine myleomaceller, ble innlemmet i testen for å tillate en rettelse av bakgrunnsbindingen. Figur 6 viser at hemmingen av <sup>125</sup>I-B7.1-Ig-fusjonsproteinets binding til aktiverte T-celler,  
15 ble oppnådd med affinitetsrensede ape-antistoffer ved konsentrasjoner fra 200 til 8 µg/ml. Umerkede SB7.1- og L307.4-MAb'er som ble brukt som kontroller, hemmet også virksomt B7.1-Ig-fusjonsproteinets cellebinding.

Eksempel 8

20 *Hemming av IL-2-produksjonen i blandede lymfocytreaksjoner med ape-anti-B7-antistoffer*

En blokkering av CD28/B7-vekselspillet fører til hemming av T-lymfocytters IL-2-produksjon. I eksperimentet som vises på Figur 7, bedømte man affinitetsrensede ape-antistoffer  
25 fra to aper som var blitt immunisert med SB7.1 (apene 1137 og 1135) og én ape som var blitt immunisert med B7-positiv SB-celler (ape 1146) for deres evne til å hemme en aktivering av humane T-celler i en blandet lymfocytreaksjon (MLR), målt ifølge hemmingen av IL-2-produksjonen. Resultatene av dette eksperiment viser at affinitetsrensede anti-B7.1-antistoffer fra apene 1146 og 1137 hemmet IL-2-produk-  
30 sjonen når de ble tilsatt i en konsentrasjon på 50 µg/ml. Antistoffene fra ape 1135 kunne ikke bedømmes ved de to



høyeste konsentrasjoner grunnet en mangel på materiale, men gav en signifikant hemming ved lavere konsentrasjoner. Murint MAb L307.4 virket hemmende ved konsentrasjoner på 10 µg/ml. Andre ape-sera som ble testet ved disse konsentrasjoner, gav negative resultater (dataen ikke vist). Disse resultater viser at minst tre av apene som ble immunisert med oppløselige eller membranbundne former av B7-antigen, produserer B7-blokkerende antistoffer med immunosuppressivt potensial.

10

Eksempel 9

*Undersøkelse av kryssreaktiviteten i B7.1-immunisert ape-serum med B7.2-antigen*

Antistoffer som ble fremstilt mot B7.1, skal testes for sin kryssreaktivitet med B7.2. Foreløpige resultater med affinitetsrensede B7.1-antistoffer fra B7.1-immune sera, tydet på en binding til B7.2-transfiserede CHO-celler (ikke vist). Disse data bør bekreftes ved bruk av oppløselige B7.2-Ig-reagenser. Vi skal først isolere ytterligere ape-antistoffer fra B7.1-immuniserte dyr ved affinitetskromatografi på B7.1-Ig-sepharose. Deretter skal vi fremstille og rense B7.2-Ig fra CHO-celler, i tilstrekkelige mengder for å fremstille en B7.2-Ig-sepharose-affinitetskolonne. Fra den B7.1-spesifikke antistoffpopulasjon skal vi velge de antistoffer som kryssreagerer med B7.2 ifølge bindingen til B7.2-Ig-sepharosekolonnen. Eventuelle kryssreaktive antistoffer som identifiseres, skal ytterligere karakteriseres ifølge sin direkte binding til både B7.1- og B7.2-transfiserede CHO-celler og ifølge hemmingen av en binding av B7.1-Ig til B7.2-transfiserede celler.

Eksempel 10*Generering av en fag-fremvisningssamling*

Rekombinante fag-fremvisningssamlinger genereres fra B7.1- og B7.2-immune aper. Lymfeknute- og benmargbiopsier utføres  
 5 7-12 dager etter immuniseringen for å samle RNA-anrikede B-celler og plasmaceller. RNA isoleres fra lymfocytene ved metoden som beskrives av Chomczynski, Anal. Biochem., 162 (1), 156-159 (1987). RNA omdannes til cDNA ved bruk av en oligo-dT-primer og revers transkriptase. Den første kjede-  
 10 cDNA deles opp i alikvoter og PCR-amplifiseres ved bruk av de tidligere beskrevne kappa-, lambda- og tung kjede-Fd-region-primersett som ble beskrevet tidligere, og enten Pfu-polymerase (Stratagene, San Diego, USA) eller Taq-polymerase (Promega, Madison, USA). Tung kjede-PCR-amplifiserte  
 15 produkter samles, spaltes med Xho VSpe I-restriksjonsenzymer og klones inn i vektoren pMS. Deretter samles lett kjede-PCR-produktene, spaltes med Sac I/Xba I-restriksjonsenzymer og klones for å danne den rekombinante samling. XLI-Blue-*E. coli* omdannes med samlings-DNA og super-infiseres med VCSM13 for å gi de fag-fremvisende antistoffer.  
 20 Samlingen vaskes i fire omganger på polystyrenbrønner som er bestrøket med B7.1- eller B7.2-antigen. Enkelte fag-kloner fra hver vaskeomgang analyseres. pMS-vektor-DNA isoleres, og gen III skjæres ut. Oppløselige Fab-fragmenter genereres og testes i ELISA-undersøkelser for sin binding til  
 25 B7.1 og B7.2.

Eksempel 11*Karakterisering av fag-Fab-fragmenter*

Apnes fag-Fab-fragmenter karakteriseres ifølge sin spesifitet og sin evne til å blokkere B7.1-Ig- og B7.2-Ig-bindingen til CTLA-4-Ig eller CTLA-4-transfisererte celler. Fag-fragmentene karakteriseres også ifølge sin kryssreaktivitet etter de første fire vaskeomganger på B7-typen som ble

brukt for immunisering, for å velge fragmentene med høy affinitet. Fab-fragmenter som identifiseres etter fire vaskeomganger på enten B7.1- eller B7.2-antigen-bestrøkne plater, oppskaleres ved infeksjon, og dyrkes i 24 timers gjæringskulturer av *E. coli*. Fragmentene isoleres ved Kodak FLAG-binding til en anti-FLAG-affinitetskolonje. Rensede fag-Fab'er testes for sin affinitet ifølge en ELISA-undersøkelse som baserer seg på bindingsmodifisert Scatchard-analyse (Kato et al., J. Chem. BioEng., 76: 451-454 (1993)) med geite-anti-ape-Fab-antistoffer eller anti-FLAG-MAb som er konjugert med pepperrot-peroksydase. Anti-ape-Fab-reagensene skal absorberes mot human tung kjede-konstant parti-Ig for å fjerne en eventuell kryssreaktivitet med B7-Ig. Kd-verdiene beregnes for hvert fragment etter målinger av den direkte binding til B7.1-Ig- eller B7.2-Ig-bestrøkne plater.

#### Eksempel 12

##### *Fag-Fab-fragmenters blokkering av CTLA-4/B7-bindingen*

Fab-fragmentene som blokkerer bindingen av B7-Ig mest virksomt ved de laveste konsentrasjoner, velges som førende kandidater. Utvalget gjøres ved konkurrerende <sup>125</sup>I-B7-Ig-binding til CTLA-4-Ig eller CTLA-4-transfisererte celler. Andre utvalgskriterier omfatter blokkeringen av en blandet lymfocytreaksjon (MLR) ifølge hemmingen av <sup>3</sup>H-tymidin-opp-taket i responderceller (Azuma et al., J. Exp. Med., 177: 845-850; Azuma et al., Nature, 301: 76-79 (1993)) og direkte analyse av IL-2-produksjonen ved hjelp av IL-2-assaysett. De tre eller fire kandidater som viser seg å være mest virksomme i MLR-hemmingsassayet og CTLA-4-bindingssayet, velges for kloning inn i den ovenfor beskrevne pattedyr-ekspresjonsvektor, for transfeksjon av CHO-celler og ekspresjon av chimeriske ape/humane antistoffer.

Eksempel 13*Generering av ape-heterohybridomaer*

Ape-heterohybridomaer som utsondrer monoklonale antistoffer, genereres utifra eksisterende immuniserte dyr, hvis  
 5 serum testet positivt for B7.1 og/eller B7.2. Lymfeknute-  
 biopsier tas fra dyrene som tester positivt for et av, el-  
 ler begge, antigenene. Metoden for fremstilling av hybridomaer ligner den anerkjente metode som brukes ved generering  
 av ape-anti-CD4-antistoffer (Newman et al. (1992), Biotech-  
 10 nology, 10, 1455-1460). Fra aper med høye serumtitere fjerner man under bedøvelse snitt av ingvinale lymfeknuter.  
 Lymfocyttene vaskes vekk fra vevet og kombinerer med  
 KH6/B5-heteromyelomaceller (Carrol et al., J. Immunol.  
Meth., 89: 61-72 (1986)) ved bruk av polyetylenglykol  
 15 (PEG). Hybridomaene velges på H.A.T.-medium og stabiliseres ved gjentatt subkloning i 96-brønners plater.

Monoklonale ape-antistoffer som er spesifikke for B7.1-antigen, testes for sin kryssreaktivitet med B7.2. Ape-anti-B7-antistoffene skal karakteriseres ifølge blokkeringen av  
 20 B7/CTLA-4-bindingen ved bruk av <sup>125</sup>I-B7-Ig-bindingsassayet. Hemmingen av MLR ifølge 3H-tymidin-opptaket og en direkte  
 måling av IL-2-produksjonen brukes for å velge tre kandidater. To kandidater vil fortsette i fase II-undersøkelser og  
 uttrykkes i CHO-celler mens man gjentar alle funksjonelle  
 25 undersøkelser. For å utvikle en dyremodell for *in vivo*-farmakologi, skal anti-B7-antistoffene testes på celler fra  
 forskjellige dyrearter. Bestemmelsen av en dyremodell vil gjøre det mulig å utføre prekliniske undersøkelser for den  
 valgte kliniske indikasjon.

30

Eksempel 14

Som beskrevet ovenfor, har man ved bruk av de ovennevnte heterohybridoma-metoder identifisert fire førende ape-anti-

B7.1-antistoffer: 16C10, 7B6 og 7C10. Disse antistoffer ble karakterisert som følger:

For å demonstrere ape-antistoffenes evne til å blokkere den fysiske vekselvirkning mellom CTLA4-Ig, inkuberte man forskjellige konsentrasjoner av ape-anti-B7.1-antistoffer og 5  
umerket CTLA4-Ig med radiomerket CTLA4-Ig<sup>125</sup>. Resultatene av hemmingsassayet viste at IC50 (den konsentrasjon av inhibitor som fører til 50 % hemming) for ape-antistoffene er:

10           a: 7C10:       0,39 µg/Ml  
              b: 16C10:     1,60 µg/Ml  
              d: 7B6:       39,0 µg/Ml

Scatchard-analyse viste at de tilsynelatende affinitetskonstanter (Kd) for ape-antistoffenes binding til B7-Ig-be-  
15 strøkne plater var omtrent:

              a: 7C10:       6,2 × 10<sup>-9</sup> M  
              b: 16C10:     8,1 × 10<sup>-9</sup> M  
              c: 7B6:       10,7 × 10<sup>-9</sup> M

Antistoffene ble testet *in vitro* i et blandet lymfocytreaksjonsassay (MLR). MLR-undersøkelsen viste at alle fire anti-B7.1-antistoffer hemmer IL-2-produksjonen, i forskjellig grad:  
20

              a: 7B6:       5,0 µg/Ml  
              b: 16C10:     0,1 µg/Ml  
25           d: 7C10:       5,0 µg/Ml

Ape-anti-B7.1-antistoffene ble testet for sin evne til å binde B7 på humane perifere blodlymfocytter (PBL). FACS-analyse viste at alle fire ape-antistoffene testet positive.

Ape-antistoffene 16C10, 7B6 og 7C10 ble testet for sin Clq-binding ifølge FACS-analyse. Resultatene viste at 7C10-ape-Ig hadde en sterk Clq-binding etter inkubasjon med B7.1-transfisererte CHO-celler. 16C10 testet negativ, liksom også ape-antistoffet 7B6.

#### Eksempel 15

Ved bruk av metodologien for primatiserte antistoffer (USSN 08/379.072, og ved bruk av NEOSPLA-vektorsystemet som vises på Figur 2), klonet man de tunge og lette variable domener av 7C10, 7B6 og 16C10, og primatiserte former derav er blitt fremstilt i CHO-celler ved bruk av NEOSPLA-vektorsystemet. Aminosyre- og nukleinsyresekvensene for den lette og tunge kjede av primatisert 7C10, lette og tunge kjede av primatisert 7B6 og lette og tunge kjede av primatisert 16C10, vises på henholdsvis Figurene 8a, 8b, 9a, 9b, 10a og 10b.

Det forventes at disse primatiserte antistoffer med sin sannsynligvis lave antigenisitet og humane effektorfunksjon, vil være velegnet for bruk som terapeutika. Faktisk har man nylig vist at primatisert 16C10 oppviser en binding til humant Cl<sub>q</sub>, mens 16C10 ikke bindes dertil.

**P A T E N T K R A V**

1. Monoklonalt apeantistoff, en primatisert form derav eller et fragment av det monoklonale apeantistoffet eller primatiserte form derav som binder til en epitop av humant  
5 CD80 antigen og som også blir bundet av et antistoff omfattende lett- og tungkjede variabelt område polypeptidsekvenser valgt fra gruppen bestående av:

(a) de lett- og tungkjede variabelt område polypeptidsekvenser av antistoff 7C10 angitt i henholdsvis SEQ ID NO: 1  
10 og SEQ ID NO: 2;

(b) de lett- og tungkjede variabelt område polypeptidsekvenser av antistoff 7B6 angitt i henholdsvis SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 4; og

(c) de lett- og tungkjede variabelt område polypeptidsekvenser av antistoff 16C10 angitt i henholdsvis SEQ ID NO: 5  
15 og SEQ ID NO: 6.

2. Monoklonalt ape-antistoff, en primatisert form derav eller et fragment av det monoklonale ape-antistoff eller en primatisert form derav ifølge krav 1, som binder til humant  
20 CD80 antigen og omfatter lett- og tungkjede variabelt område polypeptidsekvenser valgt fra gruppen bestående av:

(a) de lett- og tungkjede variabelt område polypeptidsekvenser av antistoff 7C10 angitt i henholdsvis SEQ ID NO: 1 og SEQ ID NO: 2;

25 (b) de lett- og tungkjede variabelt område polypeptidsekvenser av antistoff 7B6 angitt i henholdsvis SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 4; og

(c) de lett- og tungkjede variabelt område polypeptidsekvenser av antistoff 16C10 angitt i henholdsvis SEQ ID NO: 5  
30 og SEQ ID NO: 6.

3. Monoklonalt antistoff ifølge krav 1 eller krav 2, og som omfatter et lettkjede konstant område av en human antistoff lett kjede, og et tungkjede konstant område av en human antistoff tung kjede.
- 5 4. Monoklonalt antistoff ifølge krav 3, hvilket omfatter et tungkjede konstant område valgt fra humant gamma 1 konstant område, humant gamma 4 konstant område og humant gamma 4 PE konstant område.
- 10 5. Monoklonalt antistoff ifølge ethvert av kravene 1 til 4 som er et utmagrende antistoff.
6. Monoklonalt antistoff ifølge ethvert av kravene 1 til 4 som er et ikke-utmagrende antistoff.
7. Antistoff-fragment ifølge krav 1 eller krav 2 som er et  $(Fab')_2$ -, Fab- eller Fv-fragment.
- 15 8. Isolert nukleinsyre omfattende nukleotidsekvenser som koder for de lett- og tungkjede variabelt område polypeptidsekvenser av et antistoff i henhold til krav 1 eller krav 2.
- 20 9. Isolert nukleinsyre ifølge krav 8, hvilken omfatter nukleotidsekvenser valgt fra gruppen bestående av:
- (a) nukleotidsekvensene angitt i SEQ ID NO: 1 og SEQ ID NO: 2;
- (b) nukleotidsekvensene angitt i SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 4; og
- 25 (c) nukleotidsekvensene angitt i SEQ ID NO: 5 og SEQ ID NO: 6.
10. Dyrket celle som danner et antistoff eller fragment derav i henhold til ethvert av kravene 1 - 7.



11. Dyrket celle ifølge krav 10, hvilken er et CHO transfektom.

12. Dyrket celle ifølge krav 10, hvilken danner et chimerisk antistoff som binder til humant CD80 antigen og som  
5 omfatter et lettkjede konstant område av en human antistoff lett kjede, et tungkjede konstant område av en humant antistoff tung kjede samt variable områder omfattende polypeptidsekvenser valgt fra gruppen bestående av:

(a) de lett- og tungkjede variabelt område polypeptidsekvenser av antistoff 7C10 angitt i henholdsvis SEQ ID NO: 1  
10 og SEQ ID NO: 2;

(b) de lett- og tungkjede variabelt område polypeptidsekvenser av antistoff 7B6 angitt i henholdsvis SEQ ID NO: 3  
og SEQ ID NO: 4; og

15 (c) de lett- og tungkjede variabelt område polypeptidsekvenser av antistoff 16C10 angitt i henholdsvis SEQ ID NO: 5  
og SEQ ID NO: 6.

13. Farmasøytisk sammensetning som inneholder et antistoff eller fragment derav som binder til humant CD80 antigen  
20 ifølge ethvert av kravene 1 til 7.

14. Anvendelse av en sammensetning omfattende minst et antistoff eller fragment derav som binder til humant CD80 antigen ifølge ethvert av kravene 1 til 7, for fremstilling  
25 av et medikament til behandling eller forebygging av en sykdom eller lidelse som er valgt fra gruppen bestående av autoimmun sykdom eller lidelse, transplantat-mot-verts-sykdom, avstøtning av et transplantert organ eller vev, infeksjonssykdom, inflammatorisk sykdom og B-celle-lymfom.

15. Anvendelse ifølge krav 14 for fremstilling av et medikament til behandling eller forebygging av transplantat-  
30 mot-vertssykdom eller avstøtning at et transplantert organ

eller vev, hvor transplantatet eller det transplanterte organ eller vev er valgt fra nyre, hjerte, lunge, benmarg, hud og kornea.

16. Anvendelse ifølge krav 14, hvor sykdommen eller lidelsen er valgt fra gruppen bestående av AIDS, Hashimotos thyroittid, myasthenia gravis, uveitis, nefrotisk syndrom, atopisk dermatitt, kontakt-dermatitt, seborrhøisk dermatitt, eksematøs dermatitt, fotsopp, pemfigus, bulløs pemfigus, epidermolysis bullosa, urtikaria, angiødemer, vaskulittides, erytema, kutan eosinofila, alopecia areata, reversibel obstruktiv luftveissykdom, migrene, eksem, rhinitt, andre allergiske tilstander, proliferativ sykdom, tarminflammasjon, søliaki, proctitis, eosinofilia gastroenteritis, mastocytose, Chrons sykdom og ulcerativ kolitt.
17. Anvendelse ifølge krav 14, hvor den autoimmune lidelse er valgt fra idiopatisk trombocytopenia purpura, lupus erythematosus, systemisk lupus erythematosus, type 1 diabetes mellitus, rheumatoid artritt, psoriasis, multippel sklerose og aplastisk anemi.
18. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 13, hvor nevnte farmasøytiske sammensetning inneholder et antistoff eller fragment derav ifølge krav 1, og nevnte antistoff eller fragment binder til en epitop av humant CD80 antigen som også blir bundet av et antistoff omfattende de lett- og tungkjede variabelt område polypeptidsekvenser av antistoff 16C10 som angitt i henholdsvis SEQ ID NO: 5 og SEQ ID NO: 6.
19. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 13, hvor nevnte farmasøytiske sammensetning inneholder et antistoff ifølge krav 1, og nevnte antistoff er en primatisert form av et monoklonalt ape-antistoff som binder til en epitop av humant CD80 antigen som også blir bundet av et antistoff omfattende de lett- og tungkjede variabelt område polypeptid-

sekvenser av antistoff 16C10 som angitt i henholdsvis SEQ ID NO: 5 og SEQ ID NO: 6.

20. Anvendelse av sammensetning omfattende minst et antistoff eller fragment ifølge ethvert av kravene 1 til 7 for fremstilling av et medikament til behandling eller forebygging av et B-celle-lymfom.

21. Anvendelse ifølge krav 20, hvor sammensetningen omfatter minst et antistoff eller fragment ifølge krav 1, og nevnte antistoff eller fragment binder også til en epitop av humant CD80 antigen som også blir bundet av et antistoff omfattende lett- og tungkjede variabelt område polypeptidsekvenser av antistoff 16C10 som angitt i henholdsvis SEQ ID NO: 5 og SEQ ID NO: 6.

22. Anvendelse ifølge krav 20, hvor sammensetningen omfatter et antistoff ifølge krav 1, og nevnte antistoff er en primatisert form av det monoklonale apeantistoffet som binder til en epitop av humant CD80 antigen som også blir bundet av et antistoff omfattende lett- og tungkjede variabelt område polypeptidsekvenser av antistoff 16C10 som angitt i henholdsvis SEQ ID NO: 5 og SEQ ID NO: 6.

23. Monoklonalt antistoff ifølge krav 1, hvor nevnte antistoff er en primatisert form av et monoklonalt ape-antistoff som binder til en epitop av humant CD80 antigen som også blir bundet av et antistoff omfattende de lett- og tungkjede variabelt område polypeptidsekvenser av antistoff 16C10 som angitt i henholdsvis SEQ ID NO: 5 og SEQ ID NO: 6.

24. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 13 for anvendelse som et immunundertrykkende middel.

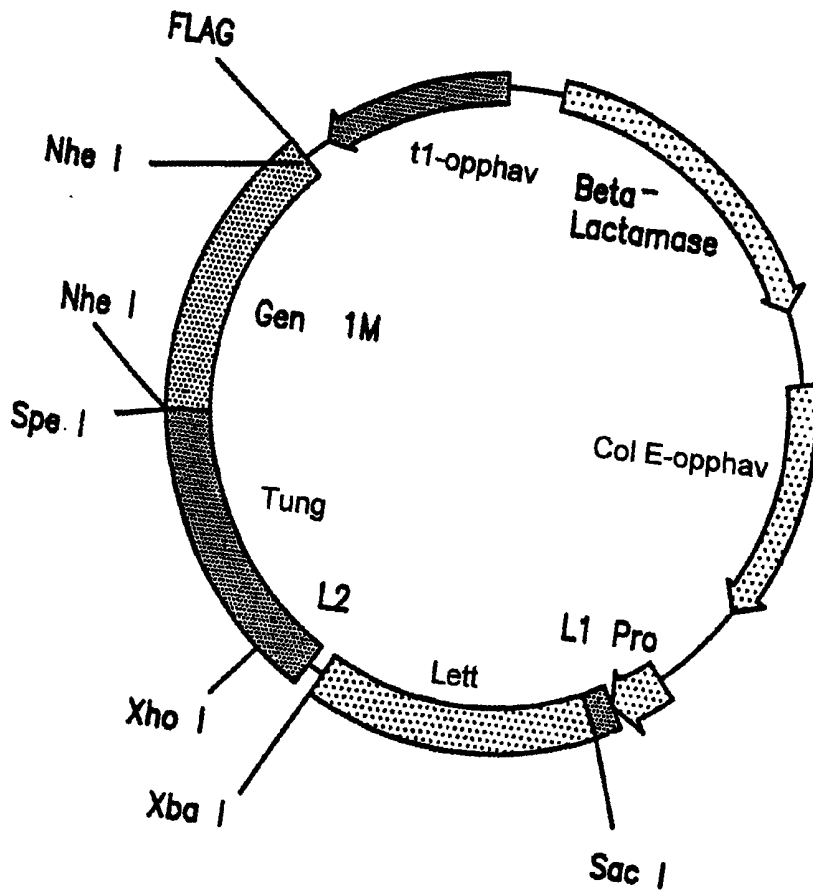


FIG. 1

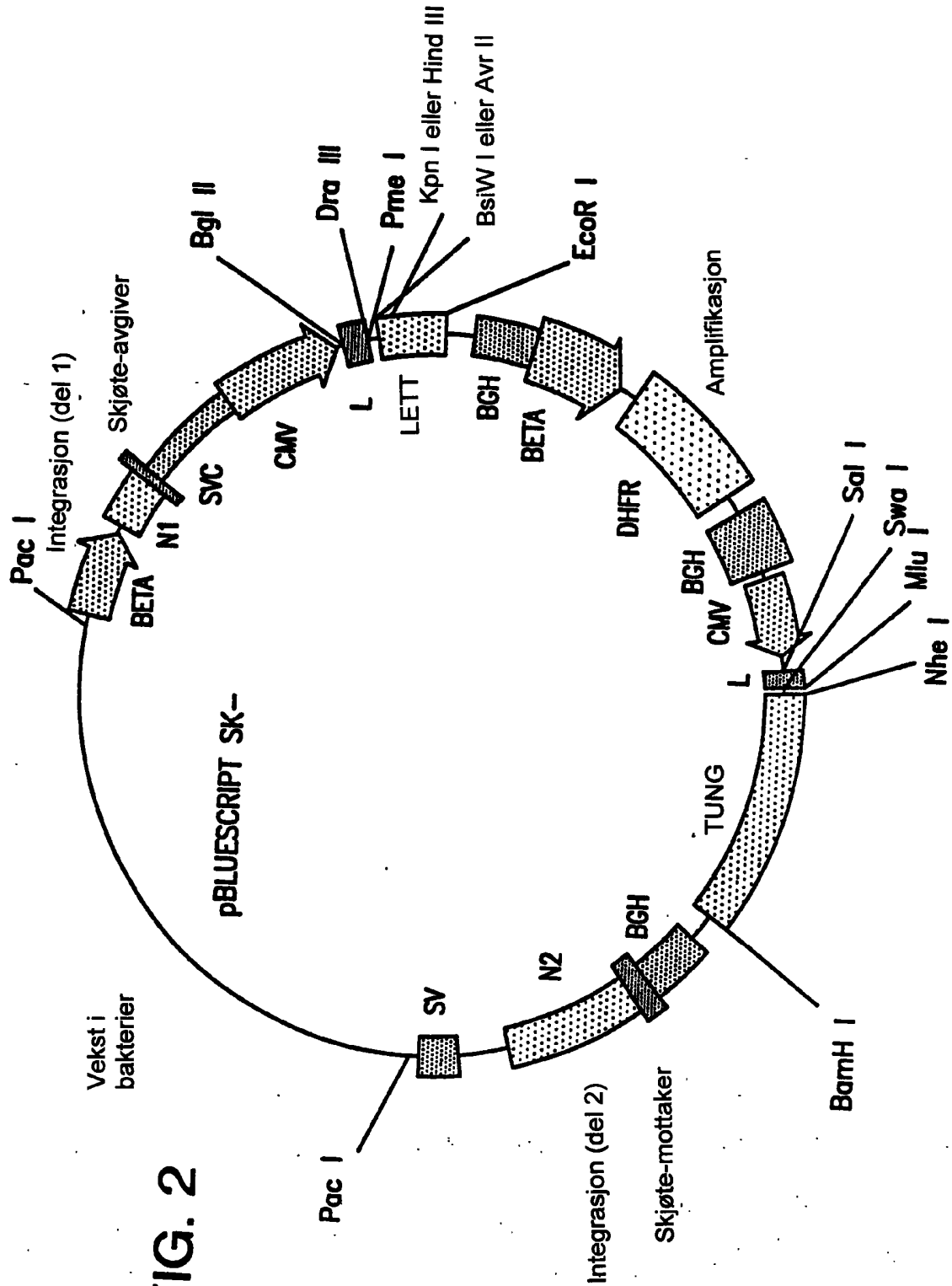


FIG. 2

FIG. 3

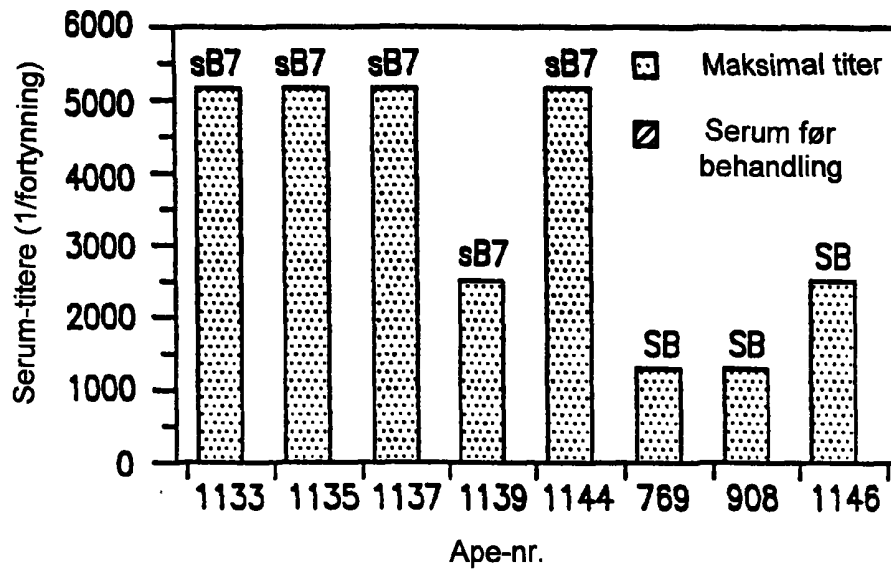


FIG. 4

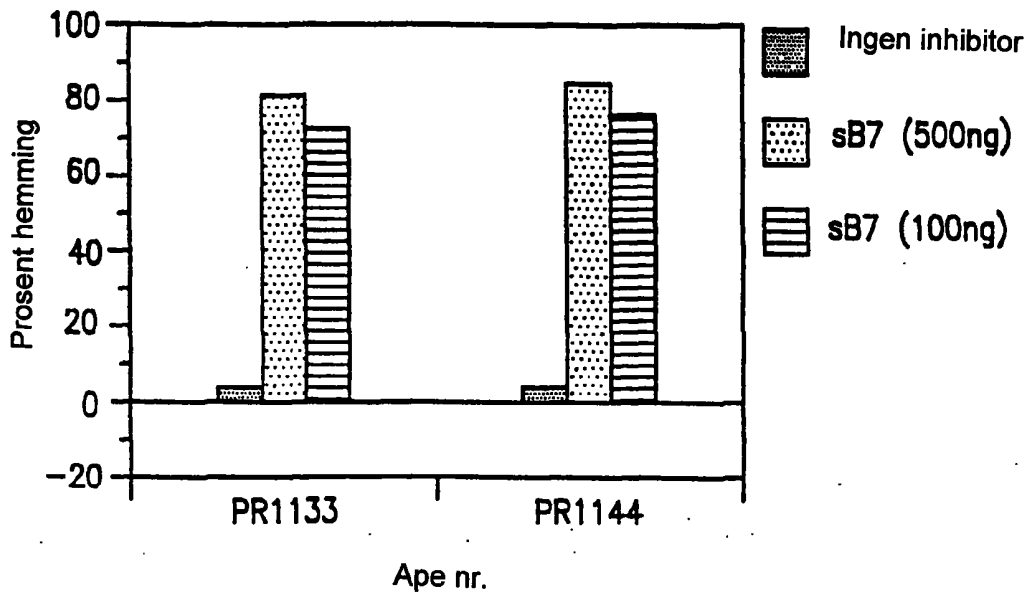


FIG. 5

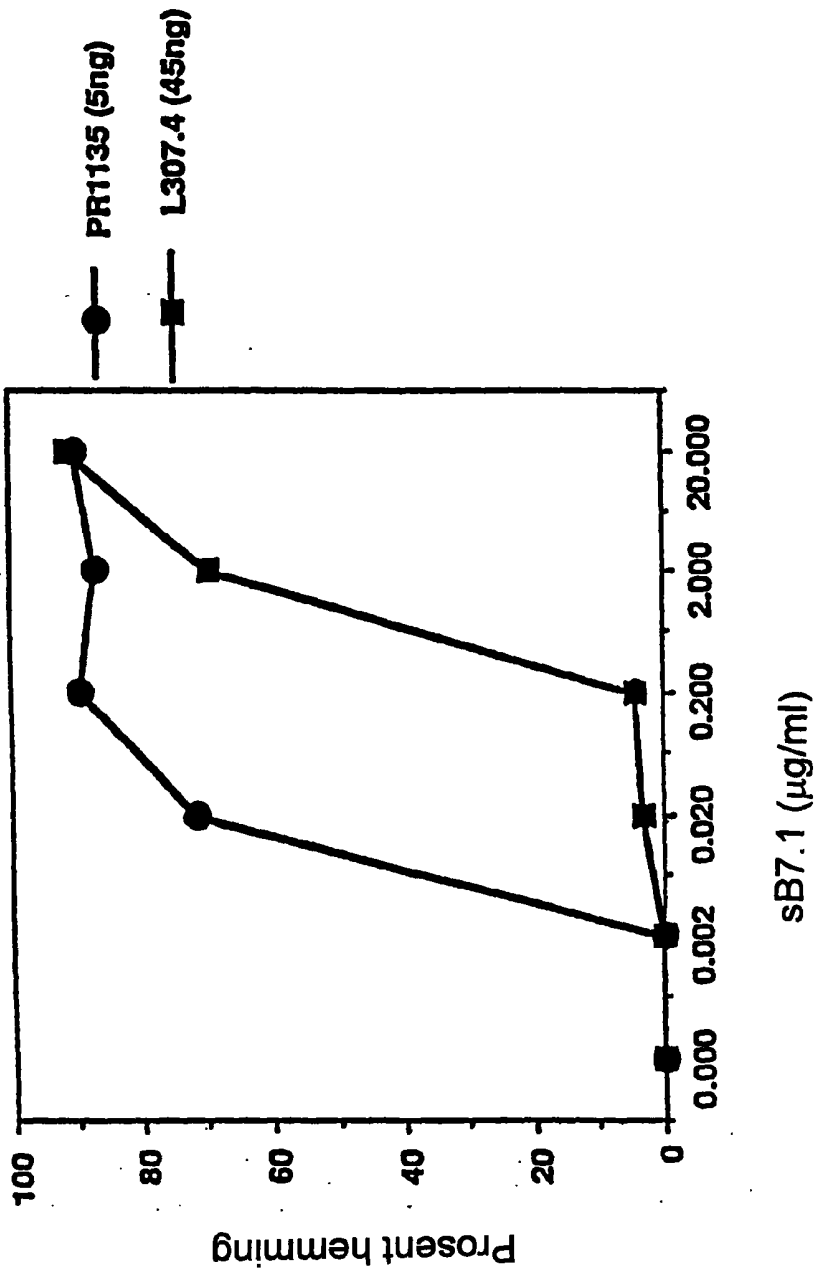


FIG. 6

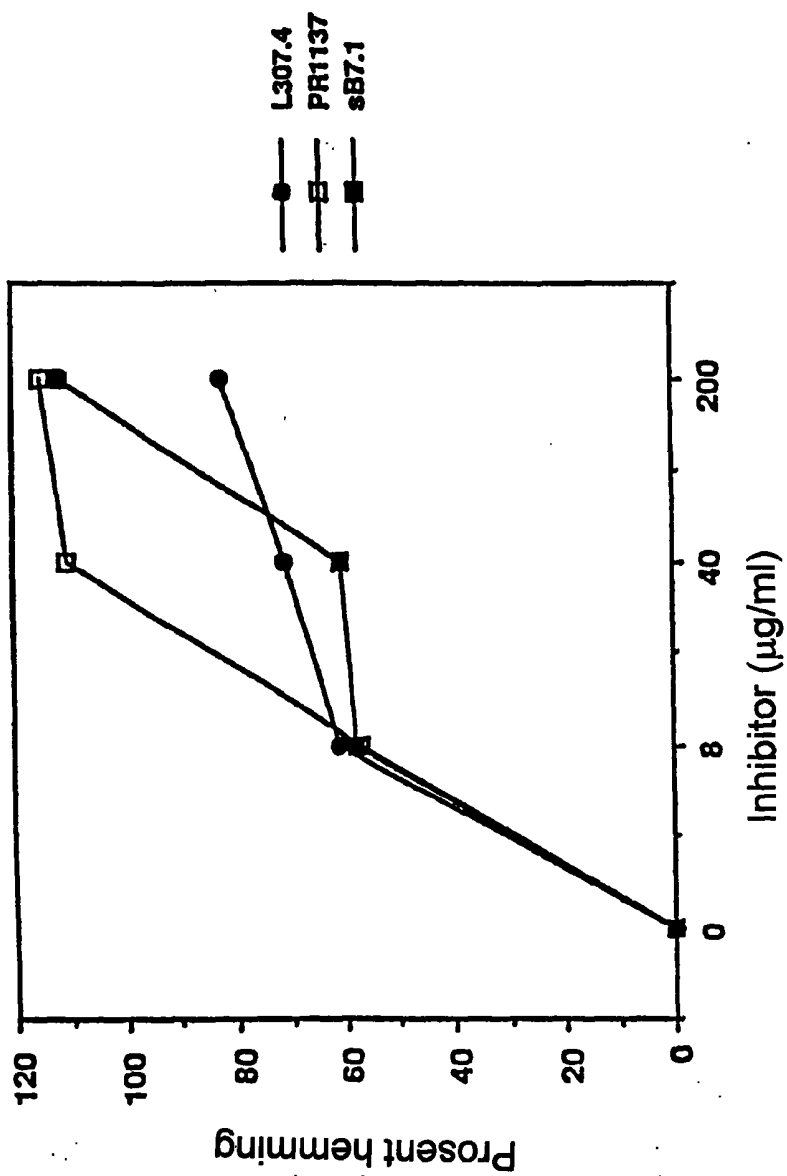
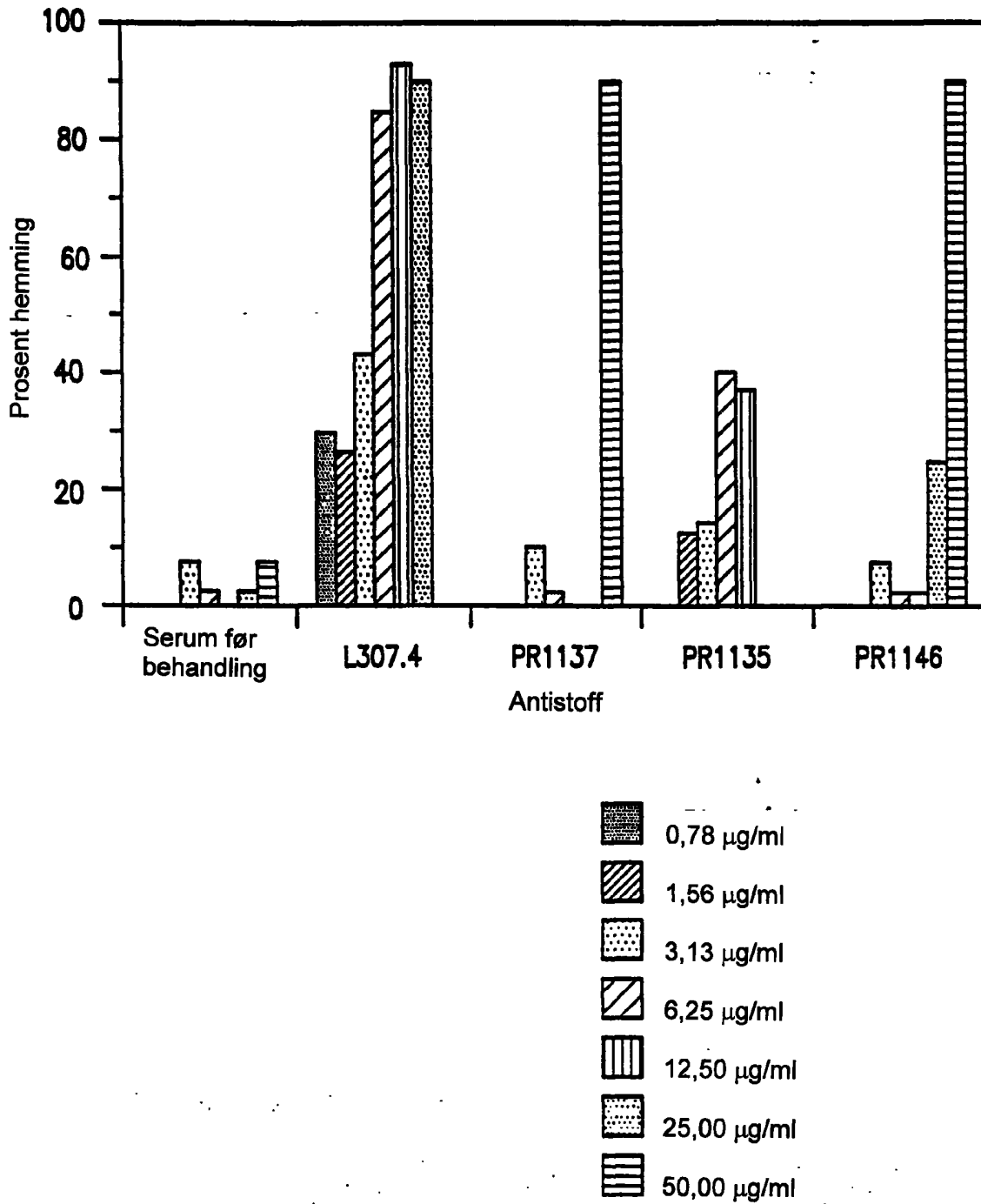




FIG. 7



Ramme 1	M	R	V	P	A	Q	L	L	G	L	L	L	L	W	L	P	G	A	R	
	ATG	AGG	GTC	CCC	GCT	CAG	CTC	CTG	GGG	CTC	CTG	CTG	CTC	TGG	CTC	CCA	GGT	GCA	CGA	
			9			18			27				36		45			54		
C	A	Y	E	L	T	Q	P	P	S	V	S	V	S	P	G	Q	T	A	R	I
TGT	GCC	TAT	GAA	CTG	ACT	CAG	CCA	CCC	TCG	GTG	TCA	GTG	TCC	CCA	GGA	CAG	ACG	GCC	AGG	ATC
	63			72			81			90			99			108			117	
T	C	G	G	D	N	S	R	N	E	Y	V	H	W	Y	Q	Q	K	P	A	R
ACC	TGT	GGG	GGA	GAC	AAC	AGT	AGA	AAT	GAA	TAT	GTC	CAC	TGG	TAC	CAG	CAG	AAG	CCA	GCG	CGG
	126			135			144			153			162			171			180	
λ	P	I	L	V	I	Y	D	D	S	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F	S
GCC	CCT	ATA	CTG	GTC	ATC	TAT	GAT	GAT	AGT	GAC	CGG	CCC	TCA	GGG	ATC	CCT	GAG	CGA	TTC	TCT
	189			198			207			216			225			234			243	
G	S	K	S	G	N	T	A	T	L	T	I	N	G	V	E	A	G	D	E	A
GGC	TCC	AAA	TCA	GGG	AAC	ACC	GCC	ACC	CTG	ACC	ATC	AAC	GGG	GTC	GAG	GCC	GGG	GAT	GAG	GCT
	252			261			270			279			288			297			306	
D	Y	Y	C	Q	V	W	D	R	A	S	D	H	P	V	F	G	G	G	T	R
GAC	TAT	TAC	TGT	CAG	GTG	TGG	GAC	AGG	GCT	AGT	GAT	CAT	CCG	GTC	TTC	GGA	GGA	GGG	ACC	CGG
	315			324			333			342			351			360			369	
V	T	V	L	G	Q	P	K	A	A	P	S	V	T	L	F	P	P	S	S	E
GTG	ACC	GTC	CTA	GGT	CAG	CCC	AAG	GCT	GCC	CCC	TCG	GTC	ACT	CTG	TTC	CCG	CCC	TCC	TCT	GAG
	378			387			396			405			414			423			432	
E	L	Q	A	N	K	A	T	L	V	C	L	I	S	D	F	Y	P	G	A	V
GAG	CTT	CAA	GCC	AAC	AAG	GCC	ACA	CTG	GTG	TGT	CTC	ATA	AGT	GAC	TTC	TAC	CCG	GGA	GCC	GTG
	441			450			459			468			477			486			495	
T	V	A	W	K	A	D	S	S	P	V	K	A	G	V	E	T	T	T	P	S
ACA	GTG	GCC	TGG	AAG	GCA	GAT	AGC	AGC	CCC	GTC	AAG	GCG	GGA	GTG	GAG	ACC	ACC	ACA	CCC	TCC
	504			513			522			531			540			549			558	
K	Q	S	N	N	K	Y	A	A	S	S	Y	L	S	L	T	P	E	Q	W	K
AAA	CAA	AGC	AAC	AAC	AAG	TAC	GCG	GCC	AGC	AGC	TAC	CTG	AGC	CTG	ACG	CCT	GAG	CAG	TGG	AAG
	567			576			585			594			603			612			621	
S	H	R	S	Y	S	C	Q	V	T	H	E	G	S	T	V	E	K	T	V	A
TCC	CAC	AGA	AGC	TAC	AGC	TGC	CAG	GTC	ACG	CAT	GAA	GGG	AGC	ACC	GTG	GAG	AAG	ACA	GTG	GCC
	630			639			648			657			666			675			684	
P	T	E	C	S																
CCT	ACA	GAA	TGT	TCA	TGA															
	693			702																

FIG. 8a

Ramme 1	M	K	H	L	W	F	F	L	L	L	V	A	A	P	R	W	V	L	S	
	ATG	AAA	CAC	CTG	TGG	TTC	TTC	CTC	CTC	CTG	GTG	GCA	GCT	CCC	AGA	TGG	GTC	CTG	TCC	
			9			18			27			36			45			54		
Q	V	K	L	Q	Q	W	G	E	G	L	L	Q	P	S	E	T	L	S	R	T
CAG	GTG	AAG	CTG	CAG	CAG	TGG	GGC	GAA	GGA	CCT	CTG	CAG	CCT	TCG	GAG	ACC	CTG	TCC	CGC	ACC
	63			72			81			90			99			108			117	
C	V	V	S	G	G	S	I	S	G	Y	Y	Y	W	T	W	I	R	Q	T	P
TGC	GTT	GTC	TCT	GGT	GGC	TCC	ATC	AGC	GGT	TAC	TAC	TAC	TGG	ACC	TGG	ATC	CGC	CAG	ACC	CCA
	126			135			144			153			162			171			180	
G	R	G	L	E	W	I	G	H	I	Y	G	N	G	A	T	T	N	Y	N	P
GGG	AGG	GGA	CTG	GAG	TGG	ATT	GGC	CAT	ATT	TAT	GGT	AAT	GGT	GCG	ACC	ACC	AAC	TAC	AAT	CCC
	189			198			207			216			225			234			243	
S	L	K	S	R	V	T	I	S	K	D	T	S	K	N	Q	F	F	L	N	L
TCC	CTC	AAG	AGT	CGA	GTC	ACC	ATT	TCA	AAA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CAG	TTC	TTC	CTG	AAC	TGG
	252			261			270			279			288			297			306	
N	S	V	T	D	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	R	P	D	C
AAT	TCT	GTG	ACC	GAC	GCG	GAC	ACG	GCC	GTC	TAT	TAC	TGT	GCG	AGA	GCC	CCT	CGC	CCT	GAT	TGC
	315			324			333			342			351			360			369	
T	T	I	C	Y	G	G	W	V	D	V	W	G	P	G	D	L	V	T	V	S
ACA	ACC	ATT	TGT	TAT	GGC	GGC	TGG	GTC	GAT	GTC	TGG	GGC	CCG	GGA	GAC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCC
	378			387			396			405			414			423			432	
S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G
TCA	GCT	AGC	ACC	AAG	GGC	CCA	TCG	GTC	TTC	CCC	CTG	GCA	CCC	TCC	TCC	AAG	AGC	ACC	TCT	GGG
	441			450			459			468			477			486			495	
G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
GGC	ACA	GCG	GCC	CTG	GGC	TGC	CTG	GTC	AAG	GAC	TAC	TTC	CCC	GAA	CCG	GTG	ACG	GTG	TCG	TGG
	504			513			522			531			540			549			558	
N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L
AAC	TCA	GGC	GCC	CTG	ACC	AGC	GGC	GTG	CAC	ACC	TTC	CCG	GCT	GTC	CTA	CAG	TCC	TCA	GGA	CTC
	567			576			585			594			603			612			621	
Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
TAC	TCC	CTC	AGC	AGC	GTG	GTG	ACC	GTG	CCC	TCC	AGC	AGC	TTG	GGC	ACC	CAG	ACC	TAC	ATC	TGC
	630			639			648			657			666			675			684	
N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	A	E	P	K	S	C	D
AAC	GTG	AAT	CAC	AAG	CCC	AGC	AAC	ACC	AAG	GTG	GAC	AAG	AAA	GCA	GAG	CCC	AAA	TCT	TGT	GAC
	693			702			711			720			729			738			747	
K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
AAA	ACT	CAC	ACA	TGC	CCA	CCG	TGC	CCA	GCA	CCT	GAA	CTC	CTG	GGG	GGA	CCG	TCA	GTC	TTC	CTC
	756			765			774			783			792			801			810	
F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V
TTC	CCC	CCA	AAA	CCC	AAG	GAC	ACC	CTC	ATG	ATC	TCC	CGG	ACC	CCT	GAG	GTG	ACA	TGC	GTG	GTG
	819			828			837			846			855			864			873	
V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
GTG	GAC	GTG	AGC	CAC	GAA	GAC	CCT	GAG	GTC	AAG	TTC	AAC	TGG	TAC	GTG	GAC	GGC	GTG	GAG	GTG
	882			891			900			909			918			927			936	

FIG. 8b-1

H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V
CAT	AAT	GCC	AAG	ACA	AMG	CCG	CGG	GAG	GAG	CAG	TAC	MAC	AGC	ACG	TAC	CGT	GTG	GTC	AGC	GTC
945			954			963			972		981			990				999		
L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K
CTC	ACC	GTC	CTG	CAC	CAG	GAC	TGG	CTG	AAT	GGC	AAG	GAG	TAC	AAG	TGC	AAG	GTC	TCC	MAC	AAA
1008			1017			1026			1035		1044			1053				1062		
A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q
GCC	CTC	CCA	GCC	CCC	ATC	GAG	AAA	ACC	ATC	TCC	AAA	GCC	AAA	GGG	CAG	CCC	CGA	GAA	CCA	CAG
1071			1080			1089			1098		1107			1116				1125		
V	Y	T	L	P	P	S	R	D	E	L	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L
GTG	TAC	ACC	CTG	CCC	CCA	TCC	CGG	GAT	GAG	CTG	ACC	AAG	AAC	CAG	GTC	AGC	CTG	ACC	TGC	CTG
1134			1143			1152			1161		1170			1179				1188		
V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N
GTC	AAA	GCC	TTC	TAT	CCC	AGC	GAC	ATC	GCC	GTG	GAG	TGG	GAG	AGC	AAT	GGG	CAG	CCG	GAG	AAC
1197			1206			1215			1224		1233			1242				1251		
N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L
AAC	TAC	AAG	ACC	ACG	CCT	CCC	GTG	CTG	GAC	TCC	GAC	GCC	TCC	TTC	TTC	CTC	TAC	AGC	AAG	CTC
1260			1269			1278			1287		1296			1305				1314		
T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A
ACC	GTG	GAC	AAG	AGC	AGG	TGG	CAG	CAG	GGG	AAC	GTC	TTC	TCA	TGC	TCC	GTG	ATG	CAT	GAG	GCT
1323			1332			1341			1350		1359			1368				1377		
L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G	K					
CTG	CAC	AAC	CAC	TAC	ACG	CAG	AAG	AGC	CTC	TCC	CTG	TCT	CCG	GGT	AAA	TGA				
1386			1395			1404			1413		1422			1431						

FIG. 8b-2

Ramme 1	M	S	L	P	A	Q	L	L	G	L	L	L	L	C	V	P	G	S	S		
	ATG	AGC	CTC	CCT	GCT	CAG	CTC	CTC	GGG	CTG	CTA	TTG	CTC	TGC	GTC	CCC	GGG	TCC	AGT		
			9			18			27			36			45			54			
	G	E	V	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	I	T	P	G	E	P	A	S
	GGG	GAA	GTT	GTG	ATG	ACT	CAG	TCT	CCA	CTG	TCC	CTT	CCC	ATC	ACA	CCT	GGA	GAG	CCG	GCC	TCC
	63				72			81			90			99			108			117	
	I	S	C	R	S	S	Q	S	L	K	H	S	N	G	D	T	F	L	S	W	Y
	ATC	TCC	TGT	AGG	TCT	AGT	CAA	AGC	CTT	AAA	CAC	AGT	AAT	GGA	GAC	ACC	TTC	CTG	AGT	TGG	TAT
	126				135			144			153			162			171			180	
	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	R	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	D	S	G
	CAG	CAG	AAG	CCA	GGC	CAA	CCT	CCA	AGG	CTC	CTG	ATT	TAT	AAG	GTT	TCT	AAC	CGG	GAC	TCT	GGG
	189				198			207			216			225			234			243	
	V	P	D	R	F	S	G	S	G	A	G	T	D	F	T	L	K	I	S	A	V
	GTC	CCA	GAC	AGA	TTC	AGC	GGC	AGT	GGG	GCA	GGG	ACA	GAT	TTC	ACA	CTG	AAA	ATC	AGC	GCA	GTG
	252				261			270			279			288			297			306	
	E	A	E	D	V	G	V	Y	F	C	G	Q	G	T	R	T	P	P	T	F	G
	GAG	GCT	GAA	GAT	GTT	GGG	GTT	TAT	TTC	TGC	GGG	CAA	GGT	ACA	AGG	ACT	CCT	CCC	ACT	TTC	GGC
	315				324			333			342			351			360			369	
	G	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P
	GGA	GGG	ACC	AAG	GTG	GAA	ATC	AAA	CGT	ACG	GTG	GCT	GCA	CCA	TCT	GTC	TTC	ATC	TTC	CCG	CCA
	378				387			396			405			414			423			432	
	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P
	TCT	GAT	GAG	CAG	TTG	AAA	TCT	GGA	ACT	GCC	TCT	GTT	GTG	TGC	CTG	CTG	AAT	AAC	TTC	TAT	CCC
	441				450			459			468			477			486			495	
	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S
	AGA	GAG	GCC	AAA	GTA	CAG	TGG	AAG	GTG	GAT	AAC	GCC	CTC	CAA	TCG	GGT	AAC	TCC	CAG	GAG	AGT
	504				513			522			531			540			549			558	
	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K
	GTC	ACA	GAG	CAG	GAC	AGC	AAG	GAC	AGC	ACC	TAC	AGC	CTC	AGC	AGC	ACC	CTG	ACG	CTG	AGC	AAA
	567				576			585			594			603			612			621	
	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P
	GCA	GAC	TAC	GAG	AAA	CAC	AAA	GTC	TAC	GCC	TGC	GAA	GTC	ACC	CAT	CAG	GGC	CTG	AGC	TGC	CCC
	630				639			648			657			666			675			684	
	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	.										
	GTC	ACA	AAG	AGC	TTC	AAC	AGG	GGA	GAG	TGT	TGA										
	693				702			711			720										

FIG. 9a

Ramme 1	M	G	W	S	L	I	L	L	F	L	V	A	V	A	T	R	V	Q	C	
	ATG	GGT	TGG	AGC	CTC	ATC	TTG	CTC	TTC	CTT	GTC	GCT	GTT	GCT	ACG	CGT	GTC	CAG	TGT	
			9			18			27			36			45			54		
E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	V	S	
GAG	GTG	CAA	CTG	GTG	GAG	TCT	GGG	GGA	GCC	TTG	GTC	CAG	CCT	GGC	GGG	TCC	CTG	AGA	GTC	TCC
	63			72			81			90			99			108			117	
C	A	V	S	G	F	T	F	S	D	H	Y	M	Y	W	F	R	Q	A	P	G
TGT	GCA	GTC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTC	AGT	GAC	CAC	TAC	ATG	TAT	TGG	TTC	CGC	CAG	GCT	CCA	GGG
	126			135			144			153			162			171			180	
K	G	P	E	W	V	G	F	I	R	N	K	P	N	G	G	T	T	E	Y	A
AAG	GGG	CCG	GAA	TGG	GTA	GGT	TTC	ATT	AGA	AAC	AAA	CCG	AAC	GGT	GGG	ACA	ACA	GAA	TAC	GCC
	189			198			207			216			225			234			243	
A	S	V	K	D	R	F	T	I	S	R	D	D	S	K	S	I	A	Y	L	Q
GCG	TCT	GTG	AAA	GAC	AGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	GAT	GAT	TCC	AAA	AGC	ATC	GCC	TAT	CTG	CAA
	252			261			270			279			288			297			306	
M	S	S	L	K	I	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	T	S	Y	I	S	H
ATG	AGC	AGC	CTG	AAA	ATC	GAG	GAC	ACG	GCC	GTC	TAT	TAC	TGT	ACT	ACA	TCC	TAC	ATT	TCA	CAT
	315			324			333			342			351			360			369	
C	R	G	G	V	C	Y	G	G	Y	F	E	F	W	G	Q	G	A	L	V	T
TGT	CGG	GGT	GGT	GTC	TGC	TAT	GGA	GGT	TAC	TTC	GAA	TTC	TGG	GGC	CAG	GGC	GCC	CTG	GTC	ACC
	378			387			396			405			414			423			432	
V	S	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T
GTC	TCC	TCA	GCT	AGC	ACC	AAG	GGC	CCA	TGC	GTC	TTC	CCC	CTG	GCA	CCC	TCC	TCC	AAG	AGC	ACC
	441			450			459			468			477			486			495	
S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V
TCT	GGG	GGC	ACA	GGG	GCC	CTG	GGC	TGC	CTG	GTC	AAG	GAC	TAC	TTC	CCC	GAA	CCG	GTG	ACG	GTG
	504			513			522			531			540			549			558	
S	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S
TCG	TGG	AAC	TCA	GGC	GCC	CTG	ACC	AGC	GGC	GTG	CAC	ACC	TTC	CCG	GCT	GTC	CTA	CAG	TCC	TCA
	567			576			585			594			603			612			621	
G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y
GGA	CTC	TAC	TCC	CTC	AGC	AGC	GTG	GTG	ACC	GTG	CCC	TCC	AGC	AGC	TTG	GGC	ACC	CAG	ACC	TAC
	630			639			648			657			666			675			684	
I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	A	E	P	K	S
ATC	TGC	AAC	GTG	AAT	CAC	AAG	CCC	AGC	AAC	ACC	AAG	GTG	GAC	AAG	AAA	GCA	GAG	CCC	AAA	TCT
	693			702			711			720			729			738			747	
C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V
TGT	GAC	AAA	ACT	CAC	ACA	TGC	CCA	CCG	TGC	CCA	GCA	CCT	GAA	CTC	CTG	GGG	GGA	CCG	TCA	GTC
	756			765			774			783			792			801			810	
F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C
TTC	CTC	TTC	CCC	CCA	AAA	CCC	AAG	GAC	ACC	CTC	ATG	ATC	TCC	CGG	ACC	CCT	GAG	GTC	ACA	TGC
	819			828			837			846			855			864			873	
V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V
GTG	GTG	GTG	GAC	GTG	AGC	CAC	GAA	GAC	CCT	GAG	GTC	AAG	TTC	AAC	TGG	TAC	GTG	GAC	GGC	GTG
	882			891			900			909			918			927			936	

FIG. 9b-1

E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	
GAG	GTG	CAT	AAT	GCC	AAG	ACA	AAG	CCG	CGG	GAG	GAG	CAG	TAC	AAC	AGC	ACG	TAC	CGT	GTG	GTC	
	945			954			963			972			981			990				999	
S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	
AGC	GTC	CTC	ACC	GTC	CTG	CAC	CAG	GAC	TGG	CTG	AAT	GGC	AAG	GAG	TAC	AAG	TGC	AAG	GTC	TCC	
	1008			1017			1026			1035			1044			1053				1062	
N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	
AAC	AAA	GCC	CTC	CCA	GCC	CCC	ATC	GAG	AAA	ACC	ATC	TCC	AAA	GCC	AAA	GGG	CAG	CCC	CGA	GAA	
	1071			1080			1089			1098			1107			1116				1125	
P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	D	E	L	T	K	N	Q	V	S	L	T	
CCA	CAG	GTG	TAC	ACC	CTG	CCC	CCA	TCC	CGG	GAT	GAG	CTG	ACC	AAG	AAC	CAG	GTC	AGC	CTG	ACC	
	1134			1143			1152			1161			1170			1179				1188	
C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	
TGC	CTG	GTC	AAA	GGC	TTC	TAT	CCC	AGC	GAC	ATC	GCC	GTG	GAG	TGG	GAG	AGC	AAT	GGG	CAG	CCG	
	1197			1206			1215			1224			1233			1242				1251	
E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	
GAG	AAC	AAC	TAC	AAG	ACC	ACG	CCT	CCC	GTG	CTG	GAC	TCC	GAC	GGC	TCC	TTC	TTC	CTC	TAC	AGC	
	1260			1269			1278			1287			1296			1305				1314	
K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	
AAG	CTC	ACC	GTG	GAC	AAG	AGC	AGG	TGG	CAG	CAG	GGG	AAC	GTC	TTC	TCA	TGC	TCC	GTG	ATG	CAT	
	1323			1332			1341			1350			1359			1368				1377	
E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G	K				
GAG	GCT	CTG	CAC	AAC	CAC	TAC	ACG	CAG	AAG	AGC	CTC	TCC	CTG	TCT	CCG	GGT	AAA	TGA			
	1386			1395			1404			1413			1422			1431					

FIG. 9b-2

Ramme 1	M	R	V	P	A	Q	L	L	G	L	L	L	L	W	L	P	G	A	R	
	ATG	AGG	GTC	CCC	GCT	CAG	CTC	CTG	GGG	CTC	CTG	CTG	CTC	TGG	CTC	CCA	GGT	GCA	CGA	
			9			18			27			36		45				54		
C	E	S	V	L	T	Q	P	P	S	V	S	G	A	P	G	Q	K	V	T	I
TGT	GAG	TCT	GTC	CTG	ACA	CAG	CCG	CCC	TCA	GTG	TCT	GGG	GCC	CCA	GGG	CAG	AAG	GTC	ACC	ATC
	63		72			81			90			99		108				117		
S	C	T	G	S	T	S	N	I	G	G	Y	D	L	H	W	Y	Q	Q	L	P
TGG	TGC	ACT	GGG	AGC	ACC	TCC	AAC	ATT	GGA	GGT	TAT	GAT	CTA	CAT	TGG	TAC	CAG	CAG	CTC	CCA
	126		135			144			153			162		171				180		
G	T	A	P	K	L	L	I	Y	D	I	N	K	R	P	S	G	I	S	D	R
GGA	ACG	GCC	CCC	AAA	CTC	CTC	ATC	TAT	GAC	ATT	AAC	AAG	CGA	CCC	TCA	GGA	ATT	TCT	GAC	CGA
	189		198			207			216			225		234				243		
F	S	G	S	K	S	G	T	A	A	S	L	A	I	T	G	L	Q	T	E	D
TTC	TCT	GGC	TCC	AAG	TCT	GGT	ACC	GCG	GCC	TCC	CTG	GCC	ATC	ACT	GGG	CTC	CAG	ACT	GAG	GAT
	252		261			270			279			288		297				306		
E	A	D	Y	Y	C	Q	S	Y	D	S	S	L	N	A	Q	V	F	G	G	G
GAG	GCT	GAT	TAT	TAC	TGC	CAG	TCC	TAT	GAC	AGC	AGC	CTG	AAT	GCT	CAG	GTA	TTC	GGA	GGA	GGG
	315		324			333			342			351		360				369		
T	R	L	T	V	L	G	Q	P	K	A	A	P	S	V	T	L	F	P	P	S
ACC	CGG	CTG	ACC	GTC	CTA	GGT	CAG	CCC	AAG	GCT	GCC	CCC	TCG	GTC	ACT	CTG	TTC	CCG	CCC	TCC
	378		387			396			405			414		423				432		
S	E	E	L	Q	A	N	K	A	T	L	V	C	L	I	S	D	F	Y	P	G
TCT	GAG	GAG	CTT	CAA	GCC	AAC	AAG	GCC	ACA	CTG	GTG	TGT	CTC	ATA	AGT	GAC	TTC	TAC	CCG	GGA
	441		450			459			468			477		486				495		
A	V	T	V	A	W	K	A	D	S	S	P	V	K	A	G	V	E	T	T	T
GCC	GTG	ACA	GTG	GCC	TGG	AAG	GCA	GAT	AGC	AGC	AGC	GTC	AAG	GCG	GGA	GTG	GAG	ACC	ACC	ACA
	504		513			522			531			540		549				558		
P	S	K	Q	S	N	N	K	Y	A	A	S	S	Y	L	S	L	T	P	E	Q
CCC	TCC	AAA	CAA	AGC	AAC	AAC	AAG	TAC	GCG	GCC	AGC	AGC	TAC	CTG	AGC	CTG	ACG	CCT	GAG	CAG
	567		576			585			594			603		612				621		
W	K	S	H	R	S	Y	S	C	Q	V	T	H	E	G	S	T	V	E	K	T
TGG	AAG	TCC	CAC	AGA	AGC	TAC	AGC	TGC	CAG	GTG	ACG	CAT	GAA	GGG	AGC	ACC	GTG	GAG	AAG	ACA
	630		639			648			657			666		675				684		
V	A	P	T	E	C	S														
GTG	GCC	CCT	ACA	GAA	TGT	TCA	TGA													
	693		702			711														

FIG. 10a



Ramme 1	M	K	H	L	W	F	F	L	L	L	V	A	A	P	R	W	V	L	S		
	ATG	AAA	CAC	CTG	TGG	TTC	TTC	CTC	CTC	CTG	GTG	GCA	GCT	CCC	AGA	TGG	GTC	CTG	TCC		
			9			18			27			36			45			54			
	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	T
	CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TCG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TCG	GAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC
		63			72			81			90			99			108			117	
	C	A	V	S	G	G	S	I	S	G	G	Y	G	W	G	W	I	R	Q	P	P
	TGC	GCT	GTC	TCT	GGT	GGC	TCC	ATC	AGC	GGT	GGT	TAT	GGC	TGG	GGC	TGG	ATC	CGC	CAG	CCC	CCA
		126			135			144			153			162			171			180	
	G	K	G	L	E	W	I	G	S	F	Y	S	S	S	G	N	T	Y	Y	N	P
	GGG	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	ATT	GGG	AGT	TTC	TAT	AGT	AGT	AGT	GGG	AAC	ACC	TAC	TAC	AAC	CCC
		189			198			207			216			225			234			243	
	S	L	K	S	Q	V	T	I	S	T	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	K	L
	TCC	CTC	AAG	AGT	CAA	GTC	ACC	ATT	TCA	ACA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CAG	TTC	TCC	CTG	AAG	CTG
		252			261			270			279			288			297			306	
	N	S	M	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	V	R	D	R	L	F	S	V
	AAC	TCT	ATG	ACC	GCC	GCG	GAC	ACG	GCC	GTG	TAT	TAC	TGT	GTG	AGA	GAT	CGT	CTT	TTT	TCA	GTT
		315			324			333			342			351			360			369	
	V	G	M	V	Y	N	N	W	F	D	V	W	G	P	G	V	L	V	T	V	S
	GTT	GGA	ATG	GTT	TAC	AAC	AAC	TGG	TTC	GAT	GTC	TGG	GGC	CCG	GGA	GTC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCC
		378			387			396			405			414			423			432	
	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G
	TCA	GCT	AGC	ACC	AAG	GGC	CCA	TCG	GTC	TTC	CCC	CTG	GCA	CCC	TCC	TCC	AAG	AGC	ACC	TCT	GGG
		441			450			459			468			477			486			495	
	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
	GGC	ACA	GCG	GCC	CTG	GGC	TGC	CTG	GTC	AAG	GAC	TAC	TTC	CCC	GAA	CCG	GTG	ACG	GTG	TCG	TGG
		504			513			522			531			540			549			558	
	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L
	AAC	TCA	GGC	GCC	CTG	ACC	AGC	GGC	GTG	CAC	ACC	TTC	CCG	GCT	GTC	CTA	CAG	TCC	TCA	GGA	CTC
		567			576			585			594			603			612			621	
	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
	TAC	TCC	CTC	AGC	AGC	GTG	GTG	ACC	GTG	CCC	TCC	AGC	AGC	TTG	GGC	ACC	CAG	ACC	TAC	ATC	TGC
		630			639			648			657			666			675			684	
	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	A	E	P	K	S	C	D
	AAC	GTG	AAT	CAC	AAG	CCC	AGC	AAC	ACC	AAG	GTG	GAC	AAG	AAA	GCA	GAG	CCC	AAA	TCT	TGT	GAC
		693			702			711			720			729			738			747	
	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
	AAA	ACT	CAC	ACA	TGC	CCA	CCG	TGC	CCA	GCA	CCT	GAA	CTC	CTG	GGG	GGA	CCG	TCA	GTC	TTC	CTC
		756			765			774			783			792			801			810	
	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V
	TTC	CCC	CCA	AAA	CCC	AAG	GAC	ACC	CTC	ATG	ATC	TCC	CGG	ACC	CCT	GAG	GTC	ACA	TGC	GTG	GTG
		819			828			837			846			855			864			873	
	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
	GTG	GAC	GTG	AGC	CAC	GAA	GAC	CCT	GAG	GTC	AAG	TTC	AAC	TGG	TAC	GTG	GAC	GGC	GTG	GAG	GTG

FIG. 10b-1

882	891	900	909	918	927	936
H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V						
CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC						
945	954	963	972	981	990	999
L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K						
CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA						
1008	1017	1026	1035	1044	1053	1062
A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q						
GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GGC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG						
1071	1080	1089	1098	1107	1116	1125
V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L						
GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG						
1134	1143	1152	1161	1170	1179	1188
V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N						
GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC						
1197	1206	1215	1224	1233	1242	1251
N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L						
AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC						
1260	1269	1278	1287	1296	1305	1314
T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A						
ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT						
1323	1332	1341	1350	1359	1368	1377
L H N H Y T Q K S L S L S P G K .						
CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA						
1386	1395	1404	1413	1422	1431	

FIG. 10b-2

0233 NO sequence listing  
SEQUENCE LISTING

<110> ANDERSON, DARRELL R.  
HANNA, NABIL  
BRAMS, PETER  
HEARD, CHERYL

<120> INDENTIFICATION OF UNIQUE BINDING INTERACTIONS BETWEEN  
CERTAIN ANTIBODIES AND THE HUMAN B7.1 AND B7.2  
CO-STIMULATORY ANTIGENS

<130> 37003-0127653

<140> NO 19975598

<141> 1996-06-06

<150> PCT/US96/10053

<151> 1996-06-06

<150> US 08/487,550

<151> 1995-06-07

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 705

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(702)

<400> 1

```

atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg ctc ctg ctg ctc tgg ctc cca 48
Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Pro
  1                    5                10                15

ggg gca cga tgt gcc tat gaa ctg act cag cca ccc tcg gtg tca gtg 96
Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val
                    20                25                30

tcc cca gga cag acg gcc agg atc acc tgt ggg gga gac aac agt aga 144
Ser Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asp Asn Ser Arg
                    35                40                45

aat gaa tat gtc cac tgg tac cag cag aag cca gcg cgg gcc cct ata 192
Asn Glu Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Arg Ala Pro Ile
                    50                55                60

ctg gtc atc tat gat gat agt gac cgg ccc tca ggg atc cct gag cga 240
Leu Val Ile Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Ser Gly Ile Pro Glu Arg
  65                70                75                80

ttc tct ggc tcc aaa tca ggg aac acc gcc acc ctg acc atc aac ggg 288
Phe Ser Gly Ser Lys Ser Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Asn Gly
                    85                90                95

gtc gag gcc ggg gat gag gct gac tat tac tgt cag gtg tgg gac agg 336
Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Arg
                    100                105                110

gct agt gat cat ccg gtc ttc gga gga ggg acc cgg gtg acc gtc cta 384
Ala Ser Asp His Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Thr Val Leu
                    115                120                125

```

0233 NO sequence listing

ggt cag ccc aag gct gcc ccc tcg gtc act ctg ttc ccg ccc tcc tct	432
Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser	
130 135 140	
gag gag ctt caa gcc aac aag gcc aca ctg gtg tgt ctc ata agt gac	480
Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp	
145 150 155 160	
ttc tac ccg gga gcc gtg aca gtg gcc tgg aag gca gat agc agc ccc	528
Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro	
165 170 175	
gtc aag gcg gga gtg gag acc acc aca ccc tcc aaa caa agc aac aac	576
Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn	
180 185 190	
aag tac gcg gcc agc agc tac ctg agc ctg acg cct gag cag tgg aag	624
Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys	
195 200 205	
tcc cac aga agc tac agc tgc cag gtc acg cat gaa ggg agc acc gtg	672
Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val	
210 215 220	
gag aag aca gtg gcc cct aca gaa tgt tca tga	705
Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser	
225 230	
<210> 2	
<211> 1431	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220>	
<221> CDS	
<222> (1)..(1428)	
<400> 2	
atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctc ctg gtg gca gct ccc aga tgg	48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp	
1 5 10 15	
gtc ctg tcc cag gtg aag ctg cag cag tgg ggc gaa gga ctt ctg cag	96
Val Leu Ser Gln Val Lys Leu Gln Gln Trp Gly Glu Gly Leu Leu Gln	
20 25 30	
cct tcg gag acc ctg tcc cgc acc tgc gtt gtc tct ggt ggc tcc atc	144
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Arg Thr Cys Val Val Ser Gly Gly Ser Ile	
35 40 45	
agc ggt tac tac tac tgg acc tgg atc cgc cag acc cca ggg agg gga	192
Ser Gly Tyr Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Thr Pro Gly Arg Gly	
50 55 60	
ctg gag tgg att ggc cat att tat ggt aat ggt gcg acc acc aac tac	240
Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Tyr Gly Asn Gly Ala Thr Thr Asn Tyr	
65 70 75 80	
aat ccc tcc ctc aag agt cga gtc acc att tca aaa gac acg tcc aag	288
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys	
85 90 95	
aac cag ttc ttc ctg aac ttg aat tct gtg acc gac gcg gac acg gcc	336
Asn Gln Phe Phe Leu Asn Leu Asn Ser Val Thr Asp Ala Asp Thr Ala	
100 105 110	

0233 NO sequence listing

gtc Val	tat Tyr	tac Tyr 115	tgt Cys	gcg Ala	aga Arg	ggc Gly 120	cct Pro	cgc Arg	cct Pro	gat Asp	tgc Cys 125	aca Thr	acc Thr	att Ile	tgt Cys	384
tat Tyr	ggc Gly 130	ggc Gly	tgg Trp	gtc Val	gat Asp	gtc Val 135	tgg Trp	ggc Gly	ccg Pro	gga Gly	gac Asp 140	ctg Leu	gtc Val	acc Thr	gtc Val	432
tcc Ser 145	tca Ser	gct Ala	agc Ser	acc Thr	aag Lys 150	ggc Gly	cca Pro	tcg Ser	gtc Val	ttc Phe 155	ccc Pro	ctg Leu	gca Ala	ccc Pro	tcc Ser 160	480
tcc Ser	aag Lys	agc Ser	acc Thr	tct Ser 165	ggg Gly	ggc Gly	aca Thr	gcg Ala	gcc Ala 170	ctg Leu	ggc Gly	tgc Cys	ctg Leu	gtc Val 175	aag Lys	528
gac Asp	tac Tyr	ttc Phe 180	ccc Pro	gaa Glu	ccg Pro	gtg Val	acg Thr	gtg Val 185	tcg Ser	tgg Trp	aac Asn	tca Ser	ggc Gly 190	gcc Ala	ctg Leu	576
acc Thr	agc Ser	ggc Gly 195	gtg Val	cac His	acc Thr	ttc Phe	ccg Pro 200	gct Ala	gtc Val	cta Leu	cag Gln	tcc Ser 205	tca Ser	gga Gly	ctc Leu	624
tac Tyr	tcc Ser 210	ctc Leu	agc Ser	agc Ser	gtg Val 215	gtg Val 215	acc Thr	gtg Val	ccc Pro	tcc Ser	agc Ser 220	agc Ser	ttg Leu	ggc Gly	acc Thr	672
cag Gln 225	acc Thr	tac Tyr	atc Ile	tgc Cys	aac Asn 230	gtg Val	aat Asn	cac His	aag Lys	ccc Pro 235	agc Ser	aac Asn	acc Thr	aag Lys	gtg Val 240	720
gac Asp	aag Lys	aaa Lys	gca Ala 245	gag Glu	ccc Pro	aaa Lys	tct Ser	tgt Cys	gac Asp 250	aaa Lys	act Thr	cac His	aca Thr	tgc Cys 255	cca Pro	768
ccg Pro	tgc Cys	cca Pro	gca Ala 260	cct Pro	gaa Glu	ctc Leu	ctg Leu	ggg Gly 265	gga Gly	ccg Pro	tca Ser	gtc Val	ttc Phe 270	ctc Leu	ttc Phe	816
ccc Pro	cca Pro	aaa Lys 275	ccc Pro	aag Lys	gac Asp	acc Thr	ctc Leu 280	atg Met	atc Ile	tcc Ser	cgg Arg	acc Thr 285	cct Pro	gag Glu	gtc Val	864
aca Thr	tgc Cys 290	gtg Val	gtg Val	gtg Val	gac Asp	gtg Val 295	agc Ser	cac His	gaa Glu	gac Asp	cct Pro 300	gag Glu	gtc Val	aag Lys	ttc Phe	912
aac Asn 305	tgg Trp	tac Tyr	gtg Val	gac Asp	ggc Gly 310	gtg Val	gag Glu	gtg Val	cat His	aat Asn 315	gcc Ala	aag Lys	aca Thr	aag Lys	ccg Pro 320	960
cgg Arg	gag Glu	gag Glu	cag Gln	tac Tyr 325	aac Asn	agc Ser	acg Thr	tac Tyr	cgt Arg 330	gtg Val	gtc Val	agc Ser	gtc Val	ctc Leu 335	acc Thr	1008
gtc Val	ctg Leu	cac His 340	cag Gln	gac Asp	tgg Trp	ctg Leu	aat Asn	ggc Gly 345	aag Lys	gag Glu	tac Tyr	aag Lys	tgc Cys 350	aag Lys	gtc Val	1056
tcc Ser	aac Asn 355	aaa Lys	gcc Ala	ctc Leu	cca Pro	gcc Ala 360	ccc Pro	atc Ile	gag Glu	aaa Lys	acc Thr 365	atc Ile	tcc Ser	aaa Lys	gcc Ala	1104
aaa Lys	ggg Gly 370	cag Gln	ccc Pro	cga Arg	gaa Glu	cca Pro 375	cag Gln	gtg Val	tac Tyr	acc Thr	ctg Leu 380	ccc Pro	cca Pro	tcc Ser	cgg Arg	1152

0233 NO sequence listing

gat	gag	ctg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	1200
Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	
385					390					395					400	
ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	cag	ccg	1248
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	
				405				410						415		
gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	1296
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	
			420				425						430			
ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	cag	1344
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	
		435				440						445				
ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	cac	1392
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	
	450					455					460					
tac	acg	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	ggt	aaa	tga				1431
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys					
465					470					475						
<210>	3															
<211>	720															
<212>	DNA															
<213>	Homo sapiens															
<220>																
<221>	CDS															
<222>	(1)..(717)															
<400>	3															
atg	agc	ctc	cct	gct	cag	ctc	ctc	ggg	ctg	cta	ttg	ctc	tgc	gtc	ccc	48
Met	Ser	Leu	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Cys	Val	Pro	
1				5				10						15		
ggg	tcc	agt	ggg	gaa	ggt	gtg	atg	act	cag	tct	cca	ctg	tcc	ctt	ccc	96
Gly	Ser	Ser	Gly	Glu	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	
			20					25					30			
atc	aca	cct	gga	gag	ccg	gcc	tcc	atc	tcc	tgt	agg	tct	agt	caa	agc	144
Ile	Thr	Pro	Gly	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	
		35					40					45				
ctt	aaa	cac	agt	aat	gga	gac	acc	ttc	ctg	agt	tgg	tat	cag	cag	aag	192
Leu	Lys	His	Ser	Asn	Gly	Asp	Thr	Phe	Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	
	50					55					60					
cca	ggc	caa	cct	cca	agg	ctc	ctg	att	tat	aag	ggt	tct	aac	cgg	gac	240
Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Asp	
65					70					75					80	
tct	ggg	gtc	cca	gac	aga	ttc	agc	ggc	agt	ggg	gca	ggg	aca	gat	ttc	288
Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Gly	Thr	Asp	Phe	
				85				90						95		
aca	ctg	aaa	atc	agc	gca	gtg	gag	gct	gaa	gat	ggt	ggg	ggt	tat	ttc	336
Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Ala	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Phe	
			100					105					110			
tgc	ggg	caa	ggt	aca	agg	act	cct	ccc	act	ttc	ggc	gga	ggg	acc	aag	384
Cys	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Thr	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	
		115					120					125				
gtg	gaa	atc	aaa	cgt	acg	gtg	gct	gca	cca	tct	gtc	ttc	atc	ttc	ccg	432

0233 NO sequence listing

Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	
130						135					140					
cca	tct	gat	gag	cag	ttg	aaa	tct	gga	act	gcc	tct	gtt	gtg	tgc	ctg	480
Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	160
145					150					155						
ctg	aat	aac	ttc	tat	ccc	aga	gag	gcc	aaa	gta	cag	tgg	aag	gtg	gat	528
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	175
			165						170							
aac	gcc	ctc	caa	tcg	ggt	aac	tcc	cag	gag	agt	gtc	aca	gag	cag	gac	576
Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	190
			180					185								
agc	aag	gac	agc	acc	tac	agc	ctc	agc	agc	acc	ctg	acg	ctg	agc	aaa	624
Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	205
		195					200									
gca	gac	tac	gag	aaa	cac	aaa	gtc	tac	gcc	tgc	gaa	gtc	acc	cat	cag	672
Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	
	210					215					220					
ggc	ctg	agc	tcg	ccc	gtc	aca	aag	agc	ttc	aac	agg	gga	gag	tgt	tga	720
Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys		
225					230					235						

<210> 4  
 <211> 1437  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1434)

<400> 4																
atg	ggt	tgg	agc	ctc	atc	ttg	ctc	ttc	ctt	gtc	gct	gtt	gct	acg	cgt	48
Met	Gly	Trp	Ser	Leu	Ile	Leu	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Val	Ala	Thr	Arg	
1				5					10					15		
gtc	cag	tgt	gag	gtg	caa	ctg	gtg	gag	tct	ggg	gga	ggc	ttg	gtc	cag	96
Val	Gln	Cys	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	
			20					25					30			
cct	ggc	ggg	tcc	ctg	aga	gtc	tcc	tgt	gca	gtc	tct	gga	tcc	acc	ttc	144
Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Val	Ser	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	
		35					40					45				
agt	gac	cac	tac	atg	tat	tgg	ttc	cgc	cag	gct	cca	ggg	aag	ggg	ccg	192
Ser	Asp	His	Tyr	Met	Tyr	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Pro	
	50					55					60					
gaa	tgg	gta	ggt	ttc	att	aga	aac	aaa	ccg	aac	ggt	ggg	aca	aca	gaa	240
Glu	Trp	Val	Gly	Phe	Ile	Arg	Asn	Lys	Pro	Asn	Gly	Gly	Thr	Thr	Glu	80
	65				70					75						
tac	gcc	gcg	tct	gtg	aaa	gac	aga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gat	gat	tcc	288
Tyr	Ala	Ala	Ser	Val	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	
				85					90					95		
aaa	agc	atc	gcc	tat	ctg	caa	atg	agc	agc	ctg	aaa	atc	gag	gac	acg	336
Lys	Ser	Ile	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Lys	Ile	Glu	Asp	Thr	
			100				105						110			
gcc	gtc	tat	tac	tgt	act	aca	tcc	tac	att	tca	cat	tgt	cgg	ggt	ggt	384
Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Thr	Ser	Tyr	Ile	Ser	His	Cys	Arg	Gly	Gly	

0233 NO sequence listing

															115	120	125															
gtc	tgc	tat	gga	ggt	tac	ttc	gaa	ttc	tgg	ggc	cag	ggc	gcc	ctg	gtc	432	Val	Cys	Tyr	Gly	Gly	Tyr	Phe	Glu	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Ala	Leu	Val
															130	135	140															
acc	gtc	tcc	tca	gct	agc	acc	aag	ggc	cca	tcg	gtc	ttc	ccc	ctg	gca	480	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala
															145	150	155															
ccc	tcc	tcc	aag	agc	acc	tct	ggg	ggc	aca	gcg	gcc	ctg	ggc	tgc	ctg	528	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
															165	170	175															
gtc	aag	gac	tac	ttc	ccc	gaa	ccg	gtg	acg	gtg	tcg	tgg	aac	tca	ggc	576	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
															180	185	190															
gcc	ctg	acc	agc	ggc	gtg	cac	acc	ttc	ccg	gct	gtc	cta	cag	tcc	tca	624	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Gln	Ser	Ser	
															195	200	205															
gga	ctc	tac	tcc	ctc	agc	agc	gtg	gtg	acc	gtg	ccc	tcc	agc	agc	ttg	672	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
															210	215	220															
ggc	acc	cag	acc	tac	atc	tgc	aac	gtg	aat	cac	aag	ccc	agc	aac	acc	720	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
															225	230	235															
aag	gtg	gac	aag	aaa	gca	gag	ccc	aaa	tct	tgt	gac	aaa	act	cac	aca	768	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr
															245	250	255															
tgc	cca	ccg	tgc	cca	gca	cct	gaa	ctc	ctg	ggg	gga	ccg	tca	gtc	ttc	816	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
															260	265	270															
ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	864	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro
															275	280	285															
gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	912	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val
															290	295	300															
aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	960	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr
															305	310	315															
aag	ccg	cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	tac	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	1008	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
															325	330	335															
ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	1056	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys
															340	345	350															
aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	1104	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
															355	360	365															
aaa	gcc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	1152	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro
															370	375	380															
tcc	cgg	gat	gag	ctg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	1200	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val



0233 NO sequence listing

385	390	395	400	
aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg				1248
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly	405	410	415	
cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac				1296
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Val Leu Asp Ser Asp	420	425	430	
ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg				1344
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp	435	440	445	
cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac				1392
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His	450	455	460	
aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga				1437
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	470	475		
<210> 5				
<211> 711				
<212> DNA				
<213> Homo sapiens				
<220>				
<221> CDS				
<222> (1)..(708)				
<400> 5				
atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg ctc ctg ctg ctc tgg ctc cca				48
Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro	5	10	15	
1				
ggt gca cga tgt gag tct gtc ctg aca cag ccg ccc tca gtg tct ggg				96
Gly Ala Arg Cys Glu Ser Val Leu Thr Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly	20	25	30	
gcc cca ggg cag aag gtc acc atc tcg tgc act ggg agc acc tcc aac				144
Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Thr Ser Asn	35	40	45	
att gga ggt tat gat cta cat tgg tac cag cag ctc cca gga acg gcc				192
Ile Gly Gly Tyr Asp Leu His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala	50	55	60	
ccc aaa ctc ctc atc tat gac att aac aag cga ccc tca gga att tct				240
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ile Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Ser	65	70	75	80
gac cga ttc tct ggc tcc aag tct ggt acc gcg gcc tcc ctg gcc atc				288
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ala Ala Ser Leu Ala Ile	85	90	95	
act ggg ctc cag act gag gat gag gct gat tat tac tgc cag tcc tat				336
Thr Gly Leu Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr	100	105	110	
gac agc agc ctg aat gct cag gta ttc gga gga ggg acc cgg ctg acc				384
Asp Ser Ser Leu Asn Ala Gln Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr	115	120	125	
gtc cta ggt cag ccc aag gct gcc ccc tcg gtc act ctg ttc ccg ccc				432
Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro	130	135	140	

0233 NO sequence listing

tcc tct gag gag ctt caa gcc aac aag gcc aca ctg gtg tgt ctc ata	480
Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile	
145 150 155 160	
agt gac ttc tac ccg gga gcc gtg aca gtg gcc tgg aag gca gat agc	528
Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser	
165 170 175	
agc ccc gtc aag gcg gga gtg gag acc acc aca ccc tcc aaa caa agc	576
Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser	
180 185 190	
aac aac aag tac gcg gcc agc agc tac ctg agc ctg acg cct gag cag	624
Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln	
195 200 205	
tgg aag tcc cac aga agc tac agc tgc cag gtc acg cat gaa ggg agc	672
Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser	
210 215 220	
acc gtg gag aag aca gtg gcc cct aca gaa tgt tca tga	711
Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser	
225 230 235	
<210> 6	
<211> 1431	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220>	
<221> CDS	
<222> (1)..(1428)	
<400> 6	
atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctc ctg gtg gca gct ccc aga tgg	48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp	
1 5 10 15	
gtc ctg tcc cag gtg cag ctg cag gag tgc ggc cca gga ctg gtg aag	96
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys	
20 25 30	
cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc gct gtc tct ggt ggc tcc atc	144
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile	
35 40 45	
agc ggt ggt tat ggc tgg ggc tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg	192
Ser Gly Gly Tyr Gly Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly	
50 55 60	
ctg gag tgg att ggg agt ttc tat agt agt agt ggg aac acc tac tac	240
Leu Glu Trp Ile Gly Ser Phe Tyr Ser Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr	
65 70 75 80	
aac ccc tcc ctc aag agt caa gtc acc att tca aca gac acg tcc aag	288
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Gln Val Thr Ile Ser Thr Asp Thr Ser Lys	
85 90 95	
aac cag ttc tcc ctg aag ctg aac tct atg acc gcc gcg gac acg gcc	336
Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Asn Ser Met Thr Ala Ala Asp Thr Ala	
100 105 110	
gtg tat tac tgt gtg aga gat cgt ctt ttt tca gtt gtt gga atg gtt	384
Val Tyr Tyr Cys Val Arg Asp Arg Leu Phe Ser Val Val Gly Met Val	
115 120 125	

0233 NO sequence listing

tac Tyr	aac Asn 130	aac Asn	tgg Trp	ttc Phe	gat Asp	gtc Val 135	tgg Trp	ggc Gly	ccg Pro	gga Gly 140	gtc Val	ctg Leu	gtc Val	acc Thr	gtc Val	432
tcc Ser 145	tca Ser	gct Ala	agc Ser	acc Thr	aag Lys 150	ggc Gly	cca Pro	tcg Ser	gtc Val	ttc Phe 155	ccc Pro	ctg Leu	gca Ala	ccc Pro	tcc Ser 160	480
tcc Ser	aag Lys	agc Ser	acc Thr	tct Ser 165	ggg Gly	ggc Gly	aca Thr	gcg Ala	gcc Ala 170	ctg Leu	ggc Gly	tgc Cys	ctg Leu	gtc Val 175	aag Lys	528
gac Asp	tac Tyr	ttc Phe	ccc Pro 180	gaa Glu	ccg Pro	gtg Val	acg Thr	gtg Val 185	tcg Ser	tgg Trp	aac Asn	tca Ser	ggc Gly 190	gcc Ala	ctg Leu	576
acc Thr	agc Ser	ggc Gly 195	gtg Val	cac His	acc Thr	ttc Phe	ccg Pro 200	gct Ala	gtc Val	cta Leu	cag Gln	tcc Ser 205	tca Ser	gga Gly	ctc Leu	624
tac Tyr 210	tcc Ser	ctc Leu	agc Ser	agc Ser	gtg Val 215	gtg Val	acc Thr	gtg Val	ccc Pro	tcc Ser	agc Ser 220	agc Ser	ttg Leu	ggc Gly	acc Thr	672
cag Gln 225	acc Thr	tac Tyr	atc Ile	tgc Cys	aac Asn 230	gtg Val	aat Asn	cac His	aag Lys	ccc Pro 235	agc Ser	aac Asn	acc Thr	aag Lys	gtg Val 240	720
gac Asp	aag Lys	aaa Lys	gca Ala	gag Glu 245	ccc Pro	aaa Lys	tct Ser	tgt Cys	gac Asp 250	aaa Lys	act Thr	cac His	aca Thr	tgc Cys 255	cca Pro	768
ccg Pro	tgc Cys	cca Pro	gca Ala 260	cct Pro	gaa Glu	ctc Leu	ctg Leu	ggg Gly 265	gga Gly	ccg Pro	tca Ser	gtc Val	ttc Phe 270	ctc Leu	ttc Phe	816
ccc Pro	cca Pro	aaa Lys 275	ccc Pro	aag Lys	gac Asp	acc Thr	ctc Leu 280	atg Met	atc Ile	tcc Ser	cgg Arg	acc Thr 285	cct Pro	gag Glu	gtc Val	864
aca Thr 290	tgc Cys	gtg Val	gtg Val	gtg Val	gac Asp	gtg Val 295	agc Ser	cac His	gaa Glu	gac Asp	cct Pro 300	gag Glu	gtc Val	aag Lys	ttc Phe	912
aac Asn 305	tgg Trp	tac Tyr	gtg Val	gac Asp	ggc Gly 310	gtg Val	gag Glu	gtg Val	cat His	aat Asn 315	gcc Ala	aag Lys	aca Thr	aag Lys	ccg Pro 320	960
cgg Arg	gag Glu	gag Glu	cag Gln	tac Tyr 325	aac Asn	agc Ser	acg Thr	tac Tyr	cgt Arg 330	gtg Val	gtc Val	agc Ser	gtc Val	ctc Leu 335	acc Thr	1008
gtc Val	ctg Leu	cac His	cag Gln 340	gac Asp	tgg Trp	ctg Leu	aat Asn	ggc Gly 345	aag Lys	gag Glu	tac Tyr	aag Lys	tgc Cys 350	aag Lys	gtc Val	1056
tcc Ser	aac Asn	aaa Lys 355	gcc Ala	ctc Leu	cca Pro	gcc Ala	ccc Pro 360	atc Ile	gag Glu	aaa Lys	acc Thr	atc Ile 365	tcc Ser	aaa Lys	gcc Ala	1104
aaa Lys	ggg Gly 370	cag Gln	ccc Pro	cga Arg	gaa Glu	cca Pro 375	cag Gln	gtg Val	tac Tyr	acc Thr	ctg Leu 380	ccc Pro	cca Pro	tcc Ser	cgg Arg	1152
gat Asp 385	gag Glu	ctg Leu	acc Thr	aag Lys	aac Asn 390	cag Gln	gtc Val	agc Ser	ctg Leu	acc Thr 395	tgc Cys	ctg Leu	gtc Val	aaa Lys	ggc Gly 400	1200

0233 NO sequence listing

ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	cag	ccg	1248
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	
				405					410					415		
gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	1296
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	
			420					425					430			
ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	cag	1344
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	
		435					440					445				
ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	cac	1392
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	
	450					455					460					
tac	acg	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	ggt	aaa	tga				1431
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys					
465					470					475						