



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2225280 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.09.29
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.04.30
(86)	Europeisk søknadsnr	08864822.5
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.12.16
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.09.08
(30)	Prioritet	2007.12.21, EP, 07024865
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	F. Hoffmann-La Roche AG, Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, CH-Sveits
(72)	Oppfinner	KLEIN, Christian, Chrüzacherweg 41, 8906 Bonstetten, CH-Sveits SCHÄFER, Wolfgang, Tannhäuserring 190, 68199 Mannheim, DE-Tyskland
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Bivalente, bispesifikke antistoffer
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A-93/06217 WO-A-96/27011 WO-A-99/37791 A. MERCHANT ET AL.: "An efficient route to human bispecific IgG." NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 16, July 1998 (1998-07), pages 677-681, XP002141015 New York, USA cited in the application T. SIMON & K. RAJEWSKY: "Antibody domain mutants demonstrate autonomy of the antigen binding site." THE EMBO JOURNAL, vol. 9, no. 4, April 1990 (1990-04), pages 1051-1056, XP002492563 UK L. CHAN ET AL.: "Variable region domain exchange in human IgGs promotes antibody complex formation with accompanying structural changes and altered effector functions." MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 41, no. 5, July 2004 (2004-07), pages 527-538, XP002519713 U.K. S. MORRISON: "Two heads are better than one." NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 25, no. 11, November 2007 (2007-11), pages 1233-1234, XP002470803 New York, USA cited in the application Z. XIE ET AL.: "A new format of bispecific antibody: highly efficient heterodimerization, expression and tumor cell lysis." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 296, 2005, pages 95-101, XP004738464 Amsterdam, The Netherlands J. RIDGWAY ET AL.: "'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization." PROTEIN ENGINEERING, vol. 9, no. 7, 1996, pages 617-621, XP002084766 U.K. cited in the application

Den foreliggende oppfinnelse vedrører nye bivalente, bispesifikke antistoffer, deres fremstilling og anvendelse.

Bakgrunn for oppfinnelsen

- 5 Konstruerte proteiner, slik som bi- eller multispesifikke antistoffer som er i stand til å binde to eller flere antigener er kjent innen teknikkens stand. Slike multispesifikke bindingsproteiner kan dannes ved å anvende cellefusjon, kjemisk konjugering eller rekombinant DNA-teknikker.
- 10 En rekke rekombinante bispesifikke antistofformater er blitt utviklet i de senere årene, f.eks. tetraivalente bispesifikke antistoffer ved fusjon av f.eks. et IgG-antistoffformat og enkeltkjededomener (se f.eks. Coloma, M.J., et al., *Nature Biotech* 15 (1997) 159-163; WO 2001077342; og Morrison, S.L., *Nature Biotech* 25 (2007) 1233-1234).
- 15 En rekke andre nye formater hvor antistoffkjernestrukturen (IgA, IgD, IgE, IgG eller IgM) ikke lenger er bibeholdt som dia-, tria- eller tetrabodies, minibodies, flere enkeltkjedeformater (scFv, Bis-scFv) som er i stand til binding med to eller flere antigener, er også blitt utviklet (Holliger, P., et al., *Nature Biotech* 23 (2005) 1126-1136; Fischer, N., Léger O., *Pathobiology* 74 (2007) 3-14; Shen, J., et al.,
- 20 *Journal of Immunological Methods* 318 (2007) 65-74; Wu, C., et al., *Nature Biotech* 25 (2007) 1290-1297).
- Alle slike formater anvender linkere for enten å fusjonere antistoffkjernen (IgA, IgD, IgE, IgG eller IgM) til et ytterligere bindingsprotein (f.eks. scFv) eller for å fusjonere
- 25 f.eks. to Fab-fragmenter eller scFv (Fischer, N., Léger O., *Pathobiology* 74 (2007) 3-14). Mens det er klart at linkere har fordeler med hensyn til å konstruere bispesifikke antistoffer, kan de også føre til problemer i terapeutiske situasjoner. Disse fremmede proteiner vil faktisk kunne utløse en immunrespons mot selve linkeren, eller forbindelsen mellom proteinet og linkeren. Videre gjør den fleksible naturen til disse
- 30 peptider dem mer tilbøyelige til proteolytisk spalting, som eventuelt fører til dårlig antistoffstabilitet, aggregering og økt immunogenitet. I tillegg kan man ønske å opprettholde effektorfunksjoner, slik som f.eks. komplementavhengig cytotoksitet (CDC) eller antistoffavhengig cellulær cytotoksitet (ADCC), som medieres gjennom Fc-reseptorbinding, ved å opprettholde en høy grad av likhet med de naturlig
- 35 forekommende.

Således bør man ideelt sett sikte mot å utvikle bispesifikke antistoffer som er svært like i generell struktur til naturlig forekommende antistoffer (slik som IgA, IgD, IgE, IgG eller IgM), med minimalt avvik fra humane sekvenser.

5 I én tilnærming er bispesifikke antistoffer som er svært like naturlige antistoffer blitt fremstilt ved å anvende kvadromteknologi (se Milstein, C. og A.C. Cuello, Nature, 305 (1983) 537-40) basert på den somatiske fusjonen av to forskjellige hybridomcellelinjer som uttrykker murine monoklonale antistoffer med de ønskede spesifisiteter til de bispesifikke antistoffer. På grunn av tilfeldig paring av to forskjellige antistoff tunge og
10 lette kjeder innen den resulterende hybrid-hybridom (eller kvadrom) cellelinjen, dannes opp til ti forskjellige antistoffarter hvorav kun én er det ønskelige, funksjonelle bispesifikke antistoff. På grunn av tilstedeværelsen av feilparede biprodukter og signifikant reduserte produksjonsutbytter, er midler for sofistikerte renseprosedyrer nødvendige (se f.eks. Morrison, S. L., Nature Biotech 25 (2007) 1233-1234). Generelt
15 vedblir det samme problemet av feilparede biprodukter dersom rekombinante ekspresjonsteknikker anvendes.

En tilnærming for å omgå problemet av feilparede biprodukter, som er kjent som "knobs-into-holes", har som formål å tvinge paringen av to forskjellige
20 antistofftungkjeder ved å introdusere mutasjoner inn i CH3-domenet for å modifisere kontaktgrenseflaten. På én kjede ble den voluminøse aminosyre erstattet med en aminosyre med korte sidekjeder for å danne et "hole". I motsatt fall, ble aminosyrer med store sidekjeder innført i det andre CH3-domenet for å danne en "knob". Ved koekspresjon av disse to tunge kjeder (og to identiske lette kjeder, som må være
25 passende for begge tunge kjeder), ble høye utbytter av heterodimerdannelse ("knob-hole") versus homodimerdannelse ("hole-hole" eller "knob-knob") observert (Ridgway, J.B., Presta LG, Carter P., og WO 1996027011). Prosentandelen heterodimer kan ytterligere økes ved å remodelle interaksjonsoverflaten for de to CH3-domener ved å anvende en fagdisplaytilnærming og introduksjon av en disulfidbro for å stabilisere
30 heterodimerene (Merchant, A.M., et al., Nature Biotech 16 (1998) 677-681; Atwell, S., Ridgway, J.B., Wells, J.A., Carter, P., J Mol Biol 270 (1997) 26-35). Nye tilnærminger for "knobs-into-holes"-teknologien er f.eks. beskrevet i EP 1 870 459 A1. Skjønt dette format synes svært attraktivt, er ingen data som beskriver progresjon mot klinikken tilgjengelig på det nåværende tidspunkt. Ett viktig hinder for denne strategi er at de
35 lette kjedene til de to moderantistoffene må være identiske for å forhindre feilparing og dannelse av inaktive molekyler. Denne teknikken er således ikke passende for enkel utvikling av rekombinante, bivalente, bispesifikke antistoffer mot to antigener,

ved å starte fra to antistoffer mot det første og det andre antigen, da enten de tunge kjedene til disse antistoffer og/eller de identiske lette kjedene må være optimalisert.

5 Simon T. et al., EMBO Journal, 9 (1990) 1051-1056 angår domenemutanter av monospesifikke antistoffer.

WO 93/06217 omhandler kobling av to mono- eller bispesifikke antistofffragmenter ved å anvende en cysteinrest med en fri tiol.

10 WO 99/37791 omhandler anvendelsen av CL-CH1-interaksjon som en heterodimeriserings-scaffold for bispesifikke eller multispesifikke antistoffkonstrukter.

Oppsummering av oppfinnelsen

Oppfinnelsen angår et bivalent, bispesifikt antistoff som omfatter:

- 15 a) den lette kjeden og den tunge kjeden til et antistoff som spesifikt binder til et første antigen; og
- b) den lette kjeden og den tunge kjeden til et antistoff som spesifikt binder til et andre antigen, hvor de konstante domenene CL og CH1 er erstattet med hverandre.

20

En ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen er en fremgangsmåte for fremstilling av et bivalent, bispesifikt antistoff ifølge oppfinnelsen, som omfatter trinnene:

- a) transformering av en vertscelle med
- vektorer som omfatter nukleinsyremolekyler som koder for den lette kjeden

25 og den tunge kjeden til et antistoff som spesifikt binder til et første antigen

 - vektorer som omfatter nukleinsyremolekyler som koder for den lette kjeden

og den tunge kjeden til et antistoff som spesifikt binder til et andre antigen,

 - hvor de konstante domenene CL og CH1 er erstattet med hverandre;

b) dyrking av vertscellen under betingelser som tillater syntese av nevnte

30 antistoffmolekyl; og

c) utvinning av nevnte antistoffmolekyl fra nevnte kultur.

En ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen er en vertscelle som omfatter

- vektorer som omfatter nukleinsyremolekyler som koder for den lette kjeden og

35 den tunge kjeden til et antistoff som spesifikt binder til et første antigen

- vektorer som omfatter nukleinsyremolekyler som koder for den lette kjeden og den tunge kjeden til et antistoff, som spesifikt binder til et andre antigen, hvor de konstante domenene CL og CH1 er erstattet med hverandre.

5 En ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen er et preparat, foretrukket et farmasøytisk eller diagnostisk preparat av antistoffet ifølge oppfinnelsen.

En ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen er et farmasøytisk preparat som omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen, og minst én farmasøytisk aksepterbar
10 eksipiens.

En ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen er en fremgangsmåte for å behandle en pasient med behov for terapi, som er kjennetegnet ved at det til pasienten administreres en terapeutisk effektiv mengde av et antistoff ifølge oppfinnelsen.

15

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Oppfinnelsen vedrører et bivalent, bispesifikt antistoff som omfatter:

- a) den lette kjeden og den tunge kjeden til et antistoff som spesifikt binder til et første antigen; og
- 20 b) den lette kjeden og den tunge kjeden til et antistoff som spesifikt binder til et andre antigen, hvor de konstante domener CL og CH1 er erstattet med hverandre.

Derfor omfatter nevnte bivalente, bispesifikke antistoff:

- 25 a) en første lett kjede og en første tung kjede av et antistoff som spesifikt binder til et første antigen; og
- b) en andre lett kjede og en andre tung kjede av et antistoff som spesifikt binder til et andre antigen, hvor de konstante domenene CL og CH1 i den andre lette kjeden og den andre tunge kjeden er erstattet med hverandre.

30

Således gjelder for nevnte antistoff som spesifikt binder til et andre antigen:
innen den lette kjeden

konstant lett kjede domenet CL er erstattet med konstant tung kjede domenet CH1 av nevnte antistoff;

35

og innen den tunge kjeden

konstant tung kjede domenet CH1 er erstattet med konstant lett kjede domenet CL av nevnte antistoff.

Betegnelsen "antistoff" som anvendt her, refererer til hele, monoklonale antistoffer. Slike hele antistoffer består av to par av en "lett kjede" (LC) og en "tung kjede" (HC) (slike lett kjede (LC)/tung kjede par er forkortet her som LC/HC). De lette kjedene og de tunge kjedene av slike antistoffer er polypeptider som består av flere domener. I et helt antistoff, omfatter hver tunge kjede en tung kjede variabel region (forkortet her som HCVR eller VH), og en tung kjede konstant region. Tung kjede konstant regionen omfatter tung kjede konstant domenene CH1, CH2 og CH3 (antistoffklasser IgA, IgD og IgG), og eventuelt tung kjede konstant domenet CH4 (antistoffklasser IgE og IgM). Hver lette kjede omfatter et lett kjede variabelt domene VL, og et lett kjede konstant domene CL. Strukturen til ett naturlig forekommende helt antistoff, IgG-antistoff, er vist f.eks. i figur 1. De variable domenene VH og VL kan videre være oppdelt i regioner av hypervariabilitet, betegnet komplementaritetsbestemmende regioner (CDR), som er blandet med regioner som er mer konserverte, betegnet rammeverkregioner (FR). Hver VH og VL er sammensatt av tre CDR'er og fire FR'er, oppstilt fra aminotermius til karboksyterminus i følgende rekkefølge: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 ((Janeway, C.A., Jr., et al., (2001). Immunobiology, 5. utgave, Garland Publishing; og Woof, J., Burton, D., Nat Rev Immunol 4 (2004) 89-99). De to par av tung kjede og lett kjede (HC/LC) er i stand til spesifikk binding til samme antigen. Således er nevnte hele antistoff et bivalent, monospesifikt antistoff. Slike "antistoffer" inkluderer f.eks. museantistoffer, humane antistoffer, kimære antistoffer, humaniserte antistoffer, og genetisk konstruerte antistoffer (variant- eller mutant antistoffer) så lenge deres karakteristiske egenskaper er bibeholdt. Særlig foretrukket er humane eller humaniserte antistoffer, særlig som rekombinante humane eller humaniserte antistoffer.

Der er fem typer av pattedyrantistoff tunge kjeder betegnet med de greske bokstavene: α , δ , ϵ , γ og μ (Janeway, C.A., Jr., et al., (2001). Immunobiology, 5. utgave, Garland Publishing). Typen av tung kjede tilstede definerer antistoffklassen; disse kjedene finner man henholdsvis i IgA-, IgD-, IgE-, IgG- og IgM-antistoffer (Rhoades RA, Pflanzner RG (2002). Human Physiology, 4. utgave, Thomson Learning). Forskjellige tunge kjeder avviker med hensyn til størrelse og sammensetning; α og γ inneholder omtrent 450 aminosyrer, mens μ og ϵ har omtrent 550 aminosyrer.

Hver tunge kjede har to regioner, den konstante regionen og den variable regionen. Den konstante regionen er identisk i alle antistoffer av den samme

isotypen, men er forskjellig i antistoffer av forskjellige isotyper. Tunge kjeder γ , α og δ har en konstant region sammensatt av tre konstante domener CH1, CH2 og CH3 (i en linje), og en hengselregion for addert fleksibilitet (Woof, J., Burton, D., Nat Rev Immunol 4 (2004) 89-99); tunge kjeder μ og ϵ har en konstant region
 5 som er sammensatt av fire konstante domener CH1, CH2, CH3 og CH4 (Janeway, C.A., Jr., et al. (2001). Immunobiology, 5. utgave, Garland Publishing). Den variable region i den tunge kjeden er forskjellig i antistoffer fremstilt ved forskjellige B-celler, men er den samme for alle antistoffer fremstilt ved en enkelt B-celle eller B-celleklon. Den variable regionen for hver tunge kjede har en lengde
 10 på omtrent 110 aminosyrer og et enkelt antistoffdomene.

I pattedyr er der kun to typer av lett kjede, som er betegnet lambda (λ) og kappa (κ). En lett kjede har to påfølgende domener: ett konstant domene CL, og ett variabelt domene VL. Den omtrentlige lengden til en lett kjede er 211 til 217
 15 aminosyrer. Den lette kjeden er foretrukket en kappa (κ) lett kjede, og det konstante domenet CL er foretrukket C kappa (κ).

Betegnelsen "monoklonalt antistoff" eller "monoklonal antistoffssammensetning" som anvendt her, refererer til et preparat av antistoffmolekyler av en enkelt
 20 aminosyre-sammensetning.

"Antistoffene" ifølge oppfinnelsen kan være av en hvilken som helst klasse (f.eks. IgA, IgD, IgE, IgG og IgM, foretrukket IgG eller IgE), eller subklasse (f.eks. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 og IgA2, foretrukket IgG1), hvor begge antistoffer hvorfra
 25 det bivalente bispesifikke antistoffet ifølge oppfinnelsen er avledet, har en Fc-del av den samme subklassen (f.eks. IgG1, IgG4 og liknende, foretrukket IgG1), foretrukket av den samme allotypen (f.eks. kaukasisk).

En "Fc-del av et antistoff" er en betegnelse som er vel kjent for en fagkyndig på
 30 området, og definert på grunnlag av papainspalting av antistoffer. Antistoffene ifølge oppfinnelsen inneholder som Fc-del, foretrukket en Fc-del avledet fra human opprinnelse, og foretrukket alle andre deler av de humane konstante regioner. Fc-delen av et antistoff er direkte involvert i komplementaktivering, C1q-binding, C3-aktivering og Fc-reseptorbinding. Mens innvirkningen av et antistoff på
 35 komplementsystemet er avhengig av visse betingelser, er binding til C1q bevirket ved definerte bindings seter i Fc-delen. Slike bindings seter er kjent innen teknikken, og er f.eks. beskrevet av Lukas, T.J., et al., J. Immunol. 127 (1981)

2555-2560; Brunhouse, R., og Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., et al., Nature 288 (1980) 338-244; Thommesen, J.E., et al., Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., et al., J. Virol. 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; og EP 0 307 434. Slike bindings seter er f.eks. L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 og P329 (nummerering ifølge EU-indeks av Kabat, se under). Antistoffer av subklasse IgG1, IgG2 og IgG3 viser vanligvis komplementaktivering, C1q-binding og C3-aktivering, mens IgG4 ikke aktiverer komplementsystemet, ikke binder C1q, og ikke aktiverer C3. Fc-delen er foretrukket en human Fc-del.

Betegnelsen "kimært antistoff" refererer til et antistoff som omfatter en variabel region, dvs. bindingsregion, fra én kilde eller art, og minst en del av en konstant region avledet fra en annen kilde eller art, vanligvis fremstilt ved rekombinante DNA-teknikker. Kimære antistoffer som omfatter en murin variabel region og en human konstant region er foretrukket. Andre foretrukne former av "kimære antistoffer" som er omfattet av den foreliggende oppfinnelse er dem hvor den konstante regionen er blitt modifisert eller forandret fra den til det opprinnelige antistoff for å generere egenskaper ifølge oppfinnelsen, særlig med hensyn til C1q-binding og/eller Fc-reseptor (FcR) binding. Slike kimære antistoffer er også omtalt som "class-switched antibodies". Kimære antistoffer er produktet av uttrykte immunoglobuliner som omfatter DNA-sekvenser som koder for immunoglobulin variable regioner og DNA-segmenter som koder for immunoglobulin konstante regioner. Fremgangsmåter for å fremstille kimære antistoffer som involverer konvensjonelle rekombinante DNA- og gentransfeksjons-teknikker er vel kjent innen teknikkens stand. Se f.eks. Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; US 5 202 238 og US 5 204 244.

Betegnelsen "humanisert antistoff" refererer til antistoffer hvor rammeverket eller "komplementaritetsbestemmende regioner" (CDR) er blitt modifisert til å omfatte CDR av et immunoglobulin av forskjellig spesifisitet sammenliknet med det til moderimmunoglobulinet. I en foretrukket utførelsesform er en murin CDR podet inn i rammeverkregionen til et humant antistoff for å fremstille det "humaniserte antistoff". Se f.eks. Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327; og Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270. Særlig foretrukne CDR'er svarer til dem som representerer sekvenser som gjenkjenner antigenet som angitt ovenfor for kimære antistoffer. Andre former av "humaniserte antistoffer" som er

omfattet av den foreliggende oppfinnelse er dem hvor den konstante regionen er blitt ytterligere modifisert eller forandret fra den til det opprinnelige antistoff for å danne egenskapene ifølge oppfinnelsen, særlig med hensyn til C1q-binding og/eller Fc-reseptor (FcR) binding.

5

Betegnelsen "humant antistoff" som anvendt her, skal inkludere antistoffer med variable og konstante regioner avledet fra human kimlinje immunoglobulin-sekvenser. Humane antistoffer er vel kjent innen teknikkens stand (van Dijk, M.A., og van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). Humane antistoffer kan også fremstilles i transgene dyr (f.eks. mus) som ved immunisering kan produsere et fullt repertoar eller en seleksjon av humane antistoffer i fravær av endogen immunoglobulinproduksjon. Overføring av den humane kimlinje immunoglobulingen-array i slike kimlinjemutante mus vil resultere i fremstillingen av humane antistoffer ved antigen utfordring (se f.eks. Jakobovits, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., Nature 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., et al., Year Immunol. 7 (1993) 33-40). Humane antistoffer kan også fremstilles i fagdisplaybiblioteker (Hoogenboom, H.R., og Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597). Teknikkene til Cole et al. og Boerner et al. er også tilgjengelig for fremstillingen av humane monoklonale antistoffer (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, s. 77 (1985); og Boerner, P., et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95). Som allerede nevnt for kimære og humaniserte antistoffer ifølge oppfinnelsen, omfatter betegnelsen "humant antistoff" som anvendt her også slike antistoffer som er modifisert i den konstante region for å generere egenskapene ifølge oppfinnelsen, særlig med hensyn til C1q-binding og/eller FcR-binding, f.eks. ved "klasseskifte", dvs. forandring eller mutasjon av Fc-deler (f.eks. fra IgG1 til IgG4 og/eller IgG1/IgG4-mutasjon).

25

Betegnelsen "rekombinant humant antistoff" som anvendt her, skal inkludere alle humane antistoffer som er fremstilt, uttrykt, dannet eller isolert ved rekombinante midler, slik som antistoffer isolert fra en vertscelle, slik som en NS0- eller CHO-celle, eller fra et dyr (f.eks. en mus) som er transgent for humane immunoglobulingener eller antistoffer uttrykt ved å anvende en rekombinant ekspresjonsfaktor som er transfektert inn i en vertscelle. Slike rekombinante humane antistoffer har variable og konstante regioner i en rearrangert form. De rekombinante humane antistoffer ifølge oppfinnelsen er blitt underkastet in vivo somatisk hypermutasjon. Aminosyresekvensene til VH- og VL-regionene av de

35

rekombinante antistoffer er sekvenser som, mens avledet fra og relatert til human kimlinje VH- og VL-sekvenser, ikke naturlig vil eksistere innen det humane antistoff-kimlinjerepertoaret in vivo.

5 Det "variable domenet" (variabelt domene av en lett kjede (VL), variabel region av en tung kjede (VH)) som anvendt her, betyr hvert av parene av lette og tunge kjeder som er involvert i direkte binding av antistoffet til antigenet. Domenene i variabel human lette og tunge kjeder har den samme generelle struktur, og hvert domene omfatter fire rammeverk (FR) regioner, hvis sekvenser er omfattende
10 bevart, forbundet ved hjelp av tre "hypervariable regioner" (eller komplementaritetsbestemmende regioner, CDR'er). Rammeverkregionene adopterer en β -platekonformasjon, og CDR'ene kan danne sløyfer som forbinder β -platestrukturen. CDR'ene i hver kjede holdes i deres tredimensjonale struktur ved hjelp av rammeverkregionene, og danner sammen med CDR'ene fra den andre
15 kjeden antigenbindingssetet. Antistoff tung og lett kjede CDR3-regioner spiller en særlig viktig rolle i bindingsspesifisitet/affinitet til antistoffene ifølge oppfinnelsen, og tilveiebringer derfor et ytterligere formål for oppfinnelsen.

Betegnelse "hypervariable region" eller "antigenbindingsdel av et antistoff" når
20 anvendt her, refererer til aminosyrerestene i et antistoff som er ansvarlig for antigenbinding. Den hypervariable regionen omfatter aminosyrerester fra de "komplementaritetsbestemmende regioner" eller "CDR'er". "Rammeverk"- eller "FR"-regioner er variabelt domene regionene annet enn hypervariable region restene som definert her. De lette og tunge kjeder til et antistoff omfatter derfor
25 fra N- til C-terminusen domenene FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, og FR4. CDR'er på hver kjede er separert ved slike rammeverkaminosyrer. Særlig er CDR3 i den tunge kjeden den regionen som bidrar mest til antigenbinding. CDR- og FR-regionene bestemmes i henhold til standarddefinisjonen ifølge Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. utgave, Public Health Service,
30 National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

De "konstante domener" av den tunge kjeden og av den lette kjeden er involvert direkte i binding av et antistoff til et antigen, men utviser forskjellige effektorfunksjoner. Avhengig av aminosyresekvensen i den konstante region av
35 deres tunge kjeder, er antistoffer eller immunoglobuliner oppdelt i klassene.

Betegnelsen "bivalent, bispesifikt antistoff" som anvendt her refererer til et antistoff som beskrevet ovenfor, hvor hver av de to parene av tung kjede og lett kjede (HC/LC) binder spesifikt til et forskjellig antigen, dvs. den første tunge og den første lette kjeden (som stammer fra et antistoff mot et første antigen) binder spesifikt sammen til et første antigen, og den andre tunge og den andre lette kjeden (som stammer fra et antistoff mot et andre antigen) binder spesifikt sammen til et andre antigen (som vist i figur 2); hvor slike bivalente, bispesifikke antistoffer er i stand til spesifikk binding til to forskjellige antigener samtidig, og ikke til mer enn to antigener, i motsetning til, på den annen side, et monospesifikt antistoff som er i stand til binding til kun ett antigen, og på den annen side, f.eks. et tetravalent, tetraspesifikt antistoff som kan binde til fire antigenmolekyler samtidig.

Ifølge oppfinnelsen kan forholdet mellom et ønsket bivalent, bispesifikt antistoff sammenliknet med uønskede biprodukter forbedres ved erstatning av disse domener i kun ett par av tung kjede og lett kjede (HC/LC). Mens det første av de to HC/LC-parene stammer fra et antistoff som spesifikt binder til et første antigen, og etterlates i alt vesentlig uforandret, stammer det andre av de to HC/LC-parene fra et antistoff som spesifikt binder til et andre antigen, og er endret ved den etterfølgende erstatning:

- lett kjede: erstatning av konstant lett kjede domenet CL med konstant tung kjede domenet CH1 av nevnte antistoff som spesifikt binder til et andre antigen, og
- tung kjede: erstatning av konstant tung kjede domenet CH1 med konstant lett kjede domenet CL av nevnte antistoff som spesifikt binder til et andre antigen.

De resulterende bivalente, bispesifikke antistoffer er således kunstige antistoffer som omfatter

- a) den lette kjeden og den tunge kjeden av et antistoff som spesifikt binder til et første antigen; og
- b) den lette kjeden og den tunge kjeden av et antistoff som spesifikt binder til et andre antigen;

hvor nevnte lette kjede (av et antistoff som spesifikt binder til et andre antigen) inneholder et konstant domene CH1 i stedet for CL

hvor nevnte tunge kjede (av et antistoff som spesifikt binder til et andre antigen) inneholder et konstant domene CL i stedet for CH1.

I et ytterligere aspekt av oppfinnelsen kan et slikt forbedret forhold mellom et ønsket bivalent, bispesifikt antistoff sammenliknet med uønskede biprodukter ytterligere forbedres ved hjelp av ett av de etterfølgende to alternativer:

5 **A) Første alternativ (se figur 3):**

CH3-domener av nevnte bivalente, bispesifikke antistoff ifølge oppfinnelsen kan endres ved hjelp av "knob-into-holes"-teknologien som er beskrevet detaljert med en rekke eksempler i f.eks. WO 96/027011, Ridgway, J.B., et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621; og Merchant, A.M., et al., Nat Biotechnol 16 (1998) 677-681. I denne
10 metoden blir interaksjonsoverflatene mellom de to CH3-domenene endret for å øke heterodimeriseringen av begge tunge kjeder som inneholder disse to CH3-domener. Hvert av de to CH3-domener (i de to tunge kjeder) kan være "the knob", mens det andre er "the hole". Introduksjonen av en disulfidbro stabiliserer heterodimerene (Merchant, A.M., et al., Nature Biotech 16 (1998) 677-681; Atwell, S., Ridgway, J.B.,
15 Wells, J.A., Carter, P., J Mol Biol 270 (1997) 26-35 og øker utbyttet.

I en foretrukket utførelsesform blir derfor CH3-domenene av et bivalent, bispesifikt antistoff hvor det første CH3-domenet og det andre CH3-domenet hver møtes i en grenseflate som omfatter en original grenseflate mellom antistoff CH3-domenene
20 endret ved "knob-into-holes"-teknologien, som inkluderer ytterligere stabilisering ved innføring av en disulfidbro i CH3-domenene (beskrevet i WO 96/027011, Ridgway, J.B., et al., Protein Eng 9 (1996) 617-621; Merchant, A.M., et al., Nature Biotech 16 (1998) 677-681; og Atwell, S., Ridgway, J.B., Wells, J.A., Carter P., J Mol Biol 270 (1997) 26-35) for å fremme dannelsen av bivalent, bispesifikt antistoff.

25 Således, i ett aspekt av oppfinnelsen, er nevnte bivalente, bispesifikke antistoff kjennetegnet ved at CH3-domenet av én tung kjede, og CH3-domenet av den andre tunge kjeden hver møtes i en grenseflate som omfatter en original grenseflate mellom antistoff CH3-domenene;
30 hvor nevnte grenseflate er endret for å fremme dannelsen av et bivalent, bispesifikt antistoff, hvor endringen er kjennetegnet ved at:

a) CH3-domenet av én tung kjede er endret,

35 slik at innen den originale grenseflaten av CH3-domenet av en tung kjede som møter den originale grenseflaten av CH3-domenet av den andre tunge kjeden i det bivalente, bispesifikke antistoff, er en aminosyrerest erstattet med en aminosyrerest med et

større sidekjedevolum, for derved å danne et fremspring innen grenseflaten til CH3-domenet av én tung kjede som kan anbringes i et hulrom innen grenseflaten av CH3-domenet av den andre tunge kjeden, og

5 b) CH3-domenet av den andre tunge kjeden er endret,

slik at innen den originale grenseflaten av det andre CH3-domenet som møter den originale grenseflaten av det første CH3-domenet innen det bivalente, bispesifikke antistoff, er en aminosyrerest erstattet med en aminosyrerest som har et mindre
10 sidekjedevolum, for derved å danne et hulrom innen grenseflaten av det andre CH3-domenet, innen hvilket et fremspring innen grenseflaten av det første CH3-domenet kan anbringes.

Den nevnte aminosyrerest med et større sidekjedevolum er foretrukket valgt fra
15 gruppen som består av arginin (R), fenylalanin (F), tyrosin (Y), tryptofan (W).

Nevnte aminosyrerest med et mindre sidekjedevolum er foretrukket valgt fra gruppen som består av alanin (A), serin (S), treonin (T), valin (V).

20 I ett aspekt av oppfinnelsen er begge CH3-domener ytterligere endret ved innføring av cystein (C) som aminosyre i de tilsvarende posisjoner i hvert CH3-domene, slik at en disulfidbro mellom begge CH3-domener kan dannes.

I en annen foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen er begge CH3-domener endret
25 ved bruk av rester R409D, K370E (K409D) for "knobs"-rester, og D399K, E357K for "hole"-rester beskrevet i f.eks. EP 1 870 459 A1, eller

B) Andre alternativ (se figur 4):

ved erstatning av et konstant tung kjede domene CH3 med et konstant tung kjede
30 domene CH1; og hvor det andre konstant tung kjede domene CH3 er erstattet med et konstant lett kjede domene CL. Konstant tung kjede domene CH1 som erstatter tung kjede domene CH3 kan være av en hvilken som helst Ig-klasse (f.eks. IgA, IgD, IgE, IgG og IgM), eller subklasse (f.eks. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 og IgA2). Konstant lett kjede domene CL som har erstattet tung kjede domene CH3 kan være av lambda
35 (λ) eller kappa (κ) typen, foretrukket kappa (κ) typen.

Således er én foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen et bivalent, bispesifikt antistoff som omfatter:

- a) den lette kjeden og den tunge kjeden av et antistoff som spesifikt binder til et første antigen; og
- 5 b) den lette kjeden og den tunge kjeden av et antistoff som spesifikt binder til et andre antigen, hvor konstant domenene CL og CH1 er erstattet med hverandre,

og hvor eventuelt

10

- c) CH3-domenet av én tung kjede og CH3-domenet av den andre tunge kjeden møtes i en grenseflate som omfatter en original grenseflate mellom antistoff CH3-domenene;
- hvor nevnte grenseflate er endret for å fremme dannelsen av det bivalente,
- 15 bispesifikke antistoff, hvor endringen er kjennetegnet ved at:

- ca) CH3-domenet av den tunge kjeden er endret,
- slik at innen den originale grenseflaten av CH3-domenet av én tung kjede som møter den originale grenseflaten av CH3-domenet av den andre tunge kjeden innen
- 20 det bivalente, bispesifikke antistoff, er en aminosyre erstattet med en aminosyrerest med et større sidekjedevolum, og danner derved et fremspring innen grenseflaten av CH3-domenet av én tung kjede som kan anbringes i et hulrom innen grenseflaten av CH3-domenet av den andre tunge kjeden, og

- 25 cb) CH3-domenet av den andre tunge kjeden er endret,
- slik at innen den originale grenseflaten av det andre CH3-domenet som møter den originale grenseflaten av det første CH3-domenet innen det bivalente bispesifikke antistoff, er en aminosyrerest erstattet med en aminosyrerest med et mindre sidekjedevolum, for derved å danne et hulrom innen grenseflaten av det andre CH3-
- 30 domenet innen hvilket et fremspring innen grenseflaten av det første CH3-domenet kan anbringes;

eller

- 35 d) ett konstant tung kjede domene CH3 erstattet med et konstant tung kjede domene CH1; og det andre konstant tung kjede domene CH3 er erstattet med et konstant lett kjede domene CL.

- Betegnelsene "antigen" eller "antigenmolekyl" som anvendt her, anvendes om hverandre for å referere til alle molekyler som spesifikt kan bindes ved et antistoff. Det bivalente, bispesifikke antistoff binder spesifikt til et første antigen og et andre distinkt antigen. Betegnelsen "antigener" som anvendt her, inkluderer f.eks. proteiner, forskjellige epitoper på proteiner (som forskjellige antigener innenfor betydningen i oppfinnelsen), og polysakkarider. Dette inkluderer hovedsakelig deler (kapper, kapsler, cellevegger, flageller, fibrier og toksiner) av bakterier, virus og andre mikroorganismer. Lipider og nukleinsyrer er kun antigeniske når kombinert med proteiner og polysakkarider. Ikke-mikrobielle eksogene (ikke-selv) antigener kan inkludere pollen, eggehvite og proteiner fra transplanterte vev og organer, eller på overflaten av transfuserte blodceller. Antigenet velges foretrukket fra gruppen som består av cytokiner, celleoverflateproteiner, enzymer og reseptorcytokiner, celleoverflateproteiner, enzymer og reseptorer.
- Tumorantigener er de antigener som er presentert ved MHC I- eller MHC II-molekyler på overflaten av tumorceller. Disse antigener kan noen ganger presenteres ved hjelp av tumorceller, og aldri ved de normale cellene. I dette tilfellet betegnes de alle tumorspesifikke antigener (TSA'er), og er typisk resultat fra en tumorspesifikk mutasjon. Mer vanlig er antigener som er presentert ved hjelp av tumorceller og normale celler, og de betegnes tumorassosierte antigener (TAA'er). Cytotoksiske T-lymfocytter som gjenkjenner disse antigener kan være i stand til å ødelegge tumorcellene før de prolifererer eller danner metastaser. Tumorantigener kan også være på overflaten av tumoren i form av f.eks. en mutert reseptor, i hvilket tilfelle de vil gjenkjennes ved B-celler.
- I én foretrukket utførelsesform er minst ett av de to forskjellige antigener (første og andre antigen), hvortil det bivalente, bispesifikke antistoff spesifikt binder, et tumorantigen.
- I en annen foretrukket utførelsesform er begge de to forskjellige antigener (første og andre antigen), hvortil det bivalente, bispesifikke antistoff spesifikt binder, tumorantigener; i dette tilfellet kan det første og andre antigen også være to forskjellige epitoper av det samme tumorspesifikke protein.
- I en annen foretrukket utførelsesform er ett av de to forskjellige antigener (første og andre antigen), hvortil det bivalente, bispesifikke antistoff spesifikt binder, et

tumorantigen, og det andre er et effektorcelleantigen, som f.eks. en T-celle reseptor, CD3, CD16, og liknende.

I en annen foretrukket utførelsesform er ett av de to forskjellige antigener (første og andre antigen), hvortil bivalent, bispesifikt antistoff spesifikt binder, et tumorantigen og det andre er et anti-cancer virkestoff, slik som et toksin eller en kinaseinhibitor.

Som anvendt her refererer "spesifikk binding" eller "binder spesifikt til" til et antistoff som spesifikt binder et antigen. Bindingsaffiniteten av antistoffet som spesifikt binder dette antigen er foretrukket en KD-verdi på 10^{-9} mol/l eller lavere (f.eks. 10^{-10} mol/l), foretrukket en KD-verdi på 10^{-10} mol/l eller lavere (f.eks. 10^{-12} mol/l). Bindingsaffiniteten bestemmes med en standard bindingsanalyse slik som overflateplasmonresonansteknikk (Biacore®).

Betegnelsen "epitop" inkluderer en hvilken som helst polypeptiddeterminant i stand til spesifikk binding til et antistoff. I visse utførelsesformer inkluderer epitopdeterminant kjemisk aktiv overflategrupper av molekyler, slik som aminosyrer, sukkersidekjeder, fosforyl eller sulfonyl, og i visse utførelsesformer kan man ha spesifikke tredimensjonale strukturelle egenskaper og/eller spesifikke ladningsegenskaper. En epitop er et område av et antigen som er bundet ved hjelp av et antistoff. I visse utførelsesformer sies antistoffet å spesifikt binde til et antigen når det foretrukket gjenkjenner sitt målantigen i en kompleks blanding av proteiner og/eller makromolekyler.

En ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen er en fremgangsmåte for fremstilling av et bivalent, bispesifikt antistoff ifølge oppfinnelsen som omfatter

- a) transformering av en vertscelle med
 - vektorer som omfatter nukleinsyremolekyler som koder for den lette kjeden og den tunge kjeden til et antistoff som spesifikt binder til et første antigen
 - vektorer som omfatter nukleinsyremolekyler som koder for den lette kjeden og den tunge kjeden til et antistoff som spesifikt binder til et andre antigen, hvor de konstante domenene CL og CH1 er erstattet med hverandre;
- b) dyrking av vertscellen under betingelser som tillater syntese av nevnte antistoffmolekyl; og
- c) utvinning av nevnte antistoffmolekyl fra nevnte kultur.

Generelt er der to vektorer som koder for den lette kjeden og den tunge kjeden av nevnte antistoff, som spesifikt binder til et første antigen, og videre to vektorer som koder for den lette kjeden og den tunge kjeden til nevnte antistoff som spesifikt binder til et andre antigen. En av de to vektorene koder for den respektive lette kjeden, og
 5 den andre av de to vektorene koder for den respektive tunge kjeden. I en alternativ fremgangsmåte for fremstilling av et bivalent, bispesifikt antistoff ifølge oppfinnelsen, kan imidlertid kun en første vektor som koder for den lette kjeden og den tunge kjeden av antistoffet som spesifikt binder til det første antigen, og kun en andre vektor som koder for den lette kjeden og den tunge kjeden til antistoffet som spesifikt
 10 binder til et andre antigen, anvendes for å transformere vertscellen.

Oppfinnelsen omfatter en fremgangsmåte for fremstilling av antistoffene som omfatter dyrking av de tilsvarende vertsceller under betingelser som tillater syntese av nevnte antistoffmolekyler og utvinning av nevnte antistoffer fra nevnte kultur, f.eks. ved å
 15 uttrykke

- en første nukleinsyresekvens som koder for den lette kjeden til et antistoff som spesifikt binder til et første antigen;
- en andre nukleinsyresekvens som koder for den tunge kjeden til nevnte antistoff som spesifikt binder til et første antigen;
- 20 - en tredje nukleinsyresekvens som koder for den lette kjeden til et antistoff som spesifikt binder til et andre antigen, hvor konstant lett kjede domenet CL er erstattet med konstant tung kjede domenet CH1; og
- en fjerde nukleinsyresekvens som koder for den tunge kjeden til nevnte antistoff som spesifikt binder til et andre antigen, hvor konstant tung kjede domenet CH1 er erstattet med konstant lett kjede domenet CL.
- 25

En ytterligere utførelse av oppfinnelsen er en vertscelle som omfatter

- vektorer som omfatter nukleinsyremolekyler som koder for den lette kjeden og den tunge kjeden til et antistoff som spesifikt binder til et første antigen
- 30 - vektorer som omfatter nukleinsyremolekyler som koder for den lette kjeden og den tunge kjeden til et antistoff som spesifikt binder til et andre antigen, hvor de konstante domener CL og CH1 er erstattet med hverandre.

En ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen er en vertscelle som omfatter

- 35 a) en vektor som omfatter et nukleinsyremolekyl som koder for den lette kjeden, og en vektor som omfatter et nukleinsyremolekyl som koder for den tunge kjeden av et antistoff som spesifikt binder til et første antigen

- b) en vektor som omfatter et nukleinsyremolekyl som koder for den lette kjeden, og en vektor som omfatter et nukleinsyremolekyl som koder for den tunge kjeden av et antistoff som spesifikt binder til et andre antigen, hvor de konstante domenene CL og CH1 er erstattet med hverandre.

5

En ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen er et preparat, foretrukket farmasøytisk eller et diagnostisk preparat, for det bivalente, bispesifikke antistoff ifølge oppfinnelsen.

10

En ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen er et farmasøytisk preparat som omfatter et bivalent, bispesifikt antistoff ifølge oppfinnelsen, og minst én farmasøytisk akseptertbar eksipiens.

15

En ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen er en fremgangsmåte for behandling av en pasient med behov for terapi, som er kjennetegnet ved at det til pasienten administreres en terapeutisk effektiv mengde av et bivalent, bispesifikt antistoff ifølge oppfinnelsen.

20

Betegnelsen "nukleinsyre eller nukleinsyremolekyl" som anvendt her, skal inkludere DNA-molekyler og RNA-molekyler. Et nukleinsyremolekyl kan være enkelttrådet eller dobbelttrådet, men er foretrukket dobbelttrådet DNA.

25

Som anvendt her, blir uttrykkene "celle", "cellelinje" og "cellekultur" anvendt om hverandre, og alle betegnelser inkluderer avkom. Ordene "transformanter" og "transformerte celler" inkluderer således den primære tilsiktede celle, og kulturer avledet derfra, uten hensyn til antallet overføringer. Det skal også forstås at alt avkom ikke vil være nøyaktig identiske i DNA-innhold på grunn av bevisste og uaktsomme mutasjoner. Variantavkom som har samme funksjon eller biologisk aktivitet som screenet for i den opprinnelige transformerte cellen er inkludert. Der hvor distinkte betegnelser er tilsiktet, vil dette fremgå klart fra sammenhengen.

30

35

Betegnelsen "transformasjon" som anvendt her, refererer til prosessen med å overføre en vektor/nukleinsyre inn i en vertscelle. Dersom celler uten formidable celleveggbarrierer anvendes som vertsceller, gjennomføres transfeksjonen ved f.eks. kalsiumfosfatpresipiteringsmetoden som beskrevet av Graham og Van der Eh, Virology 52 (1978) 546ff. Andre metoder for å innføre DNA i celler slik som ved nukleær injeksjon, eller ved protoplastfusjon, kan imidlertid også anvendes. Dersom

prokaryote celler eller celler som inneholder vesentlige celleveggkonstruksjoner anvendes, er f.eks. én transfeksjonsmetode kalsiumbehandling ved å anvende kalsiumklorid som beskrevet av Cohen, F. N., et al., PNAS. 69 (1972) 7110ff.

5 Rekombinant produksjon av antistoffer ved anvendelse av transformasjon er vel kjent innen teknikken, og er f.eks. beskrevet i tidsskriftsartiklene til Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., et al., Arzneimittelforschung 48 (1998) 870-880, så vel som i US 6 331 415 og US
10 4 816 567.

Som anvendt her, refererer "ekspresjon" til prosessen hvor en nukleinsyre transkriberes inn i mRNA og/eller til prosessen hvorved det transkriberte mRNA (også omtalt som et transkript) deretter oversettes til peptider, polypeptider, eller proteiner.
15 Transkriptene og de kodede polypeptider er kollektivt omtalt som et genprodukt. Dersom polynukleotidet er avledet fra genom DNA, kan ekspresjon i en eukaryot celle inkludere spleising av mRNA.

En "vektor" er et nukleinsyremolekyl, særlig selvreplikerende, som overfører et
20 insertert nukleinsyremolekyl inn i og/eller mellom vertsceller. Betegnelsen inkluderer vektorer som primært virker for insersjon av DNA eller RNA inn i en celle (f.eks. kromosomal integrering), replikasjon av vektorer som fungerer primært for replikasjon av DNA eller RNA, og ekspresjonsvektorer som virker for transkripsjon og/eller translasjon av DNA eller RNA. Også inkludert er vektorer som tilveiebringer mer enn
25 én av funksjonene som beskrevet.

En "ekspresjonsvektor" er et polynukleotid som, når innført i en passende vertscelle, kan transkriberes og translateres til et polypeptid. Et "ekspresjonssystem" refererer vanligvis til en passende vertscelle som omfatter en ekspresjonsvektor som kan
30 fungere til å gi et ønsket ekspresjonsprodukt.

De bivalente, bispesifikke antistoffer ifølge oppfinnelsen fremstilles foretrukket ved hjelp av rekombinante midler. Slike metoder er omfattende kjent innen teknikkens stand, og omfatter proteinekspresjon i prokaryote og eukaryote celler med påfølgende
35 isolering av antistoffpolypeptidet, og vanligvis rensing til en farmasøytisk akseptert renhet. For proteinekspresjonen, blir nukleinsyrer som koder for lette og tunge kjeder eller fragmenter derav, innført i ekspresjonsvektorer ved standard metoder.

Ekspresjon gjennomføres i prokaryote eller eukaryote vertsceller slik som CHO-celler, NS0-celler, SP2/0-celler, HEK293-celler, COS-celler, gjær eller E. coli celler, og antistoffet utvinnes fra cellene (supernatant eller celler etter lysis). De bivalente, bispesifikke antistoffer kan være tilstede i hele celler, i et cellelysat, eller i en delvis
 5 rensset, eller i alt vesentlig ren form. Rensing gjennomføres for å eliminere andre cellekomponenter eller andre kontaminanter, f.eks. andre cellulære nukleinsyrer eller proteiner, ved hjelp av standardteknikker som inkluderer alkalisk/SDS-behandling, kolonnekromatografi, og andre som er vel kjent innen teknikken. Se Ausubel, F., et al., red., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley
 10 Interscience, New York (1987).

Ekspresjon i NS0-celler er beskrevet ved f.eks. Barnes, L.M., et al., Cytotechnology 32 (2000) 109-123; og Barnes, L.M., et al., Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270. Transient ekspresjon er beskrevet ved f.eks. Durocher, Y., et al., Nucl. Acids. Res. 30
 15 (2002) E9. Kloning av variable domener er beskrevet ved Orlandi, R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289; og Norderhaug, L., et al., J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87. Et foretrukket transient ekspresjonssystem (HEK 293) er beskrevet av Schlaeger, E.-J., og Christensen, K., i Cytotechnology 30 (1999) 71-83 og av
 20 Schlaeger, E.-J., i Immunol. Methods 194 (1996) 191-199.

Kontrollsekvensen som er egnet for prokaryoter inkluderer for eksempel en promoter, eventuelt en operatorsekvens, og et ribosombindingssete. Eukaryote celler er kjent til
 25 å benytte promotere, enhancere og polyadenyleringssignaler.

Nukleinsyre er "operabelt koblet" når den er plassert i en funksjonell sammenheng med en annen nukleinsyresekvens. DNA for en pre-sekvens eller sekretorisk leder er f.eks. operabelt koblet til DNA for et polypeptid dersom det er uttrykt som et preprotein som presipiterer med sekresjonen av polypeptidet; en promoter eller
 30 enhancer er operabelt koblet til en kodet sekvens, dersom den påvirker transkripsjonen av sekvensen; eller et ribosombindingssete er operabelt koblet til en kodet sekvens, dersom det er posisjonert slik at det forenkler translasjon. Generelt betyr "operabelt koblet" at DNA-sekvensene som er koblet er tilgrensende, og, i tilfelle av en sekretorisk leder, tilgrensende og i leseramme. Enhancere må imidlertid ikke
 35 være tilgrensende. Kobling gjennomføres ved ligering ved passende restriksjonssteder. Dersom slike seter ikke eksisterer, blir de syntetiske oligonukleotidadaptere eller linkere anvendt i overensstemmelse med konvensjonell praksis.

De bivalente, bispesifikke antistoffer separeres passende fra dyrkingsmediet ved konvensjonelle immunoglobulinrenseprosedyrer som f.eks. protein A-Sepharose, hydroksylapatitt, kromatografi, gelelektroforese, dialyse eller affinitetskromatografi. DNA og RNA som koder for de monoklonale antistoffene isoleres lett, og sekvenseres ved å anvende konvensjonelle prosedyrer. Hybridomcellene kan tjene som en kilde for slikt DNA og RNA. Når isolert, kan DNA innføres i ekspresjonsvektorer, som deretter transfekteres inn i vertsceller, slik som HEK293-celler, CHO-celler eller myelomceller som ikke på annen måte produserer immunoglobulin, for å oppnå syntesen av rekombinante monoklonale antistoffer i vertscellen.

10

Aminosyresekvensvarianter (eller mutanter) av det bivalente, bispesifikke antistoff, fremstilles for å innføre passende nukleotidforandringer i antistoff-DNA'et, eller ved nukleotidsyntese. Slike modifikasjoner kan imidlertid kun gjennomføres i et svært begrenset område, f.eks. som beskrevet ovenfor. Modifikasjonene endrer f.eks. ikke de overnevnte antistoffegenskapene slik som IgG-isotypen og antigenbinding, men kan forbedre utbyttet av den rekombinante produksjon, proteinstabilitet eller forenkling rensingen.

15

De etterfølgende eksempler, sekvenslister og figurer er tilveiebrakt for å hjelpe til med å forstå den foreliggende oppfinnelse, hvor den faktiske rammen er angitt ved de vedlagte kravene.

20

Sekvensliste

- SEKV. ID nr. 1 aminosyresekvens av villtype <IGF-1R> antistoff tung kjede
- SEKV. ID nr. 2 aminosyresekvens av villtype <IGF-1R> antistoff lett kjede
- SEKV. ID nr. 3 aminosyresekvens av den tunge kjeden** (HC**) av <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff, hvor tung kjede domenet CH1 er erstattet med lett kjede domenet CL.
- SEKV. ID nr. 4 aminosyresekvensen av den lette kjeden** (LC**) av <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff, hvor lett kjede domenet CL er erstattet med tung kjede domenet CH1.
- SEKV. ID nr. 5 aminosyresekvensen av IGF-1R ektodomene His-streptavidin bindingspeptid-tag (IGF-1R-His-SBP ECD).
- SEKV. ID nr. 6 aminosyresekvens av villtype ANGPT2 <ANGPT2> antistoff tung kjede.
- SEKV. ID nr. 7 aminosyresekvens av villtype ANGPT2 <ANGPT2> antistoff lett kjede.
- SEKV. ID nr. 8 aminosyresekvens av CH3-domenet (Knobs) med en T366W-utveksling for anvendelse i "knobs-into-holes"-teknologien.

35

SEKV. ID nr. 9 aminosyresekvens CH3-domene (Hole) med en T366S-, L368A-, Y407V-utveksling for anvendelse i "knobs-into-holes"-teknologien.

SEKV. ID nr. 10 aminosyresekvens av IGF-1R ektodomene His-streptavidin bindingspeptid-tag (IGF-1R-His-SBP ECD).

5

Beskrivelse av figurene

Figur 1: Skjematisk figur av IgG, et naturlig forekommende hel-antistoff spesifikt for ett antigen med to par av tung og lett kjede som omfatter variable og konstante domener i en typisk rekkefølge.

10

Figur 2: Skjematisk figur av et bivalent, bispesifikt antistoff som omfatter: a) den lette kjeden og tunge kjeden av et antistoff, som spesifikt binder til et første antigen; og b) den lette kjeden og tunge kjeden til et antistoff som spesifikt binder til et andre antigen, hvor de konstante domenene CL og CH1 er erstattet med hverandre.

15

Figur 3: Skjematisk figur av et bivalent, bispesifikt antistoff som omfatter: a) den lette kjeden og tunge kjeden av et antistoff som spesifikt binder til et første antigen; og b) den lette kjeden og tunge kjeden av et antistoff som spesifikt binder til et andre antigen, hvor de konstante domenene CL og CH1 er erstattet med hverandre, og hvor CH3-domenene for begge tunge kjeder er endret ved "knobs-into-holes"-teknologien.

20

Figur 4: Skjematisk figur av et bivalent, bispesifikt antistoff, som omfatter: a) den lette kjeden og tunge kjeden av et antistoff som spesifikt binder til et første antigen; og b) den lette kjeden og tunge kjeden til et antistoff som spesifikt binder til et andre antigen, hvor de konstante domener CL og CH1 er erstattet med hverandre, og hvor ett av konstant tung kjede domenene CH3 i begge tunge kjeder er erstattet med et konstant tung kjede domene CH1, og det andre konstant tung kjede domenet CH3 er erstattet med et konstant lett kjede domene CL.

25

30

Figur 5: Proteinsekvensskjema for tung kjede** <IGF-1R> HC** av <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoffet (med et kappa konstant lett kjede domene CL).

Figur 6: Proteinsekvensskjema av lett kjede** <IGF-1R> LC** av <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsstoffet.

35

Figur 7: Plasmidkart av tung kjede** <IGF-1R> HC**-ekspresjonsvektor pUC-HC**-IGF-1R.

Figur 8: Plasmidkart av lett kjede** <IGF-1R> LC**-ekspresjonsvektor pUC-LC**-IGF-1R.

Figur 9: Plasmidkart av 4700-Hyg-OriP-ekspresjonsvektoren.

5

Figur 10: Analyseprinsipp av cellulær FACS IGF-1R-ANGPT2-brodannelsesanalyse på I24 IGF-1R-uttrykkende celler, for å detektere tilstedeværelsen av bifunksjonelt spesifikt <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff.

10

Figur 11: Skjema IGF-1R ECD Biacore.

Figur 12: SDS-PAGE og størrelseseksklusjonskromatografi av renset monospesifikt, bivalent <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff (IgG1**) med HC** og LC** isolert fra cellekultursupernatanter etter transigen tranfeksjon av HEK293-F-celler.

15

Figur 13: Binding av monospesifikt <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff og villtype <IGF-1R> antistoff mot IGF-1R ECD i en ELISA-basert bindingsanalyse.

20

Figur 14: SDS-PAGE av og størrelseseksklusjonskromatografi <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoffblanding renset fra cellekultursupernatanter fra transient transfekterte HEK293-F-celler.

25

Figur: 15 Resultater for prøver A til F av cellulær FACS IGF-1R-ANGPT2-brodannelsesanalyse på I24 IGF-1R-uttrykkende celler for å detektere tilstedeværelse av funksjonelt bispesifikt <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff i renset antistoffblanding: Rensede proteiner

Prøver A til F:

A = I24 ubehandlet

B = I24 + 2 µg/mL hANGPT2 + hIgG Isotype

30

C = I24 + 2 µg/mL hANGPT2 + blanding fra ko-ekspresjon av <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff og <ANGPT2> villtypeantistoff som omfatter bispesifikt <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff

D: ikke tilstede

E = I24 + 2 µg/mL hANGPT2 + <ANGPT2> villtypeantistoff

35

F = I24 + 2 µg/mL hANGPT2 + <IGF-1R> villtypeantistoff

Eksempler

Materialer og generelle metoder

Generell informasjon med hensyn til nukleotidsekvensene av lette og tunge kjeder i humane immunoglobuliner er gitt i: Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. utgave, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Aminosyrer i antistoffkjeder er nummerert og omtalt i henhold til EU-nummerering (Edelman, G.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. Utgave, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)).

10

Rekombinante DNA-teknikker

Standard metoder ble anvendt for å manipulere DNA som beskrevet i Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Reagenser for molekylær biologi ble anvendt i henhold til produsentens instruksjoner.

15

Gensyntese

Ønskede gensegmenter ble fremstilt fra oligonukleotider dannet ved kjemisk syntese. 600-1800 bp lange gensekvenser som er flankert ved singulære restriksjonsendonukleasespaltingssteder, ble samlet ved annealing og ligering av oligonukleotider som inkluderer PCR-amplifikasjon, og deretter klonet via de indikerte restriksjonssteder f.eks. KpnI/SacI eller AscI/PacI inn i pPCRScript (Sratagene) basert pGA4-kloningsvektor. DNA-sekvensene av de subklonede genfragmentene ble bekreftet ved DNA-sekvensering. Gensyntesefragmenter ble bestilt i henhold til gitte spesifikasjoner ved Geneart (Regensburg, Tyskland).

20

25

DNA-sekvensbestemmelse

DNA-sekvenser ble bestemt ved dobbelttrådsekvensering gjennomført ved MediGenomix GmbH (Martinsried, Tyskland), eller Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Tyskland).

30

DNA- og proteinsekvensanalyser og sekvensdatahåndtering

GCG'er (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) software package versjon 10.2, og Infomax vektor NT1 Advance suite versjon 8.0 ble anvendt for sekvensdannelse, kartlegging, analyse, kommentar og illustrasjon.

35

Ekspresjonsvektorer

For ekspresjonen av de ønskede antistoffvarianter av ekspresjonsplasmider for transient ekspresjon (f.eks. i HEG293 EBNA eller HEK293-F) ble celler basert enten på en cDNA-organisering med en CMV-Intron A-promoter, eller en genomisk organisering med CMV-promoter anvendt.

Foruten antistoffekspresjonskassetten inneholdt vektorene:

- et replikasjonsorigo som tillater replikasjon av dette plasmid i *E. coli*, og
- et β -laktamasegen som gir ampicillinresistens i *E. coli*.

Transkripsjonsenheten for antistoffgenet er sammensatt av de etterfølgende elementer:

- ett eller flere unike restriksjonssteder i 5'-enden,
- umiddelbar tidlig enhancer og promoter fra humant cytomegalovirus,
- etterfulgt av Intron A-sekvens i tilfellet av cDNA-organisering,
- en 5'-utranslatert region av et humant antistoffgen,
- en immunoglobulin tung kjede signalsekvens,
- den humane antistoffkjede (villtype eller med domeneutveksling) enten som cDNA eller som genomorganisering med en immunoglobulin ekson-intron-organisering,
- en 3' utranslatert region med en polyadenyleringssignalsekvens, og
- ett eller flere unike restriksjonssteder i 3'-enden.

Fusjonsgenene som omfatter de ønskede antistoffkjeder som beskrevet nedenfor, ble dannet ved PCR og/eller gensyntese, og samlet med kjente rekombinante metoder og teknikker ved tilkobling av de tilsvarende nukleinsyresegmenter ved f.eks. anvendelse av unike restriksjonssteder i de respektive vektorer. De subklonede nukleinsyresekvensene ble verifisert ved DNA-sekvensering. For transiente transfeksjoner ble større mengder av plasmidene fremstilt ved plasmidfremstilling fra transformerte *E. coli* kulturer (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

Celledyrkingsteknikker

Standard celledyrkingsteknikker ble anvendt som beskrevet i Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. og Yamada, K.M. (red.), John Wiley & Sons, Inc.

Bispesifikke antistoffer ble uttrykt ved transient ko-transfeksjon av de respektive ekspresjonsplasmider i adherente voksende HEK293-EBNA- eller i HEK29-F-celler som vokser i suspensjon som beskrevet nedenfor.

5 **Transiente transfeksjoner i HEK293-EBNA-system**

Bispesifikke antistoffer ble uttrykt ved transient ko-transfeksjon av de respektive ekspresjonsplasmider (f.eks. som koder for tung og modifisert tung kjede, så vel som den tilsvarende lette og modifiserte lette kjede) i adherent voksende HEK293-EBNA-celler (human embryonisk nyrecellelinje 293, som uttrykker Epstein-Barr-virus

10 nukleært antigen; American type culture collection deponeringsnummer ATCC # CRL-10852, Lot. 959 218), dyrket i DMEM (Dulbeccos modifiserte Eagles medium, Gibco), supplert med 10 % Ultra Low IgG FCS (føtalt kalveserum, Gibco), 2 mM L-glutamin (Gibco), og 250 µg/ml Geneticin (Gibco). For transfeksjon ble FuGENE™ 6 transfeksjonsreagens (Roche Molecular Biochemicals) anvendt i et forhold av

15 FuGENE™-reagens (µl) til DNA (µg) på 4:1 (som strekker seg fra 3:1 til 6:1). Proteiner ble uttrykt fra de respektive plasmider ved å anvende et molart forhold av (modifisert og villtype) lett kjede og tung kjede kodende plasmider på 1:1 (ekvimolar) som strekker seg fra henholdsvis 1:2 til 2:1. Celler ble tilført, på dag 3, L-glutamin ad 4 mM, glukose [Sigma], og NAA [Gibco]. Bispesifikt antistoff-inneholdende

20 cellekultursupernatanter ble høstet fra dag 5 til 11 etter transfeksjon ved sentrifugering, og lagret ved -20°C. Generell informasjon med hensyn til den rekombinante ekspresjon av humane immunoglobuliner i f.eks. HEK293-celler er gitt i: Meissner, P. et al., Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203.

25 **Transiente transfeksjoner i HEK293-F-system**

Bispesifikke antistoffer ble dannet ved transient transfeksjon av de respektive plasmider (f.eks. koder for tung og modifisert tung kjede, så vel som for den tilsvarende lette og modifisert lette kjede) ved å anvende HEK293-F-systemet (Invitrogen) i henhold til produsentens instruksjon. Kort ble HEK293-F-celler

30 (Invitrogen) som ble dyrket i suspensjon i enten en rystekolbe eller en omrørt fermentor i serumfritt FreeStyle 293-ekspresjonsmedium (Invitrogen) transfektert med en blanding av fire ekspresjonsplasmider og 293fektin eller fektin (Invitrogen). For en 2 L rystekolbe (Corning) ble HEK293-F-celler inokulert i en densitet på $1,0 \times 10^6$ celler/mL i 600 mL, og inkubert ved 120 rpm, 8 % CO₂. Dagen etter ble cellene

35 transfektert ved en celledensitet på omtrent $1,5 \times 10^6$ celler/mL, med omtrent 42 mL blanding av A) 20 mL Opti-MEM (Invitrogen) med 600 µg totalt plasmid-DNA (1 µg/mL) som koder for henholdsvis tung og modifisert tung kjede, og den tilsvarende

lette kjede i et ekvimolart forhold, og B) 20 ml Opti-MEM + 1,2 mL 293 fektin eller fektin (2 µg/mL). I henhold til glukoseforbruk, ble glukoseoppløsning tilsatt under fermenteringen. Supernatanten som inneholdt det utskilte antistoff ble høstet etter 5-10 dager, og antistoffer ble enten direkte rensset fra supernatanten, eller
5 supernatanten ble frosset og lagret.

Proteinbestemmelse

Proteinkonsentrasjonen av rensede antistoffer og derivater ble bestemt ved å bestemme den optiske densitet (OD) ved 280 nm, ved å anvende en molar
10 ekstinksjonskoeffisient basert på grunnlag av aminosyresekvensen i henhold til Pace et al., Protein Science, 1995, 4, 2411-1423.

Antistoffkonsentrasjonsbestemmelse i supernatanter

Konsentrasjonen av antistoffer og derivater i cellekultursupernatanter ble estimert ved
15 immunopresipitering med protein A agarose-kuler (Roche). 60 µL protein A agarosekuler ble vasket tre ganger i TBS-NP40 (50 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % Nonidet-P40). Deretter ble 1-15 mL cellekultur anvendt på protein A agarosekulene som var pre-ekvilibrert i TBS-NP40. Etter inkubasjon i 1 time ved romtemperatur, ble kulene vasket på en ultrafri-MC-filter-kolonne (Amicon) én gang med 0,5 mL TBS-
20 NP40, to ganger med 0,5 mL 2x fosfatbufret saltvann (2sPBS, Roche), og kort fire ganger med 0,5 mL 100 mM Na-sitrat pH 5,0. Bundet antistoff ble eluert ved tilsetning av 35 µl NuPAGE® LDS prøvebuffer (Invitrogen). Halvparten av prøven ble kombinert med henholdsvis NuPAGE® prøvereduserende middel, eller det fikk være uredusert, og ble oppvarmet i 10 minutter ved 70°C. Følgelig ble 5-30 µl tilført til en 4-12 %
25 NuPAGE® Bis-Tris SDS-PAGE (Invitrogen) (med MOPS-buffer for ikke-redusert SDS-PAEG og MES-buffer med NuPAGE® antioksidant kjørebuffersadditiv (Invitrogen) for redusert SDS-PAGE) og farget med Coomassie blått.

Konsentrasjonen av antistoffer og derivater i cellekultursupernatanter ble kvantitativt
30 målt ved affinitets HPLC-kromatografi. Kort ble cellekultursupernatanter inneholdende antistoffer og derivater som binder til protein A tilført til en Applied Biosystems Poros A/20 kolonne i 200 mM KH₂PO₄, 100 mM natriumsitrat, pH 7,4, og eluert fra matriksen med 200 mM NaCl, 100 mM sitronsyre, pH 2,5 på et Agilent HPLC 1100 system. Det eluerte protein ble kvantifisert ved UV-absorbans og integrering av
35 topparealer. Et rensset standard IgG1-antistoff tjente som en standard.

Alternativt ble konsentrasjonen av antistoffer og derivater i cellekultursupernatanter målt ved Sandwich-IgG-ELISA. Kort ble StreptaWell High Bind Streptavidin A-96-brønnmikrotiterplater (Roche) belagt med 100 µL/brønn biotinyllert anti-human IgG kapringsmolekyl F(ab')₂<h-Fcγ> BI (Dianova) ved 0,1 µg/mL i 1 time ved romtemperatur, eller alternativt over natten ved 4°C, og deretter vasket tre ganger med 200 µL/brønn PBS, 0,05 % Tween (PBST, Sigma). 100 µL/brønn av en fortyningsserie i PBS (Sigma) av de respektive antistoffinneholdende cellekultursupernatanter ble tilsatt til brønner, og inkubert i 1-2 timer på en mikrotiterplateryster ved romtemperatur. Brønnene ble vasket tre ganger med 200 µL/brønn PBST, og bundet antistoff ble detektert med 100 µL F(ab')₂<hFcγ>POD (Dianova) ved 0,1 µg/mL som deteksjonsantistoff i 1-2 timer på en mikrotiterplateryster ved romtemperatur. Ubundet deteksjonsantistoff ble vasket bort tre ganger med 200 µL/brønn PBST, og det bundne deteksjonsantistoff ble detektert ved tilsetning av 100 µL ABTS/brønn. Bestemmelse av absorbans ble gjennomført på et Tecan Fluor spektrometer ved en målebølgelengde på 405 nm (referansebølgelengde 492 nm).

Proteinrensing

Proteiner ble rensset fra filtrerte cellekultursupernatanter under henvisning til standard protokoller. Kort, ble antistoffer påført på en protein A Sepharose kolonne (GE healthcare) og vasket med PBS. Eluering av antistoffer ble oppnådd ved pH 2,8, etterfulgt av en umiddelbar nøytralisering av prøven. Aggregererte proteiner ble separert fra monomere antistoffer ved størrelseseksklusjonskromatografi (Superdex 200, GE Healthcare) i PBS, eller i 20 mM histidin, 150 mM CaCl pH 6,0. Monomere antistoffraksjoner ble samlet, konsentrert om nødvendig ved å anvende f.eks. en MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO) sentrifugekonsentrator, frosset og lagret ved -20°C eller -80°C. Noe av prøvene ble tilveiebrakt for påfølgende proteinanalyse, og analytisk karakterisering ved f.eks. SDS-PAGE, størrelseseksklusjonskromatografi eller massespektrometri.

SDS-PAGE

NuPAGE® Pre-Cast gelsystemet (Invitrogen) ble anvendt i henhold til produsentens instruksjoner. Spesielt ble 10 % eller 4-12 % NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Gastgeler (pH 6,4) og en NuPAGE® MES (reduserte geler, med NuPAGE® antioksidantkjørebufferadditiv) eller MOPS (ikke-reduserte geler) kjørebuffer anvendt.

Analytisk størrelsesekskluderingskromatografi

Størrelsesekskluderingskromatografi for bestemmelse av aggregering og oligomere tilstand til antistoffer ble gjennomført ved HPLC-kromatografi. Kort, ble protein A rensede antistoffer tilført til en Tosoh TSKgel G3000SW-kolonne i 300 mM NaCl, 50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7,5 på et Agilent HPLC 1100-system, eller til en Superdex 200 kolonne (GE Healthcare) i 2 x PBS på et Dionex HPLC-system. Det eluerte protein ble kvantifisert ved UV-absorbans og integrering av topparealer. BioRad gelfiltrerings-standard 151-1901 tjente som en standard.

Massespektrometri

Den totale deglykosylerte massen av kryssoverantistoffer ble bestemt og bekreftet via elektroprayoniserings-massespektrometri (ESI-MS). Kort ble 100 µg rensede antistoffer deglykosylert med 50 mU N-glykosidase F (PNGaseF, ProZyme) i 100 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7 ved 37°C i 12-24 timer ved en proteinkonsentrasjon opp til 2 mg/ml, og ble deretter avsaltet via HPLC på en Sephadex G25-kolonne (GE Healthcare). Massen av de respektive tunge og lette kjeder ble bestemt ved ESI-MS etter deglykosylering og reduksjon. Kort ble 50 µg antistoff 115 µl inkubert med 60 µl 1M TCEP, og 50 µl 8 M guanidinhydroklorid, og deretter avsaltet. Den totale massen og massen av de reduserte tunge og lette kjeder ble bestemt via ESI-MS på et Q-Star Elite MS-system utstyrt med en NanoMate-kilde.

IGF-1R ECD-binding ELISA

Bindingsegenskapene til de genererte antistoffer ble evaluert i en ELISA-analyse med IGF-1R ekstracellulært domene (ECD). For dette, ble det ekstracellulære domenet av IGF-1R (rester 1-462) omfattende den naturlige ledesequens, og de LI-cysteinrike-12-domener av det humane IGF-1R ektodomenet av alfakjeden (i henhold til McKern et al., 1997; Ward et al., 2001) fusjonert til en N-terminal His-streptavidin-bindingspeptid-tag (His-SBP), klonet inn i et pcDNA3-vektorderivat og uttrykt transient i HEK293F-celler. Proteinsekvensen for IGF-1R-His-SBP ECD er gitt i SEKV. ID nr. 10. StreptaWell High Bind streptavidin A-96-brønn mikrotiterplater (Roche) ble belagt med 100 µL/brønn cellekultursupernatant som inneholdt oppløselig IGF-1R-ECD-SBP-fusjonsprotein over natten ved 4°C, og ble vasket tre ganger med 200 µL/brønn PBS, 0,05 % Tween (PBST, Sigma). Deretter ble 100 µL/brønn av en fortyningsserie av det respektive antistoff og, som en referanse, villtype <IGF-1R> antistoff i PBS (Sigma) som inkluderer 1 % BSA (fraksjon V, Roche) tilsatt til brønnene og ble inkubert i 1-2 timer på en mikrotiterplaterystyr ved romtemperatur. For fortyningsserien ble samme mengde rensed antistoff tilført til brønnene. Brønnene ble

vasket tre ganger med 100 µL/brønn PBST, og bundet antistoff ble detektert med 100 µL/brønn F(ab')₂-hFcγ-POD (Dianova) ved 0,1 µg/mL (1:8000) som deteksjonsantistoff i 1-2 timer på en mikrotiterplateryst ved romtemperatur. Ubundet deteksjonsantistoff ble vasket bort tre ganger med 200 µL/brønn PBST, og det bundne deteksjonsantistoff ble detektert ved tilsetning av 100 µL ABTS/brønn. Bestemmelse av absorbans ble gjennomført på et Tecan fluorspektrometer ved en målebølgelengde på 405 nm (referansebølgelengde 492 nm).

IGF-1R ECD Biacore

Binding av de dannede antistoffer til human IGF-1R ECD ble også undersøkt ved overflateplasmonresonans ved å anvende et BIACORE T100-instrument (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Sverige). Kort, for affinitetsmålinger, ble geit-anti-human IgG, JIR 109-005-098 antistoffer immobilisert på en CM5-chip via aminkobling for presentasjon av antistoffer mot human IGF-1R ECD-Fc-tagget. Binding ble målt i HBS-buffer (HBS-P (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005 % Tween 20, pH 7,4), 25°C. IGF-1R ECD (R&D Systems eller rensset på huset) ble tilsatt i forskjellige konsentrasjoner i oppløsning. Assosiasjon ble målt ved en IGF-1R ECD-injeksjon i 80 sekunder til 3 minutter; dissosiasjon ble målt ved å vaske chip-overflaten med HBS-buffer i 3-10 minutter, og en KD-verdi ble estimert ved å anvende en 1:1 Langmuir bindingsmodell. På grunn av lav lastedensitet og kapringsnivå for <IGF-1R> antistoffer ble monovalent IGF-1R ECD-binding oppnådd. Negativ kontroll-data (f.eks. bufferkurver) ble subtrahert fra prøvekurver for korreksjon av iboende grunnlinjesystemdrift for støysignalreduksjon. Biacore T100 Evaluation Software version 1.1.1 ble anvendt for analyse av sensorgrammer, og for beregning av affinitetsdata. Figur 11 viser et skjema av Biacore-analysen.

Eksempel 1

Fremstilling, ekspresjon, rensing og karakterisering av monospesifikt, bivalent <IGF-1R> antistoff, hvor de variable domener CL og CH1 er erstattet med hverandre (forkortet her som <IGF-1R> CL-CH1 utvekslingsantistoff).

Eksempel 1A

Fremstilling av ekspresjonsplasmidene for det monospesifikke, bivalente <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff

Sekvensene for tung og lett kjede variable domener av det monospesifikke, bivalente <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff som inkluderer de respektive ledersekvenser beskrevet i dette eksempel, er utledet fra en human <IGF-1R> antistoff tung kjede

(SEKV. ID nr. 1, plasmid 4843-pUC-HC-IGF-1R) og en lett kjede (SEKV. ID nr. 1, plasmid 4842-pUC-LC-IGF-1R) beskrevet i WO 2005/005635, og tung og lett kjede konstante domener er utledet fra et humant antistoff (C-kappa og IgG1).

5 Gensegmentene som koder for <IGF-1R> antistoffledersekvensen, tung kjede variabelt domene (VH), og human kappa lett kjede domenet (CL) ble forenet og fusjonert til 5'-enden av Fc-domenene til human $\gamma 1$ tung kjede konstante domener (hengsel-CH2-CH3). DNA som koder for det respektive fusjonsprotein resulterende fra utvekslingen av CH1-domenet med CL-domenet (CH1-CL-utveksling) ble dannet ved
10 gensyntese, og er betegnet <IGF-1R> HC** (SEKV. ID nr. 3) i det etterfølgende.

Gensegmentene for <IGF-1R> antistoffledersekvensen, lett kjede variabel domenet (VL) og human $\gamma 1$ tung kjede konstant domenet (CH1) ble forenet som uavhengig kjede. DNA som koder for respektivt fusjonsprotein resulterende fra utveksling av CL-
15 domenet med CH1-domenet (CL-CH1-utveksling) ble dannet ved gensyntese, og er betegnet <IGF-1R> LC** (SEKV. ID nr. 4) i det etterfølgende.

Figur 5 og figur 6 viser et skjematisk bilde av proteinsekvensen til den modifiserte <IGF-1R> HC** tunge kjede, og den modifiserte <IGF-1R> LC** lette kjede.

20

I det etterfølgende er de respektive ekspresjonsvektorer kort beskrevet:

Vektor pUC-HC**-IGF-1R

25 Vektor pUC-HC**-IGF-1R er et ekspresjonsplasmid, f.eks. for transient ekspresjon av en CL-CH1-utveksling <IGF-1R> tung kjede HC** (cDNA organisert ekspresjonskasset; med CMV-Intron A) i HEK293 (EBNA)-celler, eller for stabil ekspresjon i CHO-celler.

30 Foruten <IGF-1R> HC**-ekspresjonskassetten, inneholder denne vektor:

- et replikasjonsorigo fra vektoren pUC18, som tillater replikasjon av dette plasmid i E. coli, og
- et β -laktamasegen som gir ampicillinresistens i E. coli.

35 Transkripsjonsenheten av <IGF-1R> HC**-genet er sammensatt av de etterfølgende elementer:

- AscI-restriksjonssete i 5'-enden,

- den umiddelbare tidlige enhancer og promoter fra humant cytomegalovirus,
- etterfulgt av Intron A-sekvens,
- en 5' utranslatert region av et humant antistoffgen,
- en immunoglobulin lett kjede signalsekvens,
- 5 - den humane <IGF-1R> modne HC**-kjede som koder for en fusjon av human tung kjede variabelt domenet (VH), og human kappa lett kjede konstant domenet (CL) fusjonert til 5'-enden av Fc-domenene av human γ 1 tung kjede konstante domenenene (hengsel-CH2-CH3).
- en 3' utranslatert region med en polyadenyleringssignalsekvens, og
- 10 - restriksjonssetet SgrAI i 3'-enden.

Plasmidkartet for tung kjede** CL-CH1-utveksling <IGF-1R> HC**-ekspresjonsvektoren pUC-HC**-IGF-1R er vist i figur 7. Aminosyresekvensen for <IGF-1R> HC** (inkluderende signalsekvens) er gitt i SEKV. ID nr. 3.

15

Vektor pUC-LC**-IGF-1R

Vektor pUC-LC**-IGF-1R er et ekspresjonsplasmid, f.eks. for transient ekspresjon av CL-CH1-utveksling <IGF-1R> lett kjede LC** (cDNA-organisert ekspresjonskasset; med CMV-Intron A) i HEK293 (EBNA)-celler, eller for stabil ekspresjon i CHO-celler.

20

Foruten <IGF-1R>LC**-ekspresjonskassetten, inneholder denne vektor:

- et replikasjonsorigo fra vektoren pUC18, som tillater replikasjon av dette plasmid i E. coli, og
- 25 - et β -laktamasegen som gir ampicillinresistens i E. coli.

Transkripsjonsenheten for <IGF-1R>LC**-genet er sammensatt av de etterfølgende elementer:

- restriksjonssetet Sse83871 i 5'-enden,
- 30 - den umiddelbare tidlige enhancer og promoter fra humant cytomegalovirus,
- etterfulgt av Intron A-sekvensen,
- en 5' utranslatert region av et humant antistoffgen,
- en immunoglobulin tung kjede signalsekvens,
- human <IGF-1R> antistoff moden LC**-kjede som koder for en fusjon av human lett kjede variabelt domenet (VL), og human γ 1 tung kjede konstant domenenene (CH1),
- 35 - en 3' utranslatert region med en polyadenyleringssignalsekvens, og

- restriksjonssetene SalI og FseI i 3'-enden.

Plasmidkartet for lett kjede** LC-CH1-utveksling <IGF-1R>LC**-ekspresjonsvektoren pUC-LC**-IGF-1R er vist i figur 8. Aminosyresekvensen for <IGF-1R>LC** (som
5 inkluderer en signalsekvens) er gitt i SEKV. ID nr. 4.

Plasmider pUC-HC**-IGF-1R og pUC-LC**-IGF-1R kan anvendes for transient eller stabil ko-transfeksjon, f.eks. inn i HEK293, HEK293 EBNA eller CHO-celler (2-vektorsystem). For sammenlikning, ble villtype <IGF-1R> antistoffet transient uttrykt
10 fra plasmider 4842-pUC-LC-IGF-1R (SEKV. ID nr. 2) og 4843-pUC-HC-IGF-1R (SEKV. ID nr. 1) analogt med dem beskrevet i dette eksempel.

For å oppnå høyere ekspresjonsnivåer i transiente ekspresjoner i HEK293 EBNA-celler kan <IGF-1R> HC**-ekspresjonskassetten sub-klones via AscI, SgrAI-seter og <IGF-1R> LC**-ekspresjonskassetten kan sub-klones via Sse8387I- og FseI-seter inn i
15 4700 pUC-Hyg_OriP-ekspresjonsvektoren som inneholder

- et OriP-element, og
- et hygromycinresistensgen som en selekterbar markør.

20 Tung og lett kjede transkripsjonsenheter kan enten være sub-klonet inn i to uavhengige 4700-pUC-Hyg-OriP-vektorer for ko-transfeksjon (2-vektorsystem), eller de kan klones inn i én felles 4700-pUC-Hyg-OriP-vektor (1-vektorsystem) for påfølgende transiente eller stabile transfeksjoner med de resulterende vektorene. Figur 9 viser et plasmidkart av basisvektoren 4700-pUC-OriP.

25

Eksempel 1B

Fremstilling av monospesifikke, bivalente <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff-ekspresjonsplasmider

<IGF-1R> fusjonsgenene (HC**- og LC**-fusjonsgener) som omfatter de utvekslede Fab-sekvenser av villtype <IGF-1R> antistoffet, ble samlet ved kjente rekombinante metoder og teknikker ved kobling av de tilsvarende nukleinsyresegmenter.
30

Nukleinsyresekvensene som koder for IGF-1R HC** og LC** ble hver syntetisert ved kjemisk syntese, og deretter klonet inn i en pPCRScript (Stratagene) basert pGA4-kloningsvektor ved Geneart (Regensburg, Tyskland). Ekspresjonskassetten som koder
35 for IGF-1R HC** ble ligert inn i det respektive E. coli plasmid via PvuII- og BmgBI-restriksjonsseter resulterende i en endelig vektor pUC-HC**-IGF-1R;

ekspresjonskassetten som koder for det respektive IGF-1R LC** ble ligert inn i det respektive E. coli plasmid via pVulII- og SalI-restriksjonssteder resulterende i den endelige vektor pUC-LC**-IGF-1R. De sub-klonede nukleinsyresekvenser ble verifisert ved DNA-sekvensering. For transiente og stabile transfeksjoner ble større mengder av plasmidene fremstilt ved plasmidfremstilling fra transformerte E. coli kulturer (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

Eksempel 1C

Transient ekspresjon av monospesifikt, bivalent IGF-1R > CL-CH1-utvekslingsantistoff, rensing og bekreftelse av identitet ved massespektrometri

Rekombinant <IGF-1R> utvekslingsantistoff ble uttrykt ved transient ko-transfeksjon av plasmider pUC-HC**-IGF-1R og pUC-LC**-IGF-1R i HEK293-F-suspensjonsceller som beskrevet ovenfor.

Det uttrykte og utskilte monospesifikke, bivalente <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff ble rensset fra filtrerte cellekultursupernatanter ved protein A affinitetskromatografi i henhold til det som er beskrevet ovenfor. Kort ble <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoffet som inneholdt cellekultursupernatanter fra transiente transfeksjoner klargjort ved sentrifugering og filtrering, og påført på en Protein A HiTrap MNabSelect Xtra kolonne (GE Healthcare) ekvilibrert med PBS-buffer (10 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl og 2,7 mM KCl, pH 7,4). Ubundne proteiner ble vasket ut med PBS-ekvibreringsbuffer, fulgt av 0,1 M natriumsitratbuffer, pH 5,5, og vasket med PBS. Eluering av antistoff ble oppnådd med 100 mM natriumsitrat, pH 2,8, etterfulgt av umiddelbar nøytralisering av prøven med 300 µl 2 M Tris pH 9,0 pr. 2 ml fraksjon. Aggregert protein ble separert fra monomere antistoffer ved størrelseseksklusjonskromatografi på en HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade kolonne (GE Healthcare) i 20 mM histidin, 150 mM NaCl pH 6,0, og monomere antistofffraksjoner ble deretter konsentrert ved anvendelse av en MILLIPORE Amicon Ultra-15 sentrifugekonsentrator. <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff ble frosset og lagret ved -20°C eller -80°C. Integriteten av <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoffet ble analysert ved SDS-PAGE i nærvær og fravær av et reduserende middel, og påfølgende farging med Coomassie brilliant blått som beskrevet ovenfor. Monomer tilstand for <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoffet ble bekreftet ved analytisk størrelseseksklusjonskromatografi (figur 12). Karakteriserte prøver ble tilveiebrakt for påfølgende proteinanalyser og funksjonell karakterisering. ESI-massespektrometri bekreftet den teoretiske molekyllmasse for det fullstendige deglykosylerte <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoffet.

Eksempel 1D

Analyse av IGF-1R-bindingsegenskapene av monospesifikt, bivalent IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff i en IGF-1R ECD-binding ELISA og ved Biacore

5 Bindingsegenskapene til monospesifikt, bivalent <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff ble evaluert i en ELISA-analyse med IGF-1R ekstracellulært domene (ECD) som beskrevet ovenfor. For dette ble det ekstracellulære domenet av IGF-1R (rester 1-462) som omfatter den naturlige ledersekvensen, og LI-cysteinrike 12-domenene av det humane IGF-1R-ektodomene av alfakjeden (i henhold til McKern et al., 1997; 10 Ward et al., 2001) fusjonert til en N-terminal His-streptavidinbindingspeptid-tag (His-SBP), klonet inn i et pcDNA3-vektorderivat, og uttrykt transient i HEK293F-celler. Proteinsekvensen for IGF-1R-His-SBP ECD er gitt som vist ovenfor. Den oppnådde titeringskurven viste at <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff var funksjonelt, og viste sammenliknbare bindingsegenskaper og kinetikker som villtype <IGF-1R> 15 antistoffet innenfor feilgrensen for metoden, og fremstod således fullt funksjonelt (figur 13).

Disse funn ble styrket ved Biacore-data med de respektive rensede antistoffer som viste at det monospesifikke, bivalente <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoffet med 20 en KD-verdi på 3,7 pM hadde en sammenliknbar affinitet og bindingskinetikker for IGF-1R ECD som det originale villtype <IGF-1R> antistoffet med en KD-verdi på 3,2 nM.

Eksempel 1G

25 Analyse av IGF-1R-bindingsegenskapene til monospesifikt, bivalent IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff ved FACS med IGF-1R-overuttrykkende I24-celler

For å bekrefte bindingsaktiviteten av <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff til IGF-1R overuttrykt på overflaten av I24-celler (NIH3T3 celler som uttrykker rekombinant IGF-1R, Roche) ble FACS anvendt. Kort inkuberes 5x10E5 I24-celler pr. FACS-rør med en 30 fortynning av rensed <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff, og villtype <IGF-1R> antistoff som referanse, og inkuberes på is i 1 time. Ubundet antistoff ble vasket bort med 4 ml iskald PBS (Gibco) + 2 % FCS (Gibco). Deretter sentrifugeres celler (5 min. ved 400 g) og bundet antistoff detekteres med F(ab')₂ <hFcγ>PE-konjugat (Dianova) på is i 1 time beskyttet mot lys. Ubundet deteksjonsantistoff ble vasket bort med 4 ml 35 iskald PBS + 2 % FCS. Deretter sentrifugeres celler (5 min. 400 g), resuspenderes i 300-500 µl PBS, og bundet deteksjonsantistoff kvantifiseres på en FACSCalibur eller FACS Canto (BD (FL2-kanal, 10000 celler pr. akvisisjon). Under forsøket blir de

respektive isotypekontroller inkludert for å utelukke eventuelle uspesifikke bindingshendelser. Binding av <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff og villtype <IGF-1R> referanseantistoff til IGF-1R på I24-celler resulterer i et sammenliknbart, konsentrasjonsavhengig skift av gjennomsnittlig fluorescensintensitet.

5

Eksempel 2:

Beskrivelse av et monospesifikt, bivalent <ANGPT2> villtypeantistoff

Eksempel 2A

10 Fremstilling av ekspresjonsplasmidene for det monospesifikke, bivalente <ANGPT2> villtypeantistoff

Sekvensen for tung og lett kjede variable domener av et monospesifikt, bivalent ANGPT2 <ANGPT2> villtypeantistoff som inkluderer de respektive ledersekvenser beskrevet i dette eksempel, er avledet fra en human <ANGPT2> antistoff tung kjede 15 (SEKV. ID nr. 6) og en lett kjede (SEKV. ID nr. 7) beskrevet i WO 2006/045049, og lett og tung kjede konstante domener er avledet fra et humant antistoff (C-kappa og IgG1).

Villtype <ANGPT2> antistoffet ble klonet inn i plasmider SB04-pUC-HC-ANGPT2 20 (SEKV. ID nr. 6) og SB06-pUC-LC-ANGPT2 (SEKV. ID nr. 7) som er analoge med vektorene beskrevet i det foregående eksempel 1A.

For sammenlikning, og for ko-ekspresjonsforsøk (se eksempel 3), ble villtype <ANGPT2> antistoff transient (ko-)uttrykt fra plasmider SB04-pUC-HC-ANGPT2 og 25 SB06-pUC-LC-ANGPT2.

Eksempel 2B

Fremstilling av monospesifikke, bivalente <ANGPT2> villtypeantistoff-ekspresjonsplasmider

30 Nukleinsyresekvensene som koder for ANGPT2> HC og LC ble hver syntetisert ved kjemisk syntese, og deretter klonet inn i en pPCRScrip (Stratagene) basert pGA4-kloningsvektor ved Geneart (Regensburg, Tyskland). Ekspresjonskassetten som koder for <ANGPT2> HC ble klonet inn i det respektive E. coli plasmid resulterende i den endelige vektor SB04-pUC-HC-ANGPT2; ekspresjonskassetten som koder for den 35 respektive <ANGPT2> LC ble klonet inn i det respektive E. coli plasmid resulterende i den endelige vektor SB06-pUC-LC-ANGPT2. De sub-klonede nukleinsyresekvenser ble verifisert ved DNA-sekvensering. For transiente og stabile transfeksjoner ble større

mengder av plasmidene fremstilt ved plasmidfremstilling fra transformerte E. coli kulturer (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

Eksempel 3

5 Ekspresjon av bispesifikt, bivalent <ANGPT2-IGF-1R> antistoff hvori, i den tunge og lette kjeden som spesifikt binder til IGF-1R, er de konstante domener CL og CH1 erstattet med hverandre (forkortet her som <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff)

Eksempel 3A

10 Transient ko-ekspresjon og rensing av <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff og <ANGPT2> villtypeantistoff i HEK293 EBNA-celler til å gi bispesifikt <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff

For å danne et funksjonelt bispesifikt antistoff som gjenkjenner IGF-1R via <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoffet Fab på én side, og <ANGPT2> via <ANGPT2> villtype Fab-region på den annen side, ble de to ekspresjonsplasmidene som koder for <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoffet (eksempel A) ko-uttrykt med to ekspresjonsplasmider som koder for <ANGPT2> villtypeantistoffet (eksempel 2A). Ved å anta en statistisk assosiasjon av villtype tunge kjeder HC og CL-CH1-utvekslings-
15 tunge kjeder HC** resulterer dette i dannelsen av bispesifikt og bivalent <IGF-1R-ANGPT2> CL-CH1-utvekslingsantistoff. Under antakelse om at begge antistoffer er like godt uttrykt, og uten å ta hensyn til biprodukter, vil dette resultere i et 1:2:1 forhold av de tre viktigste produkter A) <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff, B) bispesifikt <IGF-1R-ANGPT2> CL-CH1-utvekslingsantistoff, og C) <ANGPT2> villtypeantistoff. En
20 rekke biprodukter kan forventes. På grunn av utvekslingen av kun CL-CH1-domenene bør imidlertid hyppigheten av biprodukter reduseres sammenliknet med den fullstendige Fab-kryssover. Det skal bemerkes at da <ANGPT2> villtypeantistoffet viste høyere transiente ekspresjonsutbytter enn <IGF-1R> villtypen og <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoffer, ble forholdet <ANGPT2> villtypeantistoffplasmider og
25 <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoffplasmider skiftet i favør av ekspresjonen av <ANGPT2> villtypeantistoff.

For å danne blanding av hovedproduktene A) <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff, B) bispesifikt <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff, og C) <ANGPT2> villtypeantistoff, ble de fire plasmidene pUC-HC**-IGF-1R og pUC-LC**-IGF-1R og
35 plasmider SB04-pUC-HC-ANGPT2 og SB06-pUC-LC-ANGPT2 transient ko-transfektet i suspensjon HEK293-F-celler som beskrevet ovenfor. Den høstede supernatant

inneholder en blanding av hovedproduktene A) <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff, B) bispesifikt <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff, og C) <ANGPT2> villtypeantistoff, og betegnes som "bispesifikk CL-CH1-utvekslingsblanding". Bispesifikk CL-CH1-utvekslingsblanding inneholdende
 5 cellekultursupernatanter ble høstet ved sentrifugering, og deretter rensset som beskrevet ovenfor. Figur 14.

Integriteten av antistoffblandingen ble analysert ved SDS-PAGE i nærvær og fravær av et reduksjonsmiddel, og med påfølgende farging med Coomassie brilliant blått som
 10 beskrevet. SDS-PAGE viste at der var to forskjellige tunge og lette kjeder tilstede i preparatet som forventet (redusert gel). Den monomere tilstand til antistoffblandingen ble bekreftet ved analytisk størrelseseksklusjonskromatografi, og viste at de rensede antistoffarter var i en monomer tilstand. Karakteriserte prøver ble tilveiebrakt for
 15 påfølgende proteinanalyse og funksjonell karakterisering.

Eksempel 3B

Deteksjon av funksjonelt bispesifikt <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff i en cellulær FACS brodannelsesanalyse på I24 IGF-1R-uttrykkende celler

For å bekrefte tilstedeværelsen av funksjonelt bispesifikt <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff i den rensede bispesifikke CL-CH1-utvekslingsblanding av
 20 hovedproduktene A) <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff, B) bispesifikt <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff, og C) <ANGPT2> villtypeantistoff fra den transiente ko-ekspressjon beskrevet i eksempel 3A, ble en cellulær FACS IGF-1R-ANGPT brodannelsesanalyse på I24-celler (NIH3T3 celler som uttrykker rekombinant
 25 human IGF-1R, Roche) gjennomført. Analyseprinsippet er vist i figur 10. Et bispesifikt <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff som er tilstede i den rensede antistoffblanding er i stand til binding til IGF-1R i I24-celler og til ANGPT2 samtidig, og vil således forene med en bro de to målantigener med de to motsatte Fab-regioner.

Kort ble 5x10E5 I24-celler pr. FACS-rør inkubert med en total rensset antistoffblanding, og inkubert på is i 1 time (titrering 160 µg/ml blanding). De respektive rensede antistoff villtype <IGF-1R> og <ANGPT2> ble tilført I24-cellene som kontroller. Ubundet antistoff ble vasket bort med 4 ml iskald PBS (Gibco) + 2 % FCS (Gibco), celler ble sentrifugert (5 min. i 400 g), og bundet spesifikt antistoff ble detektert med
 35 50 µl 2 µg/mL humant ANGPT2 (R&D Systems) i 1 time på is. Deretter ble ubundet ANGPT2 vasket bort én eller to ganger med 4 ml iskald PBS (Gibco) + 2 % FCS (Gibco), celler ble sentrifugert (5 min. ved 400 g) og bundet ANGPT2 ble detektert

med 50 µl 5 µg/mL <ANGPT2>mIgG1-Biotinantistoff (BAM0981, R&D Systems) i 45 minutter på is; alternativt ble celler inkubert med 50 µl 5 µg/mL mIgG1-Biotin-Isotypekontroll (R&D Systems). Ubundet deteksjonsantistoff ble vasket bort med 4 ml iskald PBS (Gibco) + 2 % FCS (Gibco), celler ble sentrifugert (5 min. ved 400 g) og bundet deteksjonsantistoff ble detektert med 50 µl 1:400 streptavidin-PE-konjugat (Invitrogen/Zymed) i 45 min. på is beskyttet mot lys. Ubundet streptavidin-PE-konjugat ble vasket bort med 4 ml iskald PBS + 2 % FCS. Deretter ble celler sentrifugert (5 min. 400 g), resuspendert i 300-500 µl PBS og bundet streptavidin-PE-konjugat ble kvantifisert på en FACSCalibur (BD (FL2-kanal, 10000 celler pr. akvisisjon). Under forsøket ble de respektive isotypekontroller inkludert for å utelukke eventuelle uspesifikke bindingshendelser. I tillegg ble rensede monospesifikke, bivalente IgG1-antistoffer <IGF-1R> og <ANGPT2> inkludert som kontroller.

Resultatene i figur 15 viser at inkubasjonen med rensset antistoff kryssoverblanding (<ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff) fra ko-ekspresjonen av et kryssoverantistoff (<IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff) med et villtypeantistoff (<ANGPT2> villtypeantistoff) resulterte i et signifikant skift i fluorescens som indikerer tilstedeværelsen av et funksjonelt bispesifikt <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff som er i stand til binding til IGF-1R i I24-celler, og til ANGPT2 samtidig, og kan således forene ved bro de to målantigener med de to motsatte Fab-regioner. I motsetning til dette, resulterte de respektive <IGF-1R> og <Ang-2> kontrollantistoffer ikke i et skift i fluorescens i FACS-brodannelsesanalysen.

Sett under ett, viser disse data at ko-ekspresjonen av de respektive villtype- og kryssoverplasmidene, kan funksjonelle bispesifikke antistoffer dannes. Utbyttene av korrekt bispesifikt antistoff kan økes ved å tvinge den korrekte heterodimerisering av villtype og modifiserte kryssover tunge kjeder ved f.eks. å anvende "knobs-into-holes"-teknologien, så vel som disulfidstabilisering (se eksempel 4).

Eksempel 4

Ekspresjon av bivalent, bispesifikt <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff med modifiserte CH3-domener (knobs-into-holes)

For ytterligere å forbedre utbyttet av det bispesifikke <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoff anvendes "knobs-into-holes"-teknologien på ko-ekspresjon av <IGF-1R> CL-CH1-utveksling, og villtype <ANGPT2> antistoffene for å oppnå et homogent og funksjonelt bispesifikt antistoffpreparat. For dette formål, blir CH3-domenet i den tunge kjeden* HC* av <IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoffet

erstattet med CH3-domenet (Knobs) av SEKV. ID nr. 8, med en T366W-utveksling, og CH3-domenet i den tunge kjeden av villtype <ANGPT2> antistoffet erstattes med CH3-domenet (Hole) av SEKV. ID nr. 9 med en T366S-, L368A-, Y407V-utveksling, eller vice versa. I tillegg, kan et disulfid inkluderes for å øke stabilitet, så vel som
 5 ytterligere rester som danner ionebroer, og som øker heterodimeriseringsutbyttene (EP 1 870 459 A1).

Den transiente ko-ekspresjon og rensing av det resulterende bivalente, bispesifikke <ANGPT2-IGF-1R> CL-CH1-utvekslingsantistoffet med modifiserte CH3-domener
 10 ("knobs-into-holes") gjennomføres som beskrevet i eksempel 3.

Det skal bemerkes at en optimalisering av heterodimerisering kan oppnås ved f.eks. å anvende forskjellige "knobs-in-holes"-teknologier, slik som innføringen av en ytterligere disulfidbro inn i CH3-domenet, f.eks. Y349C inn i "knobs"-kjeden, og
 15 D356C inn i "hole"-kjeden, og/eller kombinert med anvendelsen av rester R409D, K370E (K409D) for "knobs"-rester, og D399K; E357K for "hole"-rester, beskrevet i EP 1 870 459 A1.

Analogt med eksempel 4, kan bispesifikke CH1-CL-utvekslingsantistoffer med
 20 modifiserte CH3-domener ("knobs-into-holes") rettet mot ANGPT2 og et annet målantigen (ved å anvende overnevnte beskrevne ANGPT2 tung og lett kjede og CH1-CL-utveksling tung og lett kjede** HC** og LC** av et antistoff rettet mot nevnte andre mål, hvor begge tunge kjeder er modifisert ved "knobs-in-holes"), eller rettet mot IGF-1R og et annet mål (ved å anvende tung og lett kjede av et antistoff rettet
 25 mot nevnte andre mål, og den ovenfor beskrevne IGF-1R CH1-CL-utveksling tung og lett kjede** HC** og LC**, hvorved begge tunge kjeder er modifisert ved "knobs-in-holes"), fremstilles.

- 1 -

Sekvensliste

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Bivalent, bispecific antibodies

<130> 24679 EP

<150> EP 07024865

<151> 2007-12-21

<160> 10

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> amino acid sequence of wild type <IGF-1R> antibody heavy chain

<400> 1

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
 115 120 125

- 2 -

Arg Gly Thr Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

340

345

350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

```
<210> 2
<211> 235
<212> PRT
<213> Artificial
```

<220>
<223> amino acid sequence of wild type <IGF-1R> antibody light chain

<400> 2

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

- 4 -

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
100 105 110

Lys Trp Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys
115 120 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 3
<211> 471
<212> PRT
<213> Artificial

- 5 -

<220>

<223> amino acid sequence of the heavy chain** (HC**) of <IGF-1R>
CL-CH1 exchange antibody, wherein the heavy chain domain CH1 is
replaced by the light chain domain CL

<400> 3

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
115 120 125

Arg Gly Thr Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser
130 135 140

Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
145 150 155 160

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
165 170 175

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
180 185 190

- 6 -

Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
 195 200 205

Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
 210 215 220

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 225 230 235 240

Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

- 7 -

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 4
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> amino acid sequence of the light chain** (LC**) of <IGF-1R>
 CL-CH1 exchange antibody, wherein the light chain domain CL is
 replaced by the heavy chain domain CH1

<400> 4

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
 100 105 110

- 8 -

Lys Trp Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys
 115 120 125

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 130 135 140

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 145 150 155 160

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 165 170 175

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 195 200 205

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 210 215 220

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230

<210> 5
 <211> 557
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> amino acid sequence of IGF-1R ectodomain His-Streptavidin binding
 peptide-tag (IGF-1R-His-SBP ECD)

<400> 5

Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
 1 5 10 15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
 20 25 30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
 35 40 45

- 9 -

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
 50 55 60

Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
 65 70 75 80

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
 85 90 95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
 100 105 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
 115 120 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
 130 135 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
 145 150 155 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
 165 170 175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
 180 185 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
 195 200 205

Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
 210 215 220

Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
 225 230 235 240

Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
 245 250 255

Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu

- 10 -

260	265	270
Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala		
275	280	285
Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met		
290	295	300
Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr		
305	310	315
Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys		
325	330	335
Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly		
340	345	350
Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn		
355	360	365
Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val		
370	375	380
Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser		
385	390	395
Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly		
405	410	415
Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp		
420	425	430
Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe		
435	440	445
Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu		
450	455	460
Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg		
465	470	475
		480

- 11 -

Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Ala Ala Ala Leu
 485 490 495

Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Gly Thr His His His His His His Ser
 500 505 510

Gly Asp Glu Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly
 515 520 525

Leu Ala Gly Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His His Pro
 530 535 540

Gln Gly Gln Arg Glu Pro Ser Gly Gly Cys Lys Leu Gly
 545 550 555

<210> 6

<211> 471

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> amino acid sequence of wild type Angiopoietin-2 <ANGPT2> antibody
 heavy chain

<400> 6

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95

- 12 -

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Leu Leu Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr
115 120 125

Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
305 310 315 320

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

- 14 -

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

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

Thr His Trp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 8
<211> 107

- 15 -

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> amino acid sequence of CH3 domain (Knobs) with a T366W exchange for use in the knobs-into-holes technology

<400> 8

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 1 5 10 15

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

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> amino acid sequence CH3 domain (Hole) with a T366S, L368A, Y407V exchange for use in the knobs-into-holes technology

<400> 9

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15

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

55

- 16 -

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 10

<211> 557

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> amino acid sequence of IGF-1R ectodomain His-Streptavidin binding
peptide-tag (IGF-1R-His-SBP ECD)

<400> 10

Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1 5 10 15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
20 25 30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
35 40 45

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
50 55 60

Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
65 70 75 80

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
85 90 95

- 17 -

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
 100 105 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
 115 120 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
 130 135 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
 145 150 155 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
 165 170 175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
 180 185 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
 195 200 205

Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
 210 215 220

Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
 225 230 235 240

Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
 245 250 255

Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
 260 265 270

Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
 275 280 285

Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
 290 295 300

Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
 305 310 315 320

- 18 -

Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
 325 330 335

Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
 340 345 350

Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
 355 360 365

Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
 370 375 380

Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
 385 390 395 400

Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
 405 410 415

Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
 420 425 430

Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe
 435 440 445

Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
 450 455 460

Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
 465 470 475 480

Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Ala Ala Ala Leu
 485 490 495

Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Gly Thr His His His His His His Ser
 500 505 510

Gly Asp Glu Lys Thr Thr Gly Trp Arg Gly Gly His Val Val Glu Gly
 515 520 525

Leu Ala Gly Glu Leu Glu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Glu His His Pro

58

- 19 -

530

535

540

Gln	Gly	Gln	Arg	Glu	Pro	Ser	Gly	Gly	Cys	Lys	Leu	Gly
545					550					555		

PATENTKRAV

1. Bivalent, bispesifikt antistoff som omfatter:
 - 5 a) den lette kjeden og tunge kjeden til et antistoff som spesifikt binder til et første antigen; og
 - b) den lette kjeden og den tunge kjeden til et antistoff som spesifikt binder til et andre antigen, hvor de konstante domener CL og CH1 er erstattet med hverandre.
- 10 2. Antistoff ifølge krav 1,
 k a r a k t e r i s e r t v e d at CH3-domenet av én tung kjede og CH3-domenet av den andre tunge kjeden hver møter en grenseflate som omfatter en original grenseflate mellom antistoff CH3-domenene; hvor nevnte grenseflate er endret for å fremme dannelsen av det bivalente, bispesifikke antistoff, hvor endringen er
 - 15 kjennetegnet ved at:
 - a) CH3-domenet av én tung kjede er endret, slik at innen den originale grenseflaten til CH3-domenet av én tung kjede som møter den originale grenseflaten til CH3-domenet av den andre tunge kjeden innen det bivalente, bispesifikke antistoff, er en aminosyre erstattet med en aminosyrerest med et større sidekjedevolum, for
 - 20 derved å danne et fremspring innen grenseflaten til CH3-domenet av én tung kjede som kan anbringes i et hulrom innen grenseflaten til CH3-domenet av den andre tunge kjeden, og
 - b) CH3-domenet av den andre tunge kjeden er endret, slik at innen den originale grenseflaten til det andre CH3-domenet som møter den originale
 - 25 grenseflaten til det første CH3-domenet innen det bivalente, bispesifikke antistoff, er en aminosyre erstattet med en aminosyrerest med et mindre sidekjedevolum, for derved å danne et hulrom innen grenseflaten til det andre CH3-domenet, hvori et fremspring innen grenseflaten til det første CH3-domenet kan anbringes.
 - 30 3. Antistoff ifølge krav 2,
 k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte aminosyrerest med et større sidekjedevolum er valgt fra gruppen som består av arginin (R), fenylalanin (F), tyrosin (Y), tryptofan (W).
 - 35 4. Antistoff ifølge hvilket som helst av kravene 2 eller 3,
 k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte aminosyrerest med et mindre sidekjedevolum er valgt fra gruppen som består av alanin (A), serin (S), treonin (T), valin (V).

5. Antistoff ifølge hvilke som helst av kravene 2-4,
karakterisert ved at begge CH3-domener er ytterligere endret ved
introduksjonen av cystein (C) som aminosyre i de tilsvarende posisjoner i hvert CH3-
domene.
- 5 6. Antistoff ifølge krav 1,
karakterisert ved at ett av konstant tung kjede domener CH3 i begge
tunge kjeder er erstattet med et konstant tung kjede domene CH1; og det andre tung
kjede domenet CH3 er erstattet med et konstant lett kjede domene CL.
- 10 7. Fremgangsmåte for fremstilling av et bivalent, bispesifikt antistoff ifølge krav 1,
som omfatter trinnene med
- a) transformering av en vertscelle med
- vektorer som omfatter nukleinsyremolekyler som koder for den lette kjeden
- 15 og den tunge kjeden til et antistoff som spesifikt binder til et første antigen,
- vektorer som omfatter nukleinsyremolekyler som koder for den lette kjeden
- og den tunge kjeden til et antistoff som spesifikt binder til et andre antigen, hvor de
konstante domener CL og CH1 er erstattet med hverandre;
- b) dyrking av vertscellen under betingelser som tillater syntese av nevnte
- 20 antistoffmolekyl; og
- c) utvinning av nevnte antistoffmolekyl fra nevnte kultur.
8. Vertscelle som omfatter:
- vektorer som omfatter nukleinsyremolekyler som koder for den lette kjeden
- 25 og den tunge kjeden til et antistoff som spesifikt binder til et første antigen,
- vektorer som omfatter nukleinsyremolekyler som koder for den lette kjeden
- og den tunge kjeden til et antistoff som spesifikt binder til et andre antigen, hvor de
konstante domener CL og CH1 er erstattet med hverandre.
- 30 9. Preparat av et bivalent, bispesifikt antistoff ifølge kravene 1 til 6.
10. Farmasøytisk preparat som omfatter et bivalent, bispesifikt antistoff ifølge krav
1 til 6, og minst én farmasøytisk akseptert eksipiens.

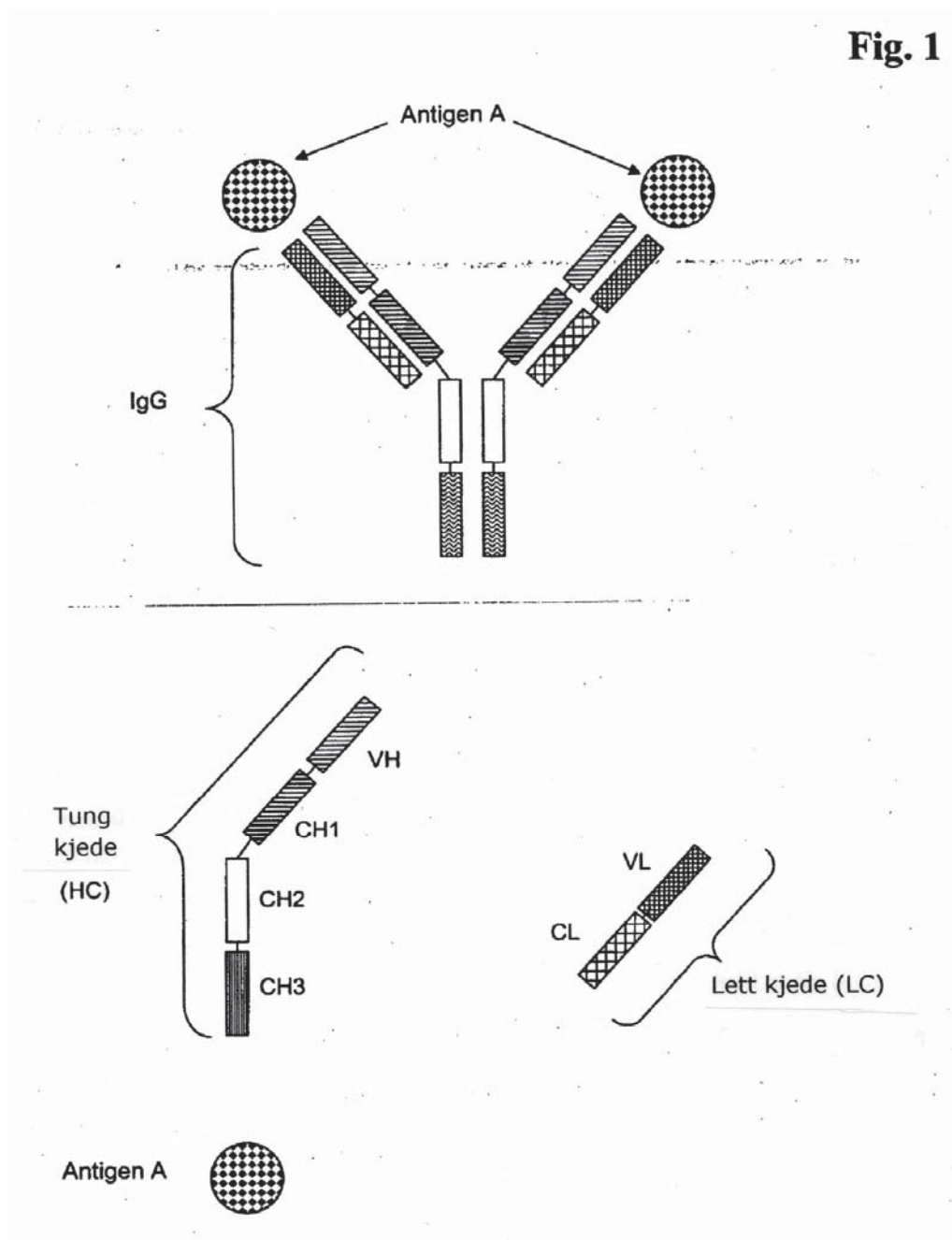
Fig. 1

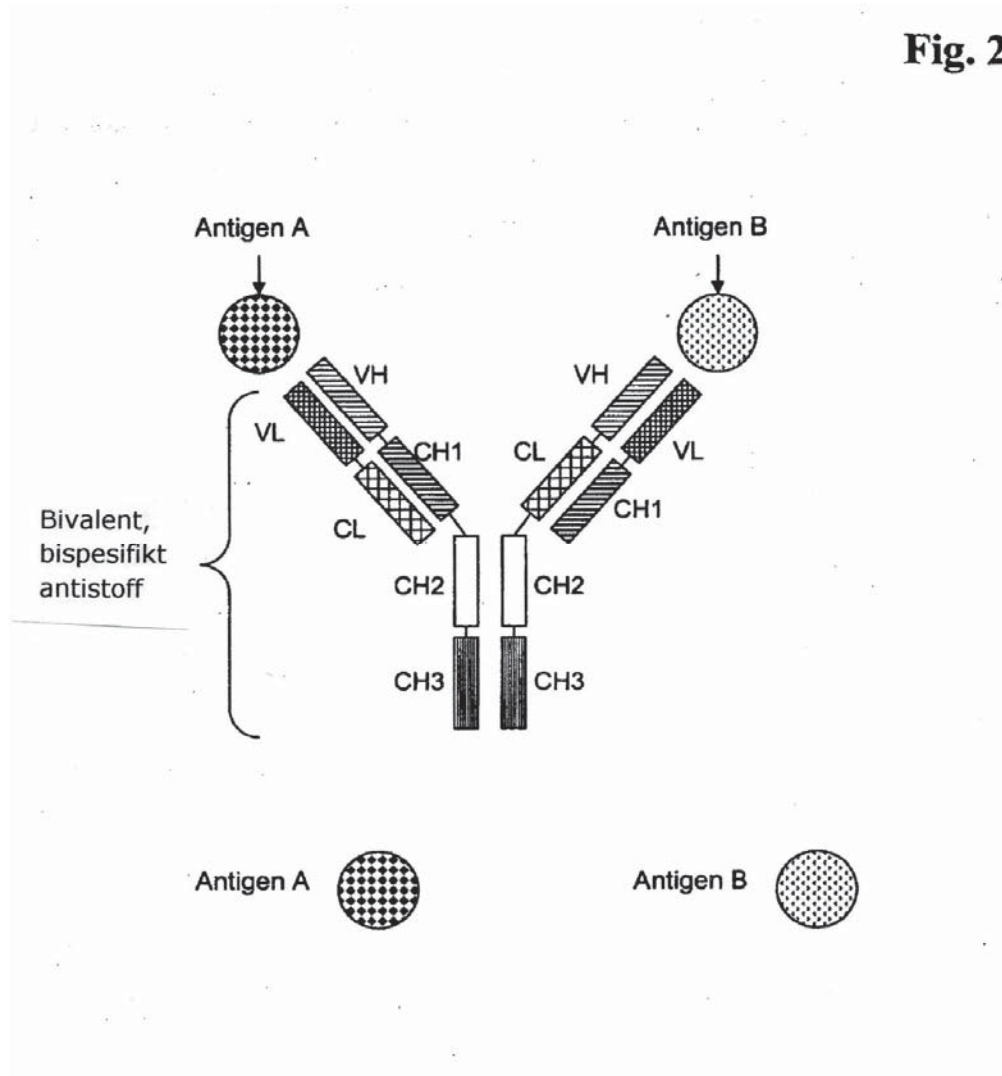
Fig. 2

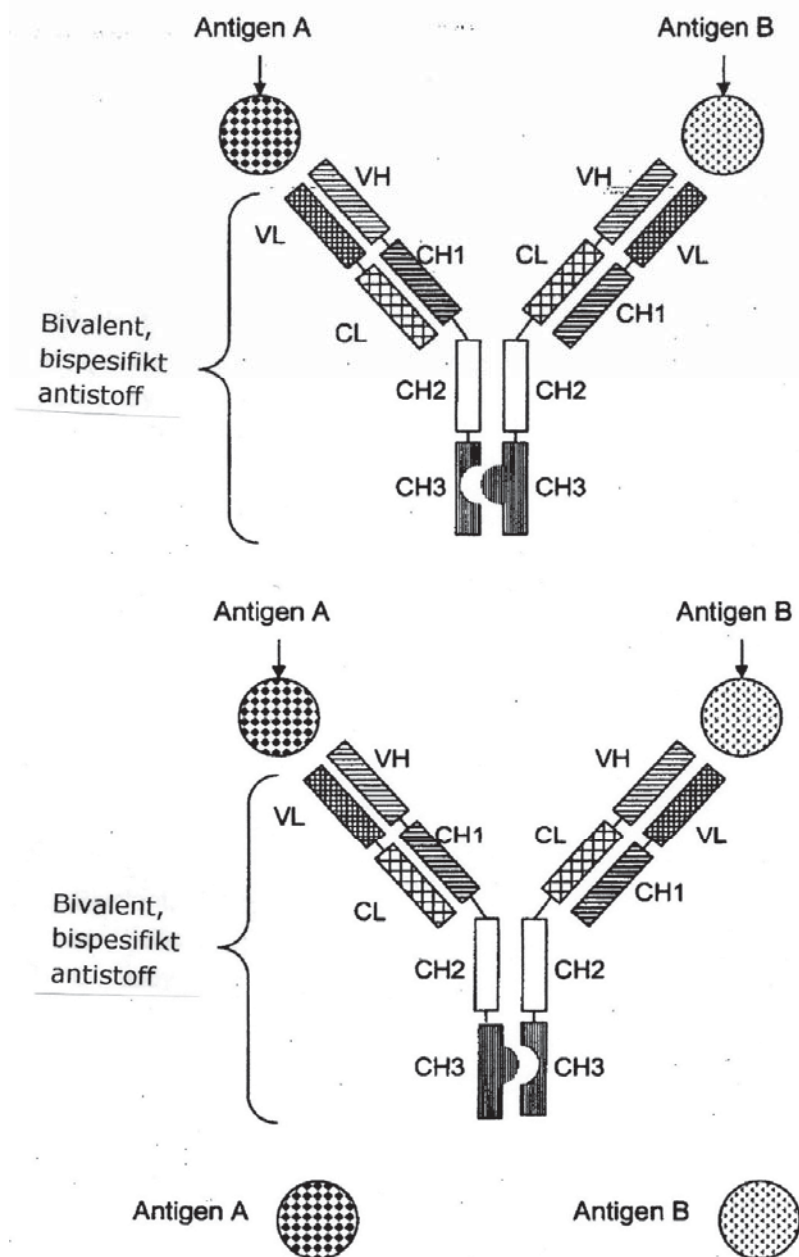
Fig. 3

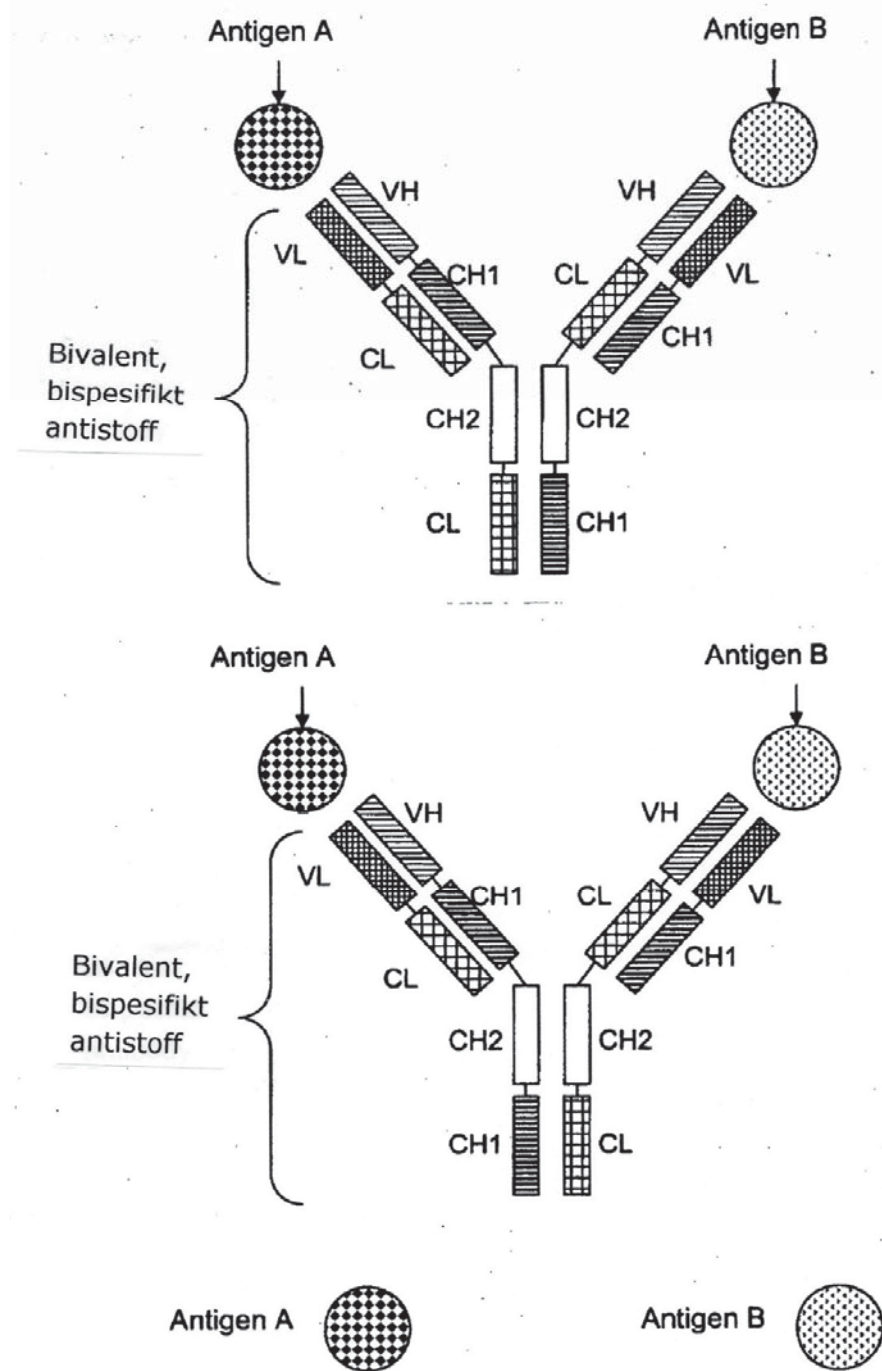
Fig. 4

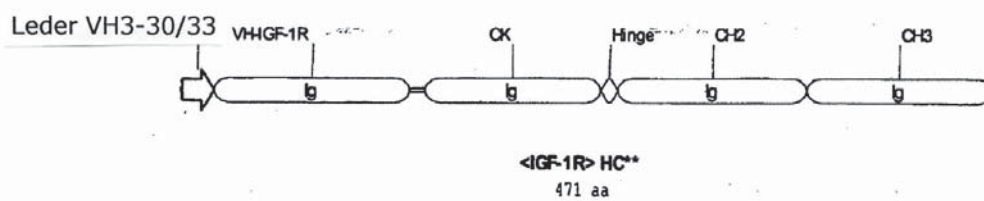
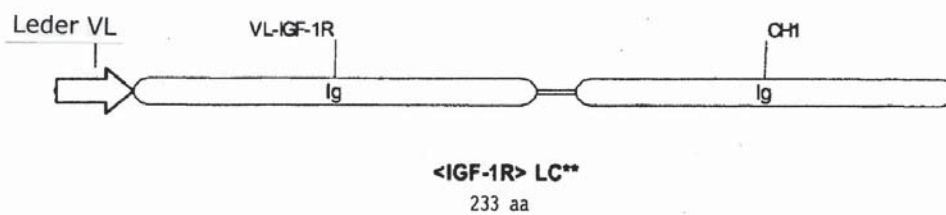
Fig. 5**Fig. 6**

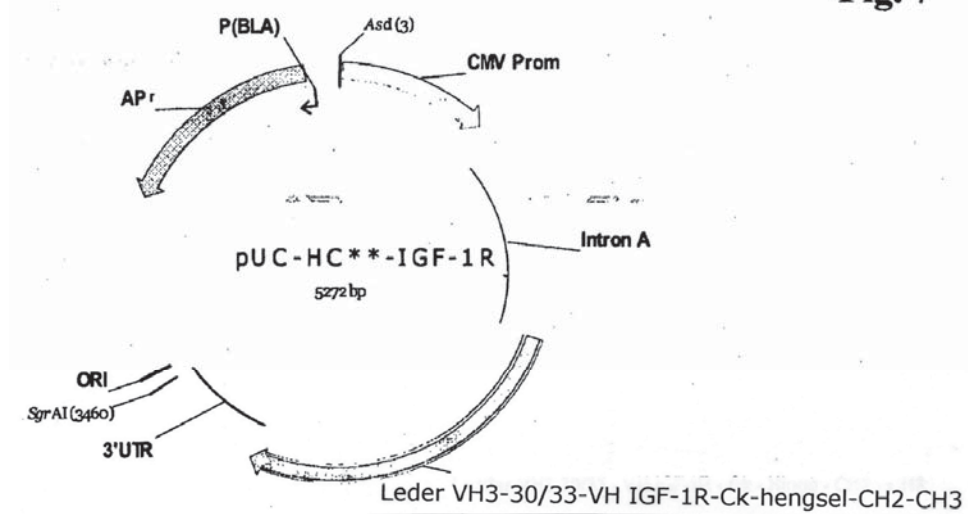
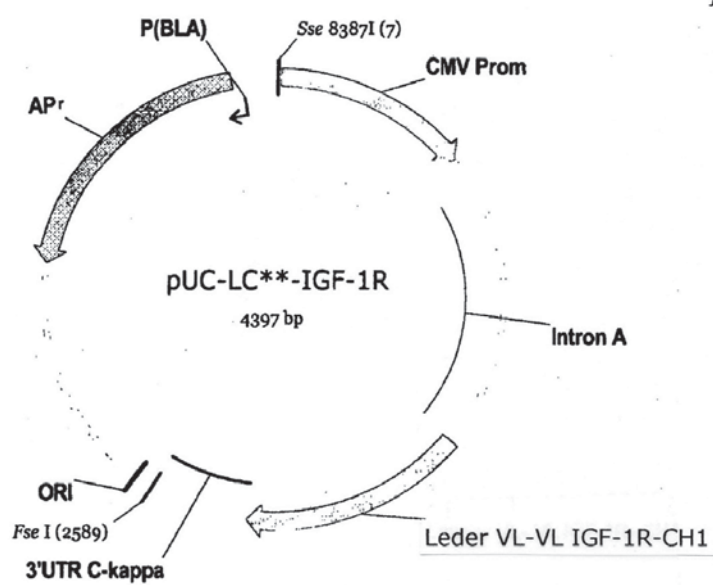
Fig. 7**Fig. 8**

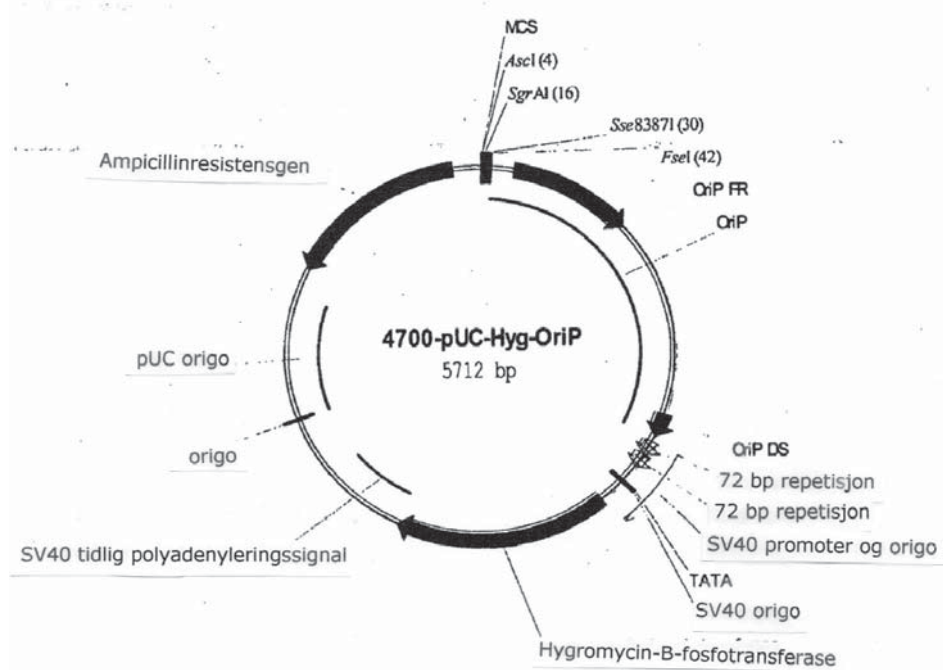
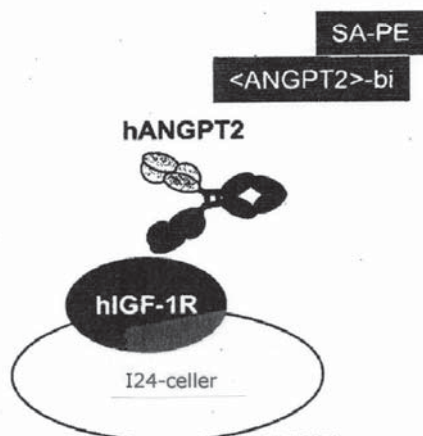
Fig. 9**Fig. 10**

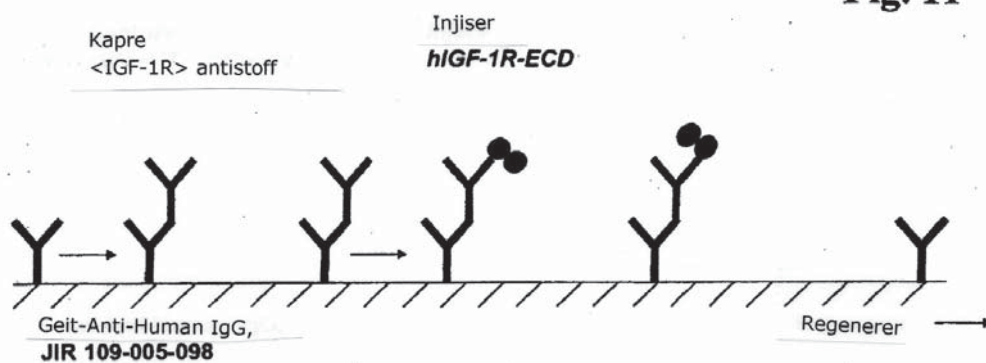
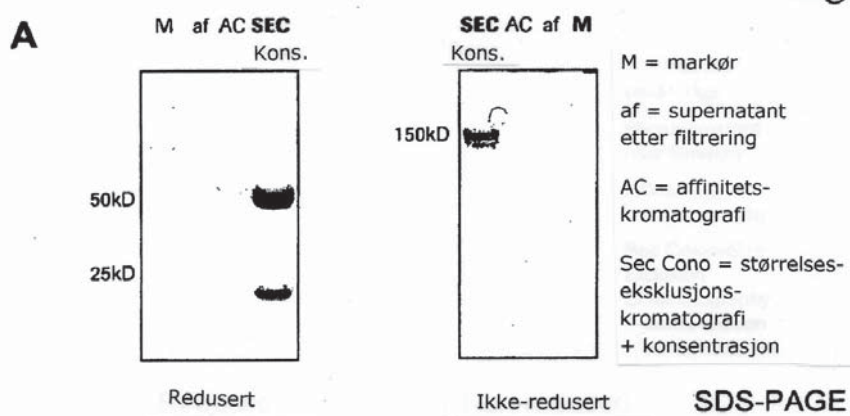
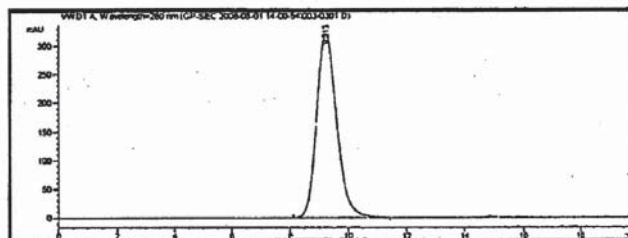
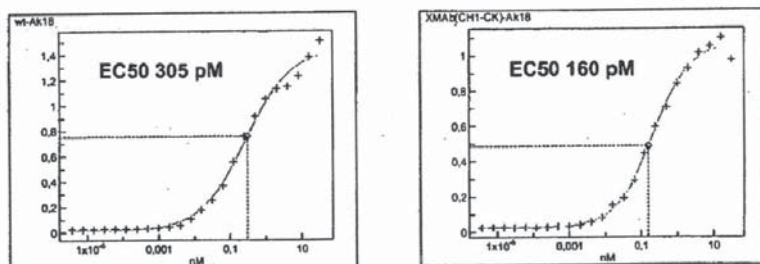
Fig. 11**Fig. 12****B**

Fig. 13

Binding av villtype <IGF-1R>
antistoff til IGF-1R-ECD

Binding av <IGF-1R> CL-CH1
utvekslingsantistoff til IGF-1R-ECD

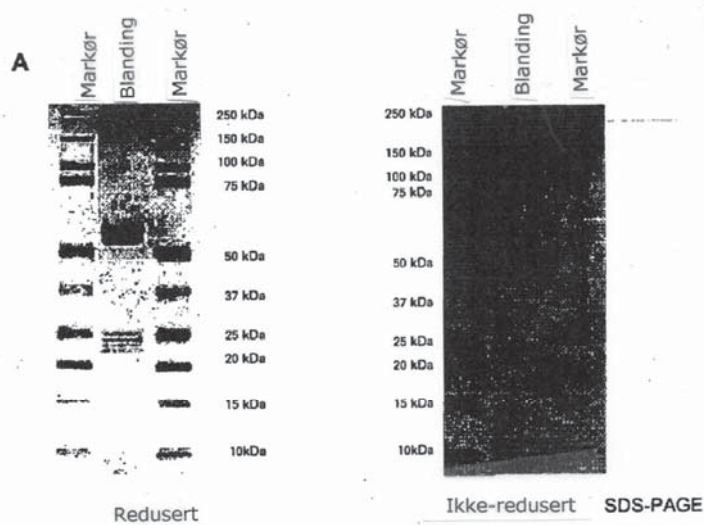
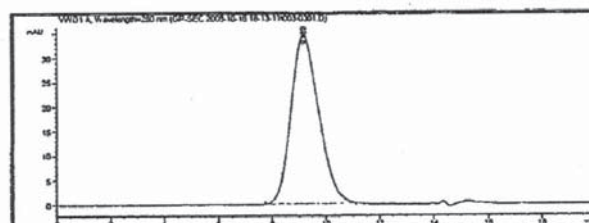
Fig. 14**B**

Fig. 15