



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2443154 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.05.12
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2013.12.25
(86)	Europeisk søknadsnr	10725615.8
(86)	Europeisk innleveringsdag	2010.06.14
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2012.04.25
(30)	Prioritet	2009.06.16, EP, 09007857
(84)	Utpekte stater	AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK SM TR
(73)	Innehaver	F.Hoffmann-La Roche AG, Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, CH-Sveits
(72)	Oppfinner	IMHOF-JUNG, Sabine, Egenhofenstrasse 26 b, 82152 Planegg, DE-Tyskland KLEIN, Christian, Chruezacherweg 41, 8906 Bonstetten, CH-Sveits REGULA, Jörg Thomas, Lierstrasse 15, 80639 München, DE-Tyskland SCHAEFER, Wolfgang, Tannhäusering 190, 68199 Mannheim, DE-Tyskland SCHANZER, Jürgen Michael, Metzstrasse 26, 81667 München, DE-Tyskland
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Bispesifikke antigen-bindende proteiner
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A1-01/77342 WO-A1-2006/093794 WO-A2-2006/044908 WO-A2-2007/044887 WO-A2-2009/032782 MILLER KATHY ET AL: "Design, construction, and in vitro analyses of multivalent antibodies" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 170, no. 9, 1 May 2003 (2003-05-01), pages 4854-4861, XP002508787 ISSN: 0022-1767 MORRISON S L ET AL: "Variable Region Domain Exchange Influences the Functional Properties of IgG" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 160, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 2802-2808, XP003001892 ISSN: 0022-1767 cited in the application CHAN L A ET AL: "Variable region domain exchange in human IgGs promotes antibody complex formation with accompanying structural changes and altered effector functions" MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 41, no. 5, 1 July 2004 (2004-07-01), pages 527-538, XP002519713 ISSN: 0161-5890 SIMON T ET AL: "Antibody domain mutants demonstrate autonomy of the antigen binding site" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 9, no. 4, 1 April 1990 (1990-04-01), pages 1051-1056, XP002492746 ISSN: 0261-4189 MORRISON S L: "Two heads are better than one" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 25, no. 11, 1 November 2007 (2007-11-01), pages 1233-1234, XP002470803 ISSN: 1087-0156 cited in the application ROSSI EDMUND A ET AL: "Multivalent anti-CD20/anti-CD22 bispecific antibody fusion proteins

made by the DNL method show potent lymphoma cytotoxicity." BLOOD, vol. 108, no. 11, Part 1, November 2006 (2006-11), page 707A, XP008113658 & 48TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY; ORLANDO, FL, USA; DECEMBER 09 -12, 2006
ISSN: 0006-4971

Foreliggende oppfinnelse vedrører bispesifikke antigenbindende proteiner, fremgangsmåter for fremstilling derav, farmasøytiske sammensetninger som inneholder nevnte antistoffer, og anvendelser derav.

5 **Bakgrunn for oppfinnelsen**

Omkonstruerte proteiner, så som bi- eller multispesifikke antistoffer med evne til å binde to eller flere antigener er kjent innenfor fagområdet. Slike multispesifikke bindingsproteiner kan bli dannet ved anvendelse av cellefusjon, kjemisk konjugasjon eller rekombinante DNA-teknikker.

10

Mange forskjellige rekombinante multispesifikke antistoffformater er blitt utviklet i de senere årene, f.eks. tetravalente 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 2001/077342; og Morrison, S.L., Nature Biotech. 25 (2007) 1233-1234.

15

Videre er flere andre nye formater hvor antistoffkjernestrukturen (IgA, IgD, IgE, IgG eller IgM) ikke lenger er beholdt, så som dia-, tria- eller tetralegemer, minilegemer, flere enkeltkjedeformater (scFv, Bis-scFv), som har evne til å binde to eller flere antigener, blitt utviklet (Holliger, P., et al., Nature Biotech 23 (2005) 1126-1136; Fischer, N., og Léger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14; Shen, J., et al., J. Immunol. Methods 318 (2007) 65-74; Wu, C., et al., Nature Bioech 25 (2007) 1290-1297).

20

Alle slike formater anvender linkere enten for å fusjonere antistoffkjerne (IgA, IgD, IgE, IgG eller IgM) til et ytterligere bindingsprotein (f.eks. scFv), eller å fusjonere f.eks. to Fab-fragmenter eller scFv (Fischer, N., og Léger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14). Selv om det er innlysende at linkere har fordeler for omkonstruering av bispesifikke antistoffer, kan de også forårsake problemer i terapeutiske oppsett. Disse fremmede peptidene kan spesielt utløse en immunrespons overfor selve linkerene, eller grensen mellom proteinet og linkerene. Videre gjør den fleksible naturen til disse peptidene dem til mer mottakelige for proteolytisk spalting, som potensielt fører til dårlig antistoffstabilitet, aggregasjon og forøket immunogenisitet. I tillegg kan man ville beholde effektorfunksjoner, så som f.eks. komplementavhengig cytotoxissitet (CDC), eller antistoffavhengig cellulær cytotoxissitet (ADCC), som blir mediert gjennom Fc-delen ved opprettholdelse av en høy grad av likhet til naturlig forekommende antistoffer.

25

30

35

Slik at ideelt bør et mål være å utvikle bispesifikke antistoffer som er meget like i generell struktur som naturlig forekommende antistoffer (som IgA, IgD, IgE, IgG eller IgM) med minimalt avvik fra de humane sekvensene.

5 I én tilnærming er spesifikke antistoffer som er meget like naturlige antistoffer blitt produsert ved anvendelse av kvadromteknologi (se Milstein, C., og Cuello, A.C., Nature 305 (1983) 537-540), basert på den somatiske fusjonen av to forskjellige hybridomcellelinjer som uttrykker murine monoklonale antistoffer med den ønskede spesifisiteten til det bispesifikke antistoffet. På grunn av den tilfeldige paringen av to
10 forskjellige antistoff tunge og lette kjeder innenfor den resulterende hybrid-hybridom (eller kvadrom) cellelinjen, blir opptil ti forskjellige antistoffarter dannet, og hvor kun én er det ønskelige, funksjonelle bispesifikke antistoffet. Grunnet tilstedeværelse av feilparede biprodukter, og signifikant reduserte produksjonsutbytter, er sofistikerte rensingsprosedyrer nødvendig (se f.eks. Morrison, S.L., Nature Biotech. 25 (2007)
15 1233-1234). Generelt forblir det samme problemet med feilparede biprodukter dersom de rekombinante ekspresjonsteknikkene blir anvendt.

En metode for å omgå problemet med feilparede biprodukter, som er kjent som "knobs-into-holes", har som mål å tvinge paringen av to forskjellige antistoff
20 tungkjeder ved introdusering av mutasjoner inn i CH3-domenene for å modifisere kontaktinterfasen. I én kjede ble bulkede aminosyrer erstattet med aminosyrer med korte sidekjeder, for å danne et "hull". I motsetning til dette, ble aminosyrer med større sidekjeder introdusert inn i den andre CH3-domenen, for å danne en "knob". Ved kouttrykking av disse to tunge kjedene (og to identiske lette kjeder, som må
25 være hensiktsmessige for begge de tunge kjedene), ble høye utbytter av heterodimerdannelse ("knob-hole") versus homodimerdannelse ("hole-hole" eller "knob-knob") observert (Ridgway, J.B., Protein Eng. 9 (1996) 617-621; og WO 96/027011). Prosentandelen av heterodimer kan bli ytterligere øket ved remodellering av interaksjonsoverflatene til de to CH3-domenene ved anvendelse av en
30 fagfremvisningstilnærming, og introduksjon av en disulfidbro for å stabilisere heterodimerene (Merchant A.M., et al., nature Biotech 16 (1998) 677-681; Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35). Nye tilnærminger for knob-in-holes-teknologi er beskrevet i f.eks. EP 1870459A1. Til tross for at dette formatet ser ut til å være meget attraktivt, er ingen data som beskriver progresjonen mot klinikken for tiden
35 tilgjengelig. En viktig begrensning ved denne strategien er at de lette kjedene til de to moderantistoffene må være identiske for å unngå feilparing og dannelse av inaktive molekyler. Følgelig er denne teknikken ikke hensiktsmessig for lett å utvikle

rekombinante, bispesifikke antistoffer overfor to antigen, med utgangspunkt fra to antistoffer mot det første og det andre antigenet, siden enten de tunge kjedene til disse antistoffene, og/eller de identiske lette kjedene, må være optimalisert.

5 En annen tilnærming for å omgå problemet med feilparede biprodukter ved fremstilling av bispesifikke antistoffer er å skifte fra heterodimerer til homodimerer ved anvendelse av et fullengdeantistoff som spesifikt bindes til et første antigen, og som har fusjonert til dets tungkjede N-termini to fusjonerte Fab-fragmenter som spesifikt bindes til et andre antigen som beskrevet f.eks. i WO 2001/077342. En viktig
10 ulempe med denne strategien er dannelsen av uønskede inaktive biprodukter ved feilparing av de lette kjedene til fullengdeantistoffet med CH1-VH-domenene til Fab-fragmentene, og ved feilparing av Fab-fragmentlettkjeder med CH1-VH-domenene til fullengdeantistoffet.

15 WO 2006/09374 er relatert til heterodimere proteinbindings sammensetninger. WO 99/37791 beskriver flerbruksantistoffderivater. Morrison, S.L., et al. the J. Immunolog, 160(1998) 2802-2808 refererer til innvirkningen av variabel region domeneutveksling på de funksjonelle egenskapene til IgG.

20 **Oppsummering av oppfinnelsen**

Oppfinnelsen omfatter bispesifikt antigenbindende protein, omfattende:

- a) to lette kjeder og to tunge kjeder av et antistoff, som spesifikt bindes til et første antigen, og som omfatter to Fab-fragmenter;
- b) to ytterligere Fab-fragmenter av et antistoff, som spesifikt bindes til et andre
25 antigen, hvor nevnte ytterligere Fab-fragmenter er begge kondensert via en peptidkobler, enten ved den C- eller N-terminale enden av de tunge kjedene eller lette kjedene i a); og

hvor i Fab-fragmentene blir følgende modifikasjoner utført:

- i) begge Fab-fragmentene ifølge a), eller i begge Fab-fragmentene i b), blir de
30 variable domenene VL og VH erstattet med hverandre, og/eller de konstante domenene CL og CH1 blir erstattet med hverandre,
- ii) i begge Fab-fragmentene ifølge a) blir de variable domenene VL og VH erstattet med hverandre, og de konstante domene CL og CH1 blir erstattet med hverandre, og i begge Fab-fragmentene ifølge b) blir de variable
35 domenene VL og VH erstattet med hverandre, eller de konstante domenene CL og CH1 blir erstattet med hverandre,

- iii) i begge Fab-fragmentene ifølge a) blir de variable domenene VL og VH erstattet med hverandre, eller de konstante domenene CL og CH1 blir erstattet med hverandre, og i begge Fab-fragmentene ifølge b) blir de variable domenene VL og VH erstattet med hverandre, og de konstante domenene CL og CH1 blir erstattet med hverandre,
- iv) i begge Fab-fragmentene ifølge a) blir de variable domenene VL og VH erstattet med hverandre, og i begge Fab-fragmentene ifølge b) blir de konstante domenene CL og CH1 erstattet med hverandre, eller
- v) i begge Fab-fragmentene ifølge a) blir de konstante domenene CL og CH1 erstattet med hverandre, og i begge Fab-fragmentene ifølge b) blir de variable domenene VL og VH erstattet med hverandre.

En ytterligere utførelsesform ifølge oppfinnelsen er en fremgangsmåte for fremstilling av et antigenbindende protein ifølge oppfinnelsen, omfattende følgende trinn:

- a) transformering av en vertscelle med
- vektorer omfattende nukleinsyremolekyler som koder for et bispesifikt antigenbindende protein ifølge oppfinnelsen,
- b) dyrking av vertscellen under betingelser som muliggjør syntese av nevnte antistoffmolekyl; og
- c) isolering av nevnte antistoffmolekyl for nevnte kultur.

En ytterligere utførelsesform ifølge oppfinnelsen er en vertscelle omfattende:

- vektorer omfattende nukleinsyremolekyler som koder for et antigenbindende protein ifølge oppfinnelsen.

En ytterligere utførelsesform ifølge oppfinnelsen er en farmasøytisk sammensetning omfattende et antigenbindende protein ifølge oppfinnelsen, og minst én farmasøytisk akseptabel eksipient.

En ytterligere utførelsesform ifølge oppfinnelsen er en fremgangsmåte for behandling av en pasient som trenger terapi, karakterisert ved administrering til pasienten en terapeutisk effektiv mengde av et antigenbindende protein ifølge oppfinnelsen.

Ifølge oppfinnelsen kan forholdet mellom et ønsket bispesifikt antigenbindende protein sammenliknet med uønskede biprodukter bli forbedret ved erstatning av visse domener a) i Fab-fragmentet til fullengdeantistoffet som spesifikt bindes til et første

antigen, og/eller b) i to ytterligere kondenserte Fab-fragmenter. På denne måten kan den uønskede feilparingen av lettkjedene med gale CH1-VH-domener bli redusert.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

- 5 Oppfinnelsen omfatter et bispesifikt antigenbindende protein, omfattende:
- a) to lettkjeder og to tungkjeder av et antistoff, som spesifikt bindes til et første antigen, og som omfatter to Fab-fragmenter;
 - b) to ytterligere Fab-fragmenter av et antistoff, som spesifikt bindes til et andre antigen, hvor nevnte ytterligere Fab-fragmenter er kondensert både via en
 10 peptidkobler, enten til C- eller N-termini av de tunge kjedene ifølge a); og hvori Fab-fragmentene blir følgende modifikasjoner utført:
 - i) i begge Fab-fragmentene ifølge a), eller i begge Fab-fragmentene ifølge b), blir de variable domenene VL og VH erstattet med hverandre, og/eller de konstante domenene CL og CH1 blir erstattet med
 15 hverandre,
 - ii) i begge Fab-fragmentene ifølge a) blir de variable domenene VL og VH erstattet med hverandre, og de konstante domenene CL og CH1 blir erstattet med hverandre, og i begge Fab-fragmentene ifølge b) blir de variable domenene VL og VH erstattet med hverandre, eller de
 20 konstante domenene CL og CH1 blir erstattet med hverandre,
 - iii) i begge Fab-fragmentene ifølge a) blir de variable domenene VL og VH erstattet med hverandre, eller de konstante domenene CL og CH1 ble erstattet med hverandre, og i begge Fab-fragmentene i b) blir de variable domenene VL og VH erstattet med hverandre, og de konstante
 25 domenene CL og CH1 blir erstattet med hverandre,
 - iv) i begge Fab-fragmentene ifølge a) blir de variable domenene VL og VH erstattet med hverandre, og i begge Fab-fragmentene ifølge b) blir de konstante domenene CL og CH1 erstattet med hverandre, eller
 - v) i begge Fab-fragmentene ifølge a) blir de konstante domenene CL og
 30 CH1 erstattet med hverandre, og i begge Fab-fragmentene ifølge b) blir de variable domenene VL og VH erstattet med hverandre.

I én utførelsesform ifølge oppfinnelsen er det bispesifikke antigenbindende proteinet ifølge oppfinnelsen karakterisert ved at nevnte ytterligere Fab-fragmenter er fusjonert
 35 både via en peptidkobler, enten til den C-terminale enden av de tunge kjedene ifølge a), eller til den N-terminale enden av tungkjedene ifølge a).

I én utførelsesform ifølge oppfinnelsen er det bispesifikke antigenbindende proteinet ifølge oppfinnelsen karakterisert ved at nevnte ytterligere Fab-fragmenter er fusjonert via en peptidkobler, enten til den C-terminale enden av de tunge kjedene ifølge a).

- 5 I én utførelsesform ifølge oppfinnelsen er det bispesifikke antigenbindende proteinet ifølge oppfinnelsen karakterisert ved at nevnte ytterligere Fab-fragmenter er fusjonert både via en peptidkobler til den N-terminale enden av de tunge kjedene ifølge a).

10 I én utførelsesform ifølge oppfinnelsen er det bispesifikke antigenbindende proteinet ifølge oppfinnelsen karakterisert ved at i Fab-fragmentene blir følgende modifikasjoner utført:

- i) i begge Fab-fragmentene ifølge a), eller i begge Fab-fragmentene ifølge b), blir de variable domenene VL og VH erstattet med hverandre, og/eller de konstante domenene CL og CH1 blir erstattet med hverandre.

15

I én utførelsesform ifølge oppfinnelsen er det bispesifikke antigenbindende protein ifølge oppfinnelsen kjennetegnet ved at i Fab-fragmentene blir følgende modifikasjoner utført:

- 20 i) i begge Fab-fragmentene ifølge a) blir de variable domenene VL og VH erstattet med hverandre, og/eller de konstante domenene CL og CH1 blir erstattet med hverandre.

25 I én utførelsesform ifølge oppfinnelsen er det bispesifikke antigenbindende proteinet ifølge oppfinnelsen karakterisert ved at i Fab-fragmentene blir følgende modifikasjoner utført:

- i) i begge Fab-fragmentene ifølge a) blir de konstante domenene CL og CH1 erstattet med hverandre.

30 I én utførelsesform ifølge oppfinnelsen er det bispesifikke antigenbindende proteinet ifølge oppfinnelsen karakterisert ved at i Fab-fragmentene blir følgende modifikasjoner utført:

- i) i begge Fab-fragmentene ifølge b) blir de variable domenene VL og VH erstattet med hverandre, og/eller de konstante domenene CL og CH1 blir erstattet med hverandre.

35

I én utførelsesform ifølge oppfinnelsen er det bispesifikke antigenbindende proteinet ifølge oppfinnelsen kjennetegnet ved at i Fab-fragmentene blir følgende modifikasjoner utført:

- 5 i) i begge Fab-fragmentene ifølge b) blir de konstante domenene CL og CH1 erstattet med hverandre.

Ifølge oppfinnelsen kan forholdet mellom et ønsket bispesifikt antigenbindende protein sammenliknet med uønskede biprodukter (grunnet feilparing av de lette kjedene med uriktige CH1-VH-domener) bli redusert ved erstatning av visse domener a) i Fab-fragmentet av fullengdeantistoff som spesifikt bindes til det a) første antigen og/eller b) u de to ytterligere fusjonerte Fab-fragmentene. Feilparing betyr i denne sammenhengen assosiasjon av i) den lette kjeden av fullengdeantistoffet under a) med CH1-VH-domenen til Fab-fragmentene under b); eller ii) den lette kjeden av Fab-fragmentene under b), med CH1-VH-domenen av fullengdeantistoffet under a) (se fig. 3) som fører til uønskede inaktive eller ikke fullstendig funksjonelle biprodukter.

Betegnelsen "antistoff" som anvendt heri angir et fullengdeantistoff bestående av to antistoff tunge kjeder, og to antistoff lette kjeder (se fig. 1). En tung kjede av fullengdeantistoff er et polypeptid bestående av i N-terminal til C-terminal retning av en antistoff tung kjede variabel domene (VH), et antistoff konstant tung kjede domene 1 (CH1), en antistoff hengselregion (HR), en antistoff tung kjede konstant domene 2 (CH2), og en antistoff tung kjede konstantdomene 3 (CH3), forkortet som VH-CH1-HR-CH2-CH3; og eventuelt en antistoff tung kjede konstantdomene 4 (CH4) når det gjelder et antistoff av subklasse IgE. Det er foretrukket at tung kjede av fullengdeantistoff er et polypeptid som består av i N-terminal til C-terminal retning av VH, CH1, HR, CH2 og CH3. Den lette kjeden av fullengdeantistoffet er et polypeptid bestående i N-terminal til C-terminal retning av en antistoff lettkjedevariabel domene (VL), og en antistoff lettkjedekonstant domene (CL), forkortet som VL-CL.

30 Antistofflettkjedekonstante domenen (CL) kan være κ (kappa) eller λ (lambda). Antistoffkjedene er koblet sammen via interpolypeptid disulfidbindinger mellom CL-domenen og CH1-domenen (dvs. mellom lett og tung kjede), og mellom hengselsregionene av fullengdeantistoff tungkjeder. Eksempler på typiske fullengdeantistoffer er naturlige antistoffer som IgG (f.eks. IgG1 og IgG2), IgM, IgA, IgD og IgE). Antistoffene ifølge oppfinnelsen kan være fra en enkelt art, f.eks.

35 menneske, eller de kan være chimeriserte eller humaniserte antistoffer. Fullengdeantistoffene ifølge oppfinnelsen omfatter to antigenbindende seter hvert

dannet av et par av VH og VL, som begge spesifikt bindes til det samme (første) antigenet. Den C-terminale enden av tung- eller lettkjeden av nevnte fullengdeantistoff angir den siste aminosyren ved den C-terminale enden av nevnte tunge eller lette kjede. Nevnte antistoff omfatter to identiske Fab-fragmenter bestående av VH- og CH1-domenen av den tunge kjeden, og VL- og CL-domenen av den lette kjeden (se fig. 1 og 2).

Et "ytterligere Fab-fragment" (se fig. 2) av et antistoff som spesifikt bindes til det andre antigenet refererer til et ytterligere Fab-fragment bestående av VH- og CH1-domenen av den tunge kjeden, og VL- og CL-domenen av nevnte andre antistoff. De ytterligere Fab-fragmentene blir fusjonert i deres umodifiserte form (se fig. 3) via tungkjededelen (enten CH1- eller VH-domenen) til den C- eller N-terminale enden av tungkjedene eller lettkjedene av antistoffet som spesifikt bindes til et første antigen.

Betegnelsen "peptidkobler" som anvendt i oppfinnelsen, angir et peptid med aminosyresekvenser, som fortrinnsvis har syntetisk opprinnelse. Disse peptidkoblerne ifølge oppfinnelsen blir anvendt for å fusjonere antigenbindende peptider til C- eller N-terminus av fullengde- og/eller modifisert fullengdeantistoffkjeder for å danne et bispesifikt antigenbindende protein ifølge oppfinnelsen. Det er foretrukket at nevnte peptidkobler under c) er peptider med en aminosyresekvens med en lengde på minst 5 aminosyrer, fortrinnsvis med en lengde på 5 til 100, mer foretrukket på 10 til 50 aminosyrer. I én utførelsesform av nevnte peptidkobler, er $(GxS)_n$ eller $(GxS)_nG_m$ med G = glysin, S = serin, og $(x = 3, n = 3, 4, 5 \text{ eller } 6, \text{ og } m = 0, 1, 2 \text{ eller } 3)$ eller $(x = 4, n = 2, 3, 4 \text{ eller } 5 \text{ og } m = +, 1, 2 \text{ eller } 3)$, fortrinnsvis $x = 4$ og $n = 2$ eller 3, mer foretrukket med $x = 4, n = 2$. I én utførelsesform er nevnte peptidkobler $(G_4S)_2$.

Betegnelsene "bindingssete" eller "antigenbindende sete" som anvendt heri angir regionen(e) av et antigenbindende protein ifølge oppfinnelsen, hvortil en ligand (f.eks. antigen eller antigenfragment derav), virkelig bindes, og som er avledet fra et antistoffmolekyl eller fragment derav (f.eks. et Fab-fragment). Antigenbindende sete ifølge oppfinnelsen omfatter en antistofftungkjedevariabel domene (VH) og antistofflettkjedevariable domener (VL).

Antigenbindende seter (dvs. par av VH/VL) som spesifikt bindes til det ønskede antigenet, kan bli avledet a) fra kjente antistoffer til antigenet, eller b) fra nye antistoffer eller antistofffragmenter oppnådd ved de novo immuniseringsmetoder ved

anvendelse av inter alia enten antigenproteinet eller nukleinsyren, eller fragmenter derav, eller ved fagdisplay.

5 Et antigenbindingssete av et antigenbindende protein ifølge oppfinnelsen inneholder seks komplementaritetsbestemmende regioner (CDRs), som bidrar i varierende grad til affiniteten av bindingssetet for antigenet. Det er tre tungkjedevariable domener CDRs (CDRH1, CDRH2 og CDRH3), og tre lettkjedevariable domener CDRs (CDRL1, CDRL2 og CDRL3). Grad av CDR og rammeverksregioner (FRs) blir bestemt ved sammenlikning med en sammensatt database av aminosyresekvenser, hvor disse
10 regionene er blitt definert ifølge variabiliteten blant sekvensene.

Antistoffspesifisiteten refererer til den selektive gjenkjenningen av antistoff eller antigenbindende protein for en bestemt epitope av et antigen. Naturlige antistoffer, f.eks., er monospesifikke. De spesifikke antistoffer er antistoffer som har to
15 forskjellige antigenbindende spesifisiteter. Hvor et antistoff har mer enn én spesifisitet, kan de gjenkjente epitopene bli assosiert med et enkelt antigen, eller med mer enn ett antigen.

Betegnelsen "monospesifikt" antistoff eller antigenbindende protein som anvendt heri,
20 angir et antistoff eller antigenbindende protein som har ett eller flere bindingsseter som hver bindes til den samme epitopen av det samme antigenet.

Betegnelsen "valent" som anvendt i gjeldende søknad angir tilstedeværelsen av et spesifikt antall bindingsseter i et antistoffmolekyl. Et naturlig antistoff f.eks. er et
25 fullengdeantistoff ifølge oppfinnelsen som har to bindingsseter, og er bivalent. Betegnelsen "tetravalent" angir tilstedeværelsen av fire bindingsseter i et antigenbindende protein. Betegnelsen "tetravalent, bispesifikk" som anvendt heri, angir at antigenbindende protein ifølge oppfinnelsen som har fire antigenbindingsseter hvorav to bindes til et annet antigen (eller en annen epitope av antigenet).
30 Antigenbindende proteiner ifølge oppfinnelsen har fire bindingsseter, og er tetravalente.

Fullengdeantistoffer ifølge oppfinnelsen omfatter immunoglobulin konstante regioner av én eller flere immunoglobulinklasser. Immunoglobulinklassene inkluderer IgG, IgM,
35 IgA, IgD, og IgE isotyper og, i tilfelle av IgG og IgA, deres subtyper. I en foretrukket utførelsesform har fullengdeantistoffet ifølge oppfinnelsen en konstant domenestruktur av et IgG-type antistoff.

Betegnelsene "monoklonalt antistoff" eller "monoklonal antistoffsammensetning" som anvendt heri, refererer til preparering av antistoff eller antistoff og antigenbindende proteinmolekyler av en enkelt aminosyresammensetning.

5

Betegnelsen "kimærisk antistoff" refererer til et antistoff omfattende en variabel region, dvs. bindingsregion, fra én kilde eller art, og minst en del av en konstantregion avledet fra en annen kilde eller art, vanligvis fremstilt ved rekombinante DNA-teknikker. Kimeriske antistoffer omfattende en murin variabel region, og en human konstant region er foretrukket. Andre foretrukne former av "kimære antistoffer" 10 omfattet av foreliggende oppfinnelse, er de hvor den konstante region er blitt modifisert eller endret fra den til det opprinnelige antistoffet for å danne egenskaper ifølge oppfinnelsen, spesielt med hensyn til C1q-binding og/eller Fc-reseptor (FcR) binding. Slike kimære antistoffer blir også referert til som "klassesvitsjede antistoffer". 15 Kimære antistoffer er produktet av uttrykte immunoglobulingener omfattende DNA-segmenter kodende for immunoglobulinvariable regioner og DNA-segmenter kodende for immunoglobulin konstantregioner. Metoder for produsering av kimære antistoffer involverer konvensjonelt rekombinant DNA og gentransfeksjonsteknikker som er velkjent innenfor fagområdet. Se f.eks. Morrison, S. L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 20 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 med forskjellig spesifisitet sammenliknet med den til 25 opphavsimmunoglobulinet. I en foretrukket utførelsesform blir murint CDR podet inn i rammeverksregionen til et humant antistoff for å danne "humanisert antistoff". Se f.eks. Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327; og Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270. Spesielt foretrukne CDR korresponderer med de som representerer sekvenser som gjenkjenner antigenene angitt ovenfor, for kimære antistoffer. Andre former for "humaniserte antistoffer" omfattet av foreliggende 30 oppfinnelse er de hvor den konstante regionen er blitt ytterligere modifisert eller forandret i forhold til den til det opprinnelige antistoffet for å danne egenskapene ifølge oppfinnelsen, spesielt med hensyn til C1q-binding og/eller Fc-reseptor (FcR) binding.

35

Betegnelsen "humant antistoff" som anvendt heri, er ment å innbefatte antistoffer som har variable og konstante regioner avledet fra humane

kimlinjeimmunoglobulinsekvenser. Humane antistoffer er velkjente innenfor fagområdet (van Dik, M.A., og van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). Humane antistoffer kan også bli produsert i transgene dyr (f.eks. mus) som har evne, ved immunisering, til å produsere et fullt repertoar eller en seleksjon av humane antistoffer i fravær av endogen immunoglobulinproduksjon. Overføring av human kimlinje immunoglobulingenrekke i slike kimlinje mutante mus vil resultere i produksjon av humane antistoffer ved antigeneksponering (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; Brueggermann, M., et al., Year Immunol. 7 (1993) 33-40). Humane antistoffer kan også bli produsert i fagfremvisningsbibliotek (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 tilgjengelige for preparering av humane monoklonale antistoffer (Cole, S.P.C., et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss (1985) 77-96; 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 heri også slike antistoffer som er modifisert i den konstante regionen for å danne egenskapene ifølge oppfinnelsen, spesielt med hensyn til C1q-binding og/eller FcR-binding, f.eks. ved "klassesvitsjing" dvs. forandring eller mutasjon av Fc-delene (f.eks. fra IgG1 til IgG4 og/eller IgG1/IgG4-mutasjon).

Betegnelsen "rekombinant humant antistoff", som anvendt heri, er ment å inkludere alle humane antistoffer som blir fremstilt, uttrykt, dannet eller isolert ved rekombinante metoder, så som antistoffer isolert fra en vertscelle så som NS0 eller CHO-celle eller fra et dyr (f.eks. en mus), som er transgen for humane immunoglobulingener eller antistoffer uttrykt ved anvendelse av en rekombinant ekspresjonsvektor transfektert inn i en vertscelle. Slike rekombinante humane antistoffer har variable og konstante regioner i en rearrangert form. Rekombinante humane antistoffer ifølge oppfinnelsen er blitt utsatt for in vivo somatisk hypermutasjon. Følgelig er aminosyresekvenser i VH- og VL-regionene av de rekombinante antistoffene sekvenser som, som avledet fra, og relatert til, humane kimlinjer VH- og VL-sekvenser, behøver ikke eksistere naturlig innenfor det humane antistoffkimlinjerepertoaret in vivo.

"Variabel domene" (variabel domene av en lett kjede (VL), variabel region av en tung kjede (VH) som anvendt heri angir hver av paret av lette og tunge kjeder som er involvert direkte i binding av antistoffet til antigenet. Domenene av variable humane

lett- og tungkjeder har den samme generelle strukturen, og hver domene omfatter fire rammeverk (FR) regioner, hvilke sekvenser er meget konserverte, koblet av tre "hypervariable regioner" (eller komplementaritetsbestemmende regioner, CDRs). Rammeverkregionene innehar en β -sheet konformasjon, og CDRs kan danne løkker som kobler β -sheet strukturen. CDRs i hver kjede blir holdt i deres tredimensjonale struktur ved rammeverksregioner, og danner sammen med CDRs fra den andre kjeden det antigenbindende setet. Antistoff tung- og lettkjede CDR3-regioner spiller en spesielt viktig rolle i bindingsspesifisiteten/affiniteten av antistoffene ifølge oppfinnelsen, og tilveiebringer derfor en ytterligere hensikt ifølge oppfinnelsen.

Betegnelsene "hypervariable region" eller "antigenbindende del av et antistoff" når anvendt heri, refererer til aminosyreresidier av et antistoff som er ansvarlig for antigenbinding. Den hypervariable regionen omfatter aminosyreresidier fra "komplementaritetsbestemmende regioner" eller "CDRs". "Rammeverk" eller "FR" regioner er de variable domeneregionene forskjellige fra de hypervariable regionresidiene som definert heri. Følgelig omfatter lette og tunge kjeder av et antistoff fra N- til C-terminusen domenene FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, og FR4. CDRs på hver kjede er separert av slike rammeverkaminosyrer. Spesielt er CDR3 av den tunge kjeden regionen som bidrar mest til antigenbindingen. CDR- og FR-regioner blir bestemt ifølge standarddefinisjonen til Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 56. utgave, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

Som anvendt heri refererer betegnelsen "binding" eller "spesifikk binding" til binding av antistoffet til en epitope av antigenet i en in vitro analyse, fortrinnsvis i en plasmon resonansanalyse (BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Sverige) med rensset villtype antigen. Affiniteten av bindingen er definert ved betegnelsene k_a (ratekonstant for assosiasjon av antistoffet (eller antistoff eller antigenbindende protein) fra antistoff/antigenkomplekset), k_D (dissosiasjonskonstant), og K_D (k_D/k_a). Binding eller spesifikk binding betyr en bindingsaffinitet (K_D) på 10^{-8} mol/l eller mindre, fortrinnsvis 10^{-9} M til 10^{-13} mol/l. Følgelig, et bispesifikt antigenbindingsprotein ifølge oppfinnelsen bindes spesifikt til hvert antigen som det er spesifikt for, med en bindingsaffinitet (K_D) på 10^{-8} mol/l eller mindre, fortrinnsvis 10^{-9} M til 10^{-13} mol/l.

Binding av antistoffet til Fc γ RIII kan bli undersøkt ved en BIAcore-analyse (GE-Healthcare Uppsala, Sverige). Affiniteten av bindingen er definert med betegnelsene

k_a (ratekonstant for assosiasjon av antistoffet fra antistoff/antigenkomplekset), k_D (dissosiasjonskonstant), og K_D (k_D/k_a).

5 Betegnelsen "epitope" inkluderer en hvilken som helst polypeptiddeterminant med evne for spesifikk binding til et antistoff. I visse utførelsesformer inkluderer epotopedeterminant kjemisk aktive overflategrupperinger av molekyler så som aminosyrer, sukkersidekjeder, fosforyl eller sulfonyl, og i visse utførelsesformer, kan ha spesifikke tredimensjonale strukturelle karaktertrekk, og/eller spesifikke ladningskaraktertrekk. En epitope er en region av et antigen som er bundet av et
10 antistoff.

I visse utførelsesformer angis det at et antistoff spesifikt bindes til et antigen når det fortrinnsvis gjenkjenner dets målantigen i en kompleks blanding av proteiner og/eller makromolekyler.

15 I en ytterligere utførelsesform blir det bispesifikke antigenbindende proteinet ifølge oppfinnelsen karakterisert ved at nevnte fullengdeantistoff er av human IgG1-subklasse, eller av human IgG1-subklasse med mutasjonene L234A og L235A.

20 I en ytterligere utførelsesform er det bispesifikke antigenbindende proteinet ifølge oppfinnelsen karakterisert ved at nevnte fullengdeantistoff er av human IgG2-subklasse.

I en ytterligere utførelsesform er det bispesifikke antigenbindende proteinet ifølge
25 oppfinnelsen karakterisert ved at nevnte fullengdeantistoff er av human IgG3-subklasse.

I en ytterligere utførelsesform er det bispesifikke antigenbindende proteinet ifølge
30 oppfinnelsen karakterisert ved at nevnte fullengdeantistoff er av human IgG4-subklasse eller, av human IgG4-subklasse med ytterligere mutasjon S228P.

Det er foretrukket at det bispesifikke antigenbindende proteinet ifølge oppfinnelsen er karakterisert ved at nevnte fullengdeantistoff er av human IgG1-subklasse, av human IgG4-subklasse med ytterligere mutasjon S228P.

35 Det er blitt funnet at de bispesifikke antigenbindende proteinene ifølge oppfinnelsen har forbedrede karaktertrekk så som biologisk eller farmakologisk aktivitet,

farmakokinetiske egenskaper eller toksisitet. De kan f.eks. bli anvendt for behandling av sykdommer så som cancer.

Betegnelsen "konstant region" som anvendt i gjeldende søknader angir summen av domener av et antistoff forskjellig fra den variable regionen. Den konstante regionen er ikke involvert direkte i bindingen av et antigen, men utviser forskjellige effektorfunksjoner. Avhengig av aminosyresekvensen til den konstante regionen av deres tunge kjeder, blir antistoffer delt inn i klassene: IgA, IgD, IgE, IgG og IgM, og flere av disse kan bli ytterligere delt inn i subklasser, så som IgG1, IgG2, IgG3 og IgG4, IgA1 og IgA2. Tung kjede konstantregionene som korresponderer med forskjellige klasser av antistoffer blir betegnet henholdsvis α , δ , ϵ , γ og μ . Lettkjede konstantregionene (CL) som kan finnes i alle fem antistoffklassene blir betegnet κ (kappa) og λ (lambda).

Betegnelsen "konstant region avledet fra human opprinnelse" som anvendt i denne søknaden, angir en konstant tung kjede region av et humant antistoff av subklassen IgG1, IgG2, IgG3 eller IgG4 og/eller en konstant lett kjede kappa- eller lambda-region. Slike konstante regioner er velkjente innenfor fagområdet, og f.eks. beskrevet av Kabat, E. A., (se f.eks. Johnson, G. og Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218; Kabat, E.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 2785-2788).

Idet antistoffer av IgG4-subklassen viser redusert Fc-reseptor (Fc γ IIIa) binding, viser antistoffer av andre IgG-subklasser sterk binding. Derimot er Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (tap av Fc karbohydrat), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 og His435 residier som, hvis endret, også tilveiebringer redusert Fc reseptorbinding (Shields, R.I., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., et al., FASEB J. 9 (1995) 115-119; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; EP 0 307 434).

I én utførelsesform har et antigenbindende protein ifølge oppfinnelsen en redusert FcR-binding sammenliknet med et IgG1-antistoff og fullengde oppavsantistoff er med hensyn til FcR-binding av IgG4-subklasse, eller av IgG1- eller IgG2-subklasse med en mutasjon i S228, L234, L235 og/eller D265, og/eller inneholder PVA236-mutasjonen. I én utførelsesform er mutasjonene i fullengde opphavsantistoffet S228P, L234A, L235A, L235E og/eller PVA236. I en annen utførelsesform er mutasjonene i fullengde opphavsantistoffet i IgG4 S228P og i IgG1 L234A og L235A.

Den konstante regionen av et antistoff er direkte involvert i ADCC (antistoffavhengig cellemediert cytotoksisitet) og CDC (komplementavhengig cytotoksisitet).

Komplementaktivering (CDC) blir injisert ved binding av komplementfaktor C1q til den konstante regionen av de fleste IgG-antistoffsubklassene. Binding av C1q til et antistoff blir forårsaket av definerte protein-proteininteraksjoner med det såkalte bindingssetet. Slike konstantregionbindingssteder er kjent innenfor fagområdet, og f.eks. beskrevet av Lukas, T.J., et al., J. Immunol. 127 (1981) 2255-2560; Brunhouse, R. og Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., et al., Nature 288 (1980) 338-344; Thommesen, J. E., et al., Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Indusogie, 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 konstantregionbindingssteder er f.eks. karakterisert av aminosyrene L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 og P329 (nummerering ifølge EU Kabat-indeks).

Betegnelsen "antistoffavhengig cellulær cytotoksisitet (ADCC)" refererer til lysering av humane målceller til et antigenbindende protein ifølge oppfinnelsen i nærvær av effektorceller. ADCC blir fortrinnsvis målt ved behandling av en preparering av antigenuttrykkende celler med et antigenbindende protein ifølge oppfinnelsen i nærvær av effektorceller så som friskt isolerte PBMC eller rensede effektorceller fra buffy coats, som monocytes eller naturlig drepe (NK) celler eller en permanent voksende NK-cellelinje.

Betegnelsen "komplementavhengig cytotoksisitet (CDC)" angir en prosess initiert ved binding av komplementfaktor C1q til Fc-delen av de fleste IgG-antistoffsubklassene. Binding av C1q til et antistoff vil forårsake av definerte protein-proteininteraksjoner ved det såkalte bindingssetet. Slike Fc-delbindingssteder er kjent innenfor fagområdet (se ovenfor). Slike Fc-delbindingssteder er f.eks. karakterisert av aminosyrene L234, L235, D270, N197, E318, K320, K322, P331 og P329 (nummerering ifølge EU Kabat-indeks). Antistoffer fra subklasse IgG1, IgG2 og IgG3 viser vanligvis komplimentaktivering, inkludert C1q og C3-binding, mens IgG4 ikke aktiverer komplementsystemet, og binder ikke C1q og/eller C3.

Cellemedierte effektorfunksjoner til monoklonale antistoffer kan bli forsterket ved omkonstruering av deres oligosakkaridkomponent som beskrevet i Umana, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180, og US 6 602 684. IgG1-type antistoffer, de mest vanlig anvendte terapeutiske antistoffene, er glykoproteiner som har et

konserverte N-koblet glykosyleringssete ved Asn297 i hver CH2-domene. De to
 komplekse biantennary oligosakkaridene koblet til Asn297 er begravet mellom CH2-
 domenene, og danner omfattende kontakter med polypeptidskjelettet, og deres
 tilstedeværelse er essensiell for at antistoffet medierer effektorfunksjonene så som
 5 antistoffavhengig cellulær cytotoxiskitet (ADCC) (Lifely, M. R., et al., *Glycobiology* 5
 (1995) 813-822; Jefferis, R., et al., *Immunol. Rev.* 163 (1998) 59-76; Wright, A., og
 Morrison, S.L., *Trends Biotechnol.* 15 (1997) 26-32). Umana, P., et al. *Nature*
Biotechnol. 17 (1999) 176-180 og WO 99/54342 viste at overekspresjon i kinesisk
 hamsterovarie (CHO) celler til $\beta(1,4)$ -N-acetylglukosaminyltransferase III ("GnTIII"),
 10 en glykosyltransferase som katalyserer dannelsen av halverte ("bisected")
 oligosakkarider, øker i betydelig grad in vitro ADCC-aktiviteten til antistoffene.
 Endringer i komposisjonen av Asn297 karbohydrat, eller dets eliminering påvirker
 også bindingen til Fc γ R og C1q (Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-
 180; Davies, J., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 74 (2001) 288-294; Mimura, Y., et al., *J.*
 15 *Biol. Chem.* 276 (2001) 45539-45537; Radaev, S., et al., *J. Biol. Chem.* 276 (2001)
 16478-16483; Shields, R.L., et al., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604; Shields,
 R.L., et al., *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 26733-26740; Simmons, L.C., et al., *J.*
Immunol. Methods 263 (2002) 133-147).

20 Metoder for å forøke cellemedierte effektorfunksjoner til monoklonale antistoffer er
 rapportert f.eks. i WO 2005/018572, WO 2006/116260, WO 2006/114700, WO
 2004/065540, WO 2005/011735, WO 2005/027966, WO 1997/028267, US
 2006/0134709, US 2005/0054048, US 2005/0152894, WO 2003/035835, WO
 2000/061739.

25 I én foretrukket utførelsesform ifølge oppfinnelsen blir det bispesifikke
 antigenbindingsproteinet glykosylert (hvis det omfatter en Fc-del av IgG1-, IgG2-,
 IgG3- eller IgG4-subklassene, fortrinnsvis IgG1- eller IgG3-subklassen) med en
 sukkerkjede ved Asn297, hvorved mengden av fukose innenfor nevnte sukkerkjede er
 30 65 % eller lavere (nummerering ifølge Kabat). I en annen utførelsesform er mengden
 av fukose innenfor nevnte sukkerkjede mellom 5 % og 65 %, fortrinnsvis mellom 20
 % og 40 %. "Asn297" ifølge oppfinnelsen betyr at aminosyren asparagin beliggende
 ved omtrent posisjon 297 i Fc-regionen. Basert på mindre sekvensvariasjoner av
 antistoffene, kan Asn297 også være lokalisert som aminosyrer (vanligvis ikke mer enn
 35 ± 3 aminosyrer) oppstrøms eller nedstrøms for posisjon 297, dvs. mellom posisjon
 294 og 300. I én utførelsesform er det glykosylerte antigenbindingsproteinet ifølge
 oppfinnelsen IgG-subklassen av human IgG1-subklasse, av human IgG1-subklasse

med mutasjonene L234A og L235A, eller av IgG3-subklassen. I en ytterligere utførelsesform er mengden av N-glykolyneuraminsyre (NGNA) 1 % eller mindre, og/eller mengden av N-terminal alfa-1,3-galaktose er 1 % eller mindre innenfor nevnte sukkerkjede. Sukkerkjeden viser fortrinnsvis karaktertrekkene til de N-koblede glykanene koblet til Asn297 av et antistoff rekombinant uttrykt i en CHO-celle.

Betegnelsen "sukkerkjeder viser karaktertrekk til N-koblede glykaner koblet til Asn297 av et antistoff rekombinant uttrykt i en CHO-celle" angir at sukkerkjeden ved Asn297 av fullengde opphavsantistoff ifølge oppfinnelsen har samme struktur og sukkerresidiesekvens med unntagelse av fukoseresidiet som de til det samme antistoffet uttrykt i umodifiserte CHO-celler, f.eks. som de rapportert i WO 2006/103100.

Betegnelsen "NGNA" som anvendt i denne beskrivelsen, angir sukkerresidiet N-glykolyneuraminsyre.

Glykosylering av human IgG1 eller IgG3 oppstår ved Asn297 som kjernefukosylert biantennær kompleks oligosakkaridglykosylering terminert med opptil 2 Gal-residier. Human konstant tung kjede regioner av IgG1- eller IgG3-subklassen er rapportert i detalj av Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. utgave. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), og av Brueggemann, M., et al., J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361; Love, T.W., et al., Methods Enzymol. 178 (1989) 515-527. Disse strukturene er betegnet som G0, G1 (α -1,6- eller α -1,3-), eller G2-glykanresidier, avhengig av mengden av de terminale Gal-residierne (Raju, T.S., Bioprocess Int. 1 (2003) 44-53). CHO-type glykosylering av antistoff Fc-deler er f.eks. beskrevet av Routier, F.H., Glycoconjugate J. 14 (1997) 201-207. Antistoffer som blir uttrykt rekombinant i ikke-glykomodifiserte CHO-vertsceller blir vanligvis fukosylert ved Asn297 i en mengde på minst 85 %. De modifiserte oligosakkaridene av fullengde opphavsantistoff kan være hybrid eller kompleks. Det er foretrukket at bisektert, redusert/ikke-fukosylerte oligosakkarider er hybrid. I en annen utførelsesform er bisektert redusert/ikke-fukosylerte oligosakkarider kompleks.

Ifølge oppfinnelsen betyr "mengde av fukose" mengden av nevnte sukker innenfor sukkerkjeden ved Asn297, relatert til summen av alle glykostrukturer koblet til Asn297 (f.eks. kompleks, hybrid og høy mannosestrukturer), målt ved MALDI-TOF massespektrometri, og beregnet som gjennomsnittlig verdi. Den relative mengden av

fukose er prosentandel av fukoseinnholdende strukturer relatert til alle glykostrukturer identifisert i en N-glykosydase F behandlet prøve (f.eks. kompleks, hybrid og oligo- og høy-mannosestrukturer) ved MALDI-TOF.

5 Det antigenbindende protein ifølge oppfinnelsen blir produsert ved rekombinant metode. Følgelig utgjør ett aspekt av foreliggende oppfinnelse en nukleinsyre kodende for antigenbindende protein ifølge oppfinnelsen, og et ytterligere aspekt er en celle omfattende nevnte nukleinsyre kodende for et antigenbindende protein ifølge oppfinnelsen. Metoder for rekombinant produksjon er meget kjent innenfor fagområdet, og omfatter proteinekspresjon i prokaryote og eukaryote celler med 10 påfølgende isolering av antigenbindende protein, og vanligvis rensing til en farmasøytisk akseptabel renhet. For ekspresjon av antistoffene som nevnt ovenfor i en vertscelle, blir nukleinsyrer kodende for de respektive modifiserte lette og tunge kjedene satt inn i ekspresjonsvektorer ved standardmetoder. Ekspresjonen blir utført i 15 hensiktsmessige prokaryote eller eukaryote vertsceller som CHO-celler, NS0-celler, SP2/0-celler, HEK293-celler, COS-celler, PER.C6-celler, gjær, eller E. coli celler, og det antigenbindende proteinet blir isolert fra cellene (supernatant eller celler etter lysering). Generelle metoder for rekombinant produksjon av antistoffer er velkjent innenfor fagområdet, og f.eks. beskrevet i oversiktsartiklene 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) 151-160; Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880.

De bispesifikke antigenbindende proteinene ifølge oppfinnelsen blir hensiktsmessig separert fra kulturmediet ved konvensjonell immunoglobulinrenningsprosedyrer så 25 som f.eks. protein A-sefaroze, hydroksylapatitt, kromatografi, gelelektroforese, dialyse eller affinitetskromatografi. DNA eller RNA kodende for de monoklonale antistoffene blir lett isolert og sekvensert ved anvendelse av konvensjonelle prosedyrer. Hybridomcellene kan virke som en kilde på slikt DNA eller RNA. Når isolert kan DNA bli 30 satt inn i ekspresjonsvektorer, som deretter blir transfektert inn i vertsceller så som HEK293-celler, CHO-celler, eller myelomceller som ikke ellers produserer immunoglobulinprotein, for å oppnå syntese av rekombinante monoklonale antistoffer i vertscellene.

35 Aminosyressekvensvarianter (eller mutanter) av det bispesifikke antigenbindende proteinet blir fremstilt ved introdusering av hensiktsmessige nukleotidforandringer i det antigenbindende protein-DNA, eller ved nukleotidsyntese. Slike modifikasjoner kan

derimot bli utført, kun i et meget begrenset omfang, f.eks. som beskrevet ovenfor. F.eks. endrer modifikasjonen ikke overnevnte antistoffkaraktertrekk, så som IgG-isotypen og antigenbinding, men kan forbedre utbyttet av rekombinant produksjon, proteinstabilitet eller lette rensingen.

5

Betegnelsen "vertscelle" som anvendt i denne søknaden, angir en hvilken som helst type av cellulært system som kan bli omkonstruert for å danne antistoffene ifølge foreliggende oppfinnelse. I én utførelsesform blir HEK293-celler og CHO-celler anvendt som vertsceller. Som anvendt heri blir uttrykkene "celle", "cellelinje" og "cellekultur" anvendt om hverandre, og alle slike angivelser inkludeer avkom. Følgelig angir ordene "transformanter" og "transformerte celler" den primære gjeldende cellen, og kulturer avledet derifra, uten hensyntagen til antallet overføringer. Det er også underforstått at alle avkom ikke behøver å være nøyaktig identiske i DNA-innhold, grunnet med hensikt eller mutasjoner uten hensikt. Variantavkom som har den samme funksjonen eller den biologiske aktiviteten som screenet for i den opprinnelige transformerte cellen er inkludert.

15

Ekspresjon i NS0-celler er f.eks. beskrevet av Barnes, L.M., et al., Cytotechnology 32 (2000) 109-123; Barnes, L.M., et al., Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270. Transient ekspresjon er f.eks. beskrevet av Durocher, Y., et al., Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9. Kloning av variable domener er beskrevet av 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 Schlaeger, E.-J., i Immunol. Methods 194 (1996) 191-199.

20

25

Kontrollsekvenser som er egnet for prokaryoter, f.eks., inkluderer en promoter, eventuelt en operatorsekvens, og et ribosombindingssete. Eukaryote celler er kjent for å anvende promotere, enhancere og polyadenyleringssignaler.

30

En nukleinsyre er "operabelt koblet" når den blir plassert i et funksjonelt forhold med en annen nukleinsyresekvens. F.eks. er DNA for en pre-sekvens eller sekretorisk leder operabelt koblet til DNA for et polypeptid dersom det blir uttrykt som et pre-protein som deltar i sekresjonen av polypeptidet; en promoter eller enhancer er operabelt koblet til en kodende sekvens dersom den påvirker transkripsjonen av sekvensen; eller et ribosombindingssete er operabelt koblet til en kodende sekvens dersom den er

35

posisjonert slik at den letter translasjonen. Generelt betyr "operabelt koblet" at DNA-sekvensene som blir koblet er etter hverandre, og, når det gjelder sekretorisk leder, kontinuerlig og i leseramme. Derimot behøver enhancere ikke å være påfølgende. Kobling blir oppnådd ved ligering ved hensiktsmessige restriksjons seter. Dersom slike
 5 seter ikke eksisterer, blir syntetiske oligonukleotidadaptorer eller linkere anvendt i henhold til konvensjonell praksis.

Rensing av antistoffer blir utført for å eliminere cellulære komponenter eller andre kontaminanter, f.eks. andre cellulære nukleinsyrer eller proteiner, ved
 10 standardteknikker, inkludert alkalisk/SDS-behandling, CsCl-binding, kolonnekromatografi, agarosegelelektroforese, og andre som er velkjente innenfor fagområdet. Se Ausubel, F., et al., red. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing og Wiley Interscience, New York (1987). Forskjellige metoder er vel etablerte, og omfattende brukt for proteinrensing, såsom affinitetskromatografi med
 15 mikrobielle proteiner (f.eks. protein A eller protein G affinitetskromatografi), ionebyttekromatografi (f.eks. kationbytte (karboksymetylharpiks), anionbytte (aminoetylharpikser) og blandet-modusutveksling), tiofil adsorpsjon (f.eks. med beta-merkaptotanol og andre SH-ligander), hydrofob interaksjon eller aromatisk adsorpsjonskromatografi (f.eks. med fenyl-sefarose, aza-arenofile harpikser, eller m-aminofenylboronsyre), metallgelataffinitetskromatografi (f.eks. med Ni(II)- og Cu(II)-
 20 affinitetsmateriale), størrelseseksklusjonskromatografi og elektroforetiske metoder (så som gelelektroforese, kapillærelektroforese) (Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102).

25 Ett aspekt av oppfinnelsen er en farmasøytisk sammensetning omfattende et antigenbindende protein ifølge oppfinnelsen. Et annet aspekt av oppfinnelsen er anvendelse av et antigenbindende protein ifølge oppfinnelsen for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning. Et ytterligere aspekt av oppfinnelsen er en fremgangsmåte for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning omfattende et
 30 antigenbindende protein ifølge oppfinnelsen. I et annet aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en sammensetning, f.eks. en farmasøytisk sammensetning inneholdende et antigenbindende protein ifølge foreliggende oppfinnelse, formulert sammen med en farmasøytisk bærer.

35 Et annet aspekt av oppfinnelsen er nevnte farmasøytiske sammensetning for behandling av cancer.

Et annet aspekt av oppfinnelsen er det bispesifikke antigenbindende proteinet ifølge oppfinnelsen, for behandling av cancer.

5 Et annet aspekt av oppfinnelsen er anvendelse av et antigenbindende protein ifølge oppfinnelsen, for fremstilling av et medikament for behandling av cancer.

Et annet aspekt av oppfinnelsen er en fremgangsmåte for behandling av en pasient som lider av cancer ved administrering av et antigenbindende protein ifølge oppfinnelsen til nevnte pasient som trenger slik behandling.

10

Som anvendt heri inkluderer "farmasøytisk bærer" hvilke som helst og alle løsningsmidler, dispersjonsmedier, belegg, antibakterielle og antisoppmidler, isotone og absorpsjonsforsinkende midler, og liknende som er fysiologisk compatible. Det er foretrukket at bæreren er egnet for intravenøs, intramuskulær, subkutan, parenteral, spinal eller epidermal administrering (f.eks. ved injeksjon eller infusjon).

15

En sammensetning ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli administrert ved forskjellige metoder kjent innenfor fagområdet. Som kjent for fagfolk innenfor dette området vil veien og/eller metoden for administrering variere avhengig av de ønskede resultatene. For å administrere en forbindelse ifølge oppfinnelsen ved visse administrasjonsveier kan være nødvendig å belegge forbindelsen med, eller ko-administrere forbindelsen med, et materiale for å forebygge inaktivering derav. F.eks. kan forbindelsen bli administrert til et individ i en hensiktsmessig bærer, f.eks., liposomer, eller et fortynningsmiddel. Farmasøytisk akseptable fortynningsmidler inkluderer saltvann og vandige bufferløsninger. Farmasøytiske bærere inkluderer sterile vandige løsninger eller dispersjoner og sterile pulvere for ektemporær preparering av sterile injiserbare løsninger eller dispersjoner. Anvendelse av slikt media, og midler for farmasøytisk aktive forbindelser er kjent innenfor fagområdet.

20

25

30 Uttrykkene "parenteral administrering" og "administrert parenteralt" som anvendt heri, betyr administrasjonsmetoder forskjellig fra enteral og topisk administrering, vanligvis ved injeksjon, og inkluderer, uten begrensning, intravenøs, intramuskulær, intraarteriell, intratekal, intrakapsulær, intraorbital, intrahjerte, intradermal, intraperitoneal, transtracheal, subkutan, subkutikulært, intraartikulært, subkapsulært, subaraknoid, intraspinal, epidural og intrasternal injeksjon og infusjon.

35

Betegnelsen cancer som angitt heri refererer til proliferative sykdommer, så som lymfomer, lymfocytiske leukemier, lungecancer, ikke småcellelunge (NSCL) cancer, bronkioloalveolar cellelungecancer, bencancer, pankreascancer, hudcancer, cancer i hode eller nakke, kutane eller intraokulære melanom, uterin cancer, ovariecancer, 5 rektalcancer, cancer i analregionen, magecancer, gastrisk cancer, tarmcancer, brystcancer, uterincancer, karsinom i fallopian tubes, karsinom i endometriet, karsinom i cervix, karsinom i vagina, karsinom i vulva, Hodgkins Disease, cancer i spiserør, cancer i tynntarm, cancer i endokrine system, cancer i tyroidkjertel, cancer i paratyroidkjertel, cancer i adrenalkjertel, sarkom i bløtvev, cancer i uretra, cancer i 10 penis, prostatacancer, blærecancer, cancer i nyre eller ureter, renal cellekarsinom, karsinom i renal pelvis, mesoteliom, hepatocellulær cancer, biliær cancer, neoplasmer i sentralvervesystem (CNS), spinalaksetumorer, hjernestammegliom, glioblastom multiforme, astrocytomer, schwanomer, ependymoner, medulloblastomer, meningioma, skvamøse cellekarsinomer, pituitær adenom og Ewings sarkom, inkludert 15 refraktoriske versjoner av hvilke som helst av overnevnte cancerformer, eller en kombinasjon av én eller flere av overnevnte cancerformer.

Disse sammensetningene kan også inneholde adjuvanter så som konserveringsmidler, fuktemidler, emulgeringsmidler og dispergeringsmidler. Forebygging av 20 tilstedeværelse av mikroorganismer kan bli forsikret både ved steriliseringsprosedyrer, ovenfor, og ved innlemming av forskjellige antibakterielle og anti-soppmidler, f.eks., paraben, klorbutanol, fenol, sorbinsyre og liknende. Det kan også være ønskelig å inkludere isotoniske midler, så som sukre, natriumklorid og liknende, inn i sammensetningene. I tillegg kan forlenget absorpsjon av den injiserbare 25 farmasøytiske formen bli oppnådd ved inklusjon av midler som forsinker absorpsjonen så som aluminiummonostearat og gelatin.

Uansett administreringsvei som blir valgt, kan forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse bli anvendt i en egnet hydrert form, og/eller de farmasøytiske 30 sammensetningene ifølge foreliggende oppfinnelse blir formulert til farmasøytisk akseptable doseringsformer ved konvensjonelle metoder kjent for fagfolk innenfor dette området.

De bestemte doseringsnivåene av de aktive ingrediensene i de farmasøytiske 35 sammensetningene ifølge foreliggende oppfinnelse kan variere for å oppnå en mengde av det aktive ingredienset som er effektivt for å oppnå den ønskede terapeutiske responsen for en bestemt pasient, sammensetning og administreringsmåte, uten å

være toksisk for pasienten. Det valgte doseringsnivået vil avhenge av forskjellige farmakokinetiske faktorer, inkludert aktiviteten til de bestemte sammensetningene ifølge foreliggende oppfinnelse som blir anvendt, administreringsvei, administreringstid, ekskresjonsrate til den bestemte forbindelsen som blir anvendt, 5 behandlingsvarigheten, andre medikamenter, forbindelser og/eller materialer anvendt i kombinasjon med de bestemte sammensetningene som blir anvendt, alder, kjønn, vekt, tilstand, generell helse, og tidligere medisinsk historie til pasienten som blir behandlet, og liknende faktorer velkjente innenfor det medisinske området.

10 Sammensetningen må være steril og flytende i den grad av sammensetningen kan leveres med sprøyte. I tillegg til vann er bæreren fortrinnsvis en isoton bufret saltvannsløsning.

Riktig fluiditet kan bli målt, f.eks., ved anvendelse av belegg så som lecitin, ved 15 opprettholdelse av nødvendig partikkelstørrelse når det gjelder dispersjon, og ved anvendelse av overflateaktive midler. I mange tilfeller er det foretrukket å inkludere isotoniske midler, f.eks., sukre, polyalkoholer så som mannitol eller sorbitol, og natriumklorid i sammensetningen.

20 Som anvendt heri, blir uttrykkene "celle", "cellelinje" og "cellekultur" anvendt om hverandre, og alle slike angivelser inkluderer avkom. Følgelig inkluderer ordene "transformanter" og "transformerte celler" den primære gjeldende cellen, og kulturer avledet derifra uten hensyn til antallet overføringer. Det er også underforstått at alle avkom ikke behøver å være nøyaktig identiske i DNA-innhold, grunnet med hensikt 25 eller uten hensikt, mutasjoner. Variantavkom som har den samme funksjonen eller biologiske aktiviteten som screenet for i den opprinnelige transformerte cellen er inkludert. Når bestemte angivelser er ment, vil dette være klart ut fra sammenhengen.

30 Betegnelsen "transformasjon" som anvendt heri, refererer til fremgangsmåte for overføring av en vektor/nukleinsyre i en vertscelle. Dersom celler uten formidable celleveggbarrierer blir anvendt som vertsceller, blir transfeksjon utført f.eks. ved kalsiumfosfatpresipiteringsmetoden som beskrevet av Graham, F.L., og Van der Eb, A.J., Virology 52 (1973) 456-467. Derimot kan andre metoder for introdusering av 35 DNA inn i cellene så som ved nukleær injeksjon, eller ved protoplastfusjon også bli anvendt. Dersom prokaryote celler eller celler som inneholder vesentlige celleveggkonstruksjoner blir anvendt, er f.eks. en metode for transfeksjon

kalsiumbehandling ved anvendelse av kalsiumklorid som beskrevet av Cohen, S.N., et al., PNAS. 69 (1972) 2110-2114.

Som anvendt heri refererer "ekspressjon" til prosessen hvorved en nukleinsyre blir transkribert inn i mRNA og/eller fremgangsmåten hvorved transkribert mRNA (også referert til som transkript) senere blir translatert til peptider, polypeptider eller proteiner. Transkriptene og kodede polypeptider blir kollektivt referert til som genprodukt. Dersom polynukleotidet er avledet fra genomisk DNA, kan ekspressjon i en eukaryot celle inkludere spleising av mRNA.

10

En "vektor" er et nukleinsyremolekyl, spesielt selvreplikerende, som overfører et innsatt nukleinsyremolekyl inn i og/eller mellom vertscellene. Betegnelsen inkluderer vektorer som hovedsakelig virker for innskudd av DNA eller RNA inn i en celle (f.eks. kromosomal integrasjon), replikasjon av vektorer som hovedsakelig virker for replikasjon av DNA eller RNA, og ekspressjonsvektorer som virker for transkripsjon og/eller translasjon av DNA eller RNA. Også inkludert er vektorer som tilveiebringer mer enn én av funksjonene som beskrevet.

15

En "ekspressjonsvektor" er et polynukleotid som, når introdusert inn i en hensiktsmessig vertscelle, kan bli transkribert og translatert til et polypeptid. Et "ekspressjonssystem" refererer vanligvis til en egnet vertscelle omfattende en ekspressjonsvektor som kan virke slik at det tilveiebringer et ønsket ekspressjonsprodukt.

20

Følgende eksempler, sekvensliste og figurer er gitt for å hjelpe med forståelsen av foreliggende oppfinnelse, det sanne omfanget som er angitt i de vedlagte kravene.

25

Beskrivelse av sekvenslisten

SEKV. ID nr. 1 umodifisert tungkjede <Ang-2> med C-terminal fusjonert <VEGF> VH-CL-domener av modifisert Fab-fragment (CH1-CL-utveksling).

30

SEKV. ID nr. 2 <VEGF> VL-CH1-domener av modifisert Fab-fragment (CH1-CL-utveksling).

35

SEKV. ID nr. 3 umodifisert lett kjede <Ang-2>.

SEKV. ID nr. 4 umodifisert tung kjede <Ang-2> med N-terminalfusjonerte <VEGF> VH-CL-domener av modifisert Fab-fragment (CH1-CL-utveksling).

5 **SEKV. ID nr. 5** modifisert tung kjede <VEGF> (CH1-CL-utveksling) med C-terminal fusjonerte <Ang-2> VH-CH1-domener av umodifisert Fab-fragment.

Beskrivelse av figurer

10 **Figur 1:** Skjematisk struktur av et fullengdeantistoff uten CH4-domenen som spesifikt binder til et første antigen 1 med to par av tung og lett kjede som omfatter variable og konstante domener i en typisk rekkefølge.

15 **Figur 2a og 2b:** Skjematisk struktur av typisk umodifiserte Fab-fragmenter som spesifikt bindes til et andre antigen 2 med peptidkobleren enten ved C-terminus (figur 2a) eller N-terminus (figur 2b) av CH1-VH-kjeden.

20 **Figur 3:** Skjematisk struktur til et fullengdeantistoff som spesifikt bindes til et første antigen 1 som er fusjonert til N-terminusen av dets tungkjede to umodifiserte Fab-fragmenter som spesifikt bindes til et andre antigen 2 (figur 3a) og uønskede biprodukter grunnet misparing (fig. 3b og fig. 3c).

25 **Figur 4a, 4b og 4c:** Skjematisk struktur til et bispesifikt antigenbindingsproteiner ifølge oppfinnelsen, hvor feilparingen er redusert ved erstatning av visse domener a) i Fab-fragmentet til fullengdeantistoffet som spesifikt bindes til et første antigen 1, og/eller b) i to ytterligere fusjonerte Fab-fragmenter antistoff som spesifikt bindes til et andre antigen 2. Figur 4a viser bispesifikke antigenbindingsproteiner. Figur 4b og 4c viser alle kombinasjonen av VH/VL og/eller CH1/CL-domeneutvekslinger innenfor fullengde Fab-fragmenter, og de ytterligere Fab-fragmentene som fører til de spesifikke antigenbindingsproteiner ifølge oppfinnelsen, som reduserer feilparing.

30

Figur 5: Skjematisk struktur av et bispesifikt antigenbindingsproteiner ifølge oppfinnelsen som gjenkjenner Ang-2 og VEGF (eksempel 1).

35 **Figur 6:** Skjematisk struktur av et bispesifikt antigenbindingsproteiner ifølge oppfinnelsen som gjenkjenner Ang-2 og VEGF (eksempel 2).

Figur 7: Skjematisk struktur til et bispesifikt antigenbindingsproteiner ifølge oppfinnelsen som gjenkjenner Ang-2 og VEGF (eksempel 3).

Eksempler

5

Materialer og generelle metoder

Generell informasjon med hensyn på nukleotidsekvensene til humane immunoglobulin lette og tunge kjeder 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 av antistoffkjeder er nummerert og referert til ifølge EU-nummereringen (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)).

15

Rekombinante DNA-teknikker

Standardmetoder blir 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. De molekylære biologiske reagensene blir anvendt ifølge forhandlerens instruksjoner.

20

Gensyntese

Ønskede gensegmenter blir dannet fra oligonukleotider dannet ved kjemisk syntese. Gensegmenter som er flankert av singulære restriksjonsendonukleasespaltingssteder blir satt sammen ved sammenkobling og ligering av oligonukleotider inkludert PCR-amplifikasjon, og deretter klonet via de indikerte restriksjonssetene, f.eks. KpnI/SacI eller AscI/PacI inn i et pPCRScripT (Stratagene) basert pGA4-kloningsvektor. DNA-sekvensene til de subklonede genfragmentene blir bekreftet ved DNA-sekvensering. Gensyntesefragmenter blir ordnet ifølge gitte spesifikasjoner ved Geneart (Regensburg, Tyskland).

30

DNA-sekvensbestemmelse

DNA-sekvenser blir bestemt ved dobbelttrådet sekvensering utført ved MediGenomix GmbH (Martinsried, Tyskland) eller Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Tyskland).

35

DNA- og proteinsekvensanalyse og sekvensdatahåndtering

GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) programvarepakke versjon 10.2 og Infomax's Vector NT1 Advance suite versjon 8.0 er anvendt for sekvensdannelse, kartlegging, analyse, annotering og illustrasjon.

5 **Ekspresjonsvektorer**

For ekspresjon av de beskrevne bispesifikke tetravalente antistoffvariantene av ekspresjonsplasmider for transient ekspresjon (f.eks. i HEK293 EBNA eller HEK293-F) celler basert enten på en cDNA-organisering med eller uten en CMV-Intron A promoter, eller på en genomisk organisering med en CMV-promoter blir anvendt.

10

Bortsett fra antistoffekspresjonskassetten inneholdt vektorene:

- et replikasjonsorigo som muliggjør replikasjon av dette plasmidet i E. coli, og
- et β -laktamasegen som tilveiebringer ampicillinresistens i E. coli.

15 Transkripsjonsenheten av antistoffgenet består av følgende elementer:

- unikt restriksjonssete(r) ved 5'-enden,
- øyeblikkelig early enhancer og promoter fra humant cytomegalovirus,
- etterfulgt av en Intron A sekvens i tilfelle av cDNA-organisering,
- en 5'-utranslatert region av et humant antistoffgen,
- en immunoglobulin tung kjede signalsekvens,
- human bispesifikk tetravalent antistoffkjede (villtype eller med

20

domeneutveksling), enten som cDNA eller som genomisk organisering med en immunoglobulin ekson-intron-organisering,

- en 3'-utranslatert region med en polyadenyleringssignalsekvens, og
- unikt restriksjonssete(r) ved 3'-enden.

25

Fusjonsgenene som omfatter de beskrevne antistoffkjedene som beskrevet nedenfor blir dannet ved PCR og/eller gensyntese, og oppstilt med kjente rekombinante metoder og teknikker ved kobling av gjeldende nukleinsyresegmenter f.eks. ved

30 anvendelse av unike restriksjonsseter i de respektive vektorene. De subklonede nukleinsyresekvensene blir verifisert ved DNA-sekvensering. For transiente infeksjoner blir større andeler av plasmidene dannet ved plasmidpreparering fra transformerte E. coli kulturer (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

35 **Cellekulturteknikker**

Standard cellekulturteknikker blir 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.

- 5 Bispesifikke tetravalente antistoffer blir uttrykt ved forbigående ko-transfeksjon av de respektive tre ekspresjonsplasmidene i adherentvoksende HEK293-EBNA, eller i HEK29-F-celler som vokser i suspensjon som beskrevet nedenfor.

Transienttransfeksjoner i HEK293-EBNA-sytemet

- 10 Bispesifikke tetravalente antistoffer blir uttrykt ved transient ko-transfeksjon av de respektive tre ekspresjonsplasmidene (f.eks. kodende for den modifiserte tunge kjeden, og også den korresponderende lette og modifiserte lette kjeden) i adherentvoksende HEK293-EBNA-celler (human embryonisk nyrecellelinje 293 som uttrykker Epstein-Barr-Virus nuclear antigen; American type culture collection
- 15 deponeringsnummer ATCC # CRL-10852, Lot. 959 218) dyrket i DMEM (Dulbeccos modifiserte Eagles medium, Gibco) supplementert med 10 % Ultra Low IgG FCS (føtalt kalveserum, Gibco), 2 mM L-glutamin (Gibco), og 250 µg/ml Geneticin (Gibco). For transfeksjon blir FuGENE™ 6 transfeksjonsreagens (Roche Molecular Biochemicals) anvendt i et forhold mellom FuGENE™-reagens (µl) til DNA (µg) på 4:1 (varierende fra
- 20 3:1 til 6:1). Proteinene blir uttrykt fra de respektive plasmidene ved anvendelse av et molart forhold mellom (modifisert og villtype) lett kjede og modifisert tung kjede kodende plasmider på 1:1:1 (ekvimolar) varierende fra henholdsvis 1:1:2 til 2:2:1. Cellene blir føret på dag 3 med L-glutamin ad 4 mM, glukose [Sigma] og NAA [Gibco]. Bispesifikke tetravalente antistoffinneholdende cellekultursupernatanter blir høstet fra
- 25 dag 5 til 11 etter transfeksjon ved sentrifugering, og lagret ved -20°C. Generell informasjon med hensyn til rekombinant ekspresjon av humane immunoglobuliner i f.eks. HEK293-celler er gitt i Meissner, P. et al., Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203.

Transienttransfeksjoner i HEK293-F-systemet

- 30 Alternativt blir bispesifikke tetravalente antistoffer dannet ved transient transfeksjon av de respektive plasmidene (f.eks. kodende for den modifiserte tunge kjeden, samt den korresponderende lette og modifiserte lette kjeden), ved anvendelse av HEK293-F-systemet (Invitrogen) ifølge forhandlerens instruksjoner. Forklart i korte trekk blir
- 35 HEK293-F-celler (Invitrogen) som vokser i suspensjon enten i en risteflaske eller i en omrørt fermentor i serumfritt FreeStyle 293 ekspresjonsmedium (Invitrogen) transfektert med en blanding av de tre ekspresjonsplasmidene som beskrevet ovenfor,

og 293 fektin eller fektin (Invitrogen). For 2 L risteflasker (Corning) HEK293-F-celler blir utsådd ved en tetthet på $1,0 \times 10^6$ celler/mL i 600 mL, og inkubert ved 120 rpm, 8 % CO₂. Dagen etter at cellene blir transfektert ved en celletetthet på ca. $1,5 \times 10^6$ celler/mL med ca. 42 mL blanding av A) 20 mL Opti-MEM (Invitrogen) med 600 µg totalplasmid-DNA (1 µg/mL) kodende for den modifiserte tunge kjeden, den korresponderende lette kjeden, og korresponderende modifiserte lettkjeden i et ekvimolart forhold og B) 20 ml Opti-MEM + 1,2 mL 293 fektin eller fektin (2 µl/mL). Ifølge glukoseforbruket blir glukoseløsning tilsatt i løpet av fermenteringsforløpet. Supernatanten inneholdende det utskilte antistoffet blir høstet etter 5-10 dager og antistoffene blir enten direkte rensset fra supernatanten, eller supernatanten blir frosset og lagret.

Proteinbestemmelse

Proteinkonsentrasjonen av rensede bispesifikke tetravalente antistoffer og derivater blir bestemt ved bestemmelse av den optiske tettheten (OD) ved 280 nm, ved anvendelse av den molekulære ekstinksjonskoeffisienten beregnet på grunnlag av aminosyresekvensen ifølge Pace, C.N., et al., Protein Science 4 (1995) 2411-1423.

Antistoffkonsentrasjonsbestemmelse i supernatanter

Konsentrasjonen av bispesifikke tetravalente antistoffer i cellekultursupernatanter blir beregnet ved immunopresipitering med Protein A Agarose-beads (Roche). 60 µL Protein A Agarose-kuler eller vasket tre ganger i TBS-NP40 (50 mM Tris, pH 7,5; 150 mM NaCl, 1 % Nonidet-P40). Deretter blir 1-15 mL cellekultursupernatant applisert på Protein A Agarose-kuler pre-ekvilibrert i TBS-NP40. Etter inkubasjon i 1 t ved romtemperatur blir kulene vasket på en ultrafri MC-filterkolonne (Amicon) én gang med 0,5 mL TBS-NP40, to ganger med 0,5 mL 2x fosfatbufret saltvann (2xPBS, Roche), og kort fire ganger med 0,5 mL 100 mM Na-sitrat pH 5,0. Bundet antistoff blir eluert ved tilsetning av 35 µl NuPAGE® LDS Sample Buffer (Invitrogen). Halvparten av prøven blir kombinert med NuPAGE® Sample Reducing Agent eller latt stå uredusert, og oppvarmet i 10 min. ved 70°C. Deretter blir 5-30 µl applisert på en 4-12 % NuPAGE® Bis-Tris SDS-PAGE (Invitrogen) (med MOPS-buffer for ikke-reduert SDS-PAGE, og MES-buffer med NuPAGE® antioksidant løpebufferadditiv (Invitrogen) for redusert SDS-PAGE) og farget med Coomassie blå.

Konsentrasjonen av bispesifikke tetravalente antistoffer i cellekultursupernatanter blir målt kvantitativt ved affinitets HPLC-kromatografi. Forklart i korte trekk blir cellekultursupernatanter inneholdende antistoffer og derivater som bindes til protein A

appliert på en Applied Biosystems Poros A/20 kolonne i 200 mM KH₂PO₄, 100 mM natriumsitrat, pH 7,4, og eluert fra matrisen med 200 mM NaCl, 100 mM sitronsyre, pH 2,5 på et Agilent HPLC 1100 system. Det eluerte proteinet blir kvantifisert ved UV-absorbans og integrasjon av toppområdene. Et rensset standard IgG1-antistoff virket
5 som en standard.

Alternativt blir konsentrasjonen av bispesifikke tetravalente antistoffer i cellekultursupernatanter målt ved Sandwich-IgG-ELISA. Som forklart i korte trekk blir StreptaWell High Bind Streptavidin A-96-brønn mikrotiterplater (Roche) belagt med
10 100 µL/brønn biotinyleret anti-humant IgG-oppfangingsmolekyl F(ab')₂-hFcγ BI (Dianova) ved 0,1 µg/mL i 1 t ved romtemperatur, eller alternativt over natt 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 blir tilsatt til brønnene, og inkubert i 1-
15 2 t på en mikrotiterplaterister ved romtemperatur. Brønnene blir vasket tre ganger med 200 µL/brønn PBST og bundet antistoff blir detektert med 100 µL F(ab')₂-hFcγ-POD (Dianova) ved 0,1 µg/mL som deteksjonsantistoff i 1-2 t på en mikrotiterplaterister ved romtemperatur. Ubundet deteksjonsantistoff blir vasket bort tre ganger med 200 µL/brønn PBST, og bundet deteksjonsantistoff blir detektert ved
20 tilsetning av 100 µL ABTS/brønn. Bestemmelse av absorbansen blir utført på et Tecan fluorspektrometer ved en målebølgelengde på 405 nm (referansebølgelengde 492 nm).

Proteinrensing

25 Proteiner blir rensset fra filtrerte cellekultursupernatanter som refererer til standardprotokoller. Kort forklart blir bispesifikke tetravalente antistoffer applisert på en protein A sefarosekolonne (GE Healthcare) og vasket med PBS. Eluering av bispesifikke tetravalente antistoffer blir oppnådd ved pH 2,8, etterfulgt av øyeblikkelig nøytralisering av prøven. Aggregert protein blir separert fra de monomere antistoffene
30 ved størrelseseksklusjonskromatografi (Superdex 200, GE Healthcare) i PBS eller i 20 mM histidin, 150 mM NaCl pH 6,0. Monomere fraksjoner blir slått sammen, konsentrert om nødvendig ved anvendelse av f.eks. en MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO) sentrifugalkonsentrator, frosset og lagret ved -20°C eller -80°C. Deler av prøvene blir tilveiebrakt for påfølgende proteinanalyser, og analytisk karakterisering
35 f.eks. ved SDS-PAGE, størrelseseksklusjonskromatografi eller massespektrometri.

SDS-PAGE

NuPAGE® Pre-Cast gelsystem (Invitrogen) blir anvendt ifølge forhandlerens instruksjoner. Spesielt blir 10 % eller 4-12 % NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast geler (pH 6,4) og en NuPAGE® MES (reduerte geler, med NuPAGE® antioksidant løpebufferadditiv) eller MOPS (ikke-reduerte geler) løpebuffer anvendt.

5

Analytisk størrelseseksklusjonskromatografi

Størrelseseksklusjonskromatografi for bestemmelse av aggregasjonen og den oligomere tilstanden til de bispesifikke tetravalente antistoffene blir utført ved HPLC-kromatografi. Forklart i korte trekk blir protein A rensede antistoffer applisert på en

10 Tosoh TSKgel G3000SW-kolonne i 300 mM NaCl, 50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7,5 på et Agilent HPLC 1100-system eller på en Superdex 200 kolonne (GE Healthcare) i 2 x PBS på et Dionex HPLC-system. Det eluerte proteinet blir kvantifisert ved UV-absorbans og integrasjon av toppområdene. BioRad gelfiltreringsstandard 151-1901 virket som en standard.

15

Massespektrometri

Den totale deglykosylerte massen av de bispesifikke tetravalente antistoffene blir bestemt og bekreftet via elektroprayioniseringsmassespektrometri (ESI-MS). Forklart i korte trekk blir 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 t ved en

20 proteinkonsentrasjon på opp til 2 mg/ml, og deretter avsaltet via HPLC på en Sephadex G25 kolonne (GE Healthcare). Massen til den respektive modifiserte tunge, lette kjeden og modifiserte lette kjeden blir bestemt ved ESI-MS etter deglykosylering og reduksjon. Forklart i korte trekk blir 50 µg bispesifikt tetrivalent antistoff i 115 µl

25 inkubert med 60 µl 1M TCEP og 50 µl 8 M guanidin-hydroklorid deretter avsaltet. Den totale massen, og massen til de reduserte tunge og lette kjedene blir bestemt via ESI-MS på et Q-Star Elite MS system utstyrt med en NanoMate-kilde.

VEGF-binding ELISA

30 Bindingsegenskapene til de bispesifikke tetravalente antistoffene blir vurdert i en ELISA-analyse med fullengde VEGF165-His-protein (R&D Systems). For dette blir Falcon polystyrenklare forsterkede mikrotiterplater belagt med 100 µl 2 µg/mL rekombinant human VEGF165 (R&D Systems) i PBS i 2 t ved romtemperatur, eller over natt ved 4°C. Brønnene blir vasket tre ganger med 300 µl PBST (0,2 % Tween

35 20) og blokkert med 200 µl 2 % BSA 0,1 % Tween 20 i 30 min. ved romtemperatur, og deretter vasket tre ganger med 300 µl PBST. 100 µL/brønn av en fortyningsserie av de rensede bispesifikke tetravalente antistoffene i PBS (Sigma) blir tilsatt til

brønnene, og inkubert i 1 t på en mikrotiterplaterister ved romtemperatur. Brønnene blir vasket tre ganger med 300 µl PBST (0,2 % Tween 20) og bundet antistoff blir detektert med 100 µL/brønn 0,1 µg/ml F(ab')₂ hFcγ₁POD (Immuno research) i 2 % BSA, 0,1 % Tween 20 som deteksjonsantistoff i 1 t på en mikrotiterplaterister ved romtemperatur. Ubundet deteksjonsantistoff blir vasket bort tre ganger med 300 µL/brønn PBST, og bundet deteksjonsantistoff blir detektert ved tilsetning av 100 µL ABTS/brønn. Bestemmelse av absorbansen blir utført på et Tecan fluorspektrometer ved en målingsbølgelengde på 405 nm (referansebølgelengde 492 nm).

VEGF-binding: Kinetisk karakterisering av VEGF-binding ved 37°C ved overflateplasmonresonans (Biacore)

For å ytterligere undersøke ELISA-funnene blir bindingen av de bispesifikke tetravalente antistoffene til VEGF analysert kvantitativt ved anvendelse av overflateplasmonresonansteknologi på et Biacore T100-instrument ifølge følgende protokoll, og analysert ved anvendelse av T100 programvaren: forklart i korte trekk blir bispesifikke tetravalente antistoffer oppfanget på en CM5-chip via binding til et Goat Anti Human IgG (JIR 109-005-098). Oppfanget antistoff blir immobilisert ved aminokobling ved anvendelse av standard aminokobling som følger: HBS-N-buffer virker som løpebuffer, aktivering blir utført ved en blanding av EDC/NHS med det formålet for ligandtetthet på 700 RU. Oppfangingsantistoff blir fortynnet i koblingsbuffer NaAc, pH 5,0, c = 2 µg/mL, til slutt blir fortsatt aktiverte karboksylgrupper blokkert ved injeksjon av 1 M etanolamin. Oppfangning av bispesifikke tetravalente <VEGF> antistoffer blir utført ved en strømning på 5 µL/min. og c = 10 nM, fortynnet med løpebuffer + 1 mg/mL BSA; et oppfangingsnivå på omtrent 30 RU bør bli oppnådd. rhVEGF (rhVEGF, R&D-Systems kat. nr. 293-VE) blir anvendt som analytt. Den kinetiske karakteriseringen av VEGF-binding til bispesifikke tetravalente <VEGF> antistoffer blir utført ved 25°C eller 37°C i PBS + 0,005 % (volum/volum) Tween 20 som løpebuffer. Prøven blir injisert med en strømning på 50 µL/min., og en assosiasjon av tid på 80 sek., og en dissosiasjonstid på 1200 sek. med en konsentrasjonsserie på rhVEGF fra 300-0,29 nM. Regenerering av fri oppfangingsantistoffoverflate blir utført med 10 mM glysin pH 1,5, og en kontakttid på 60 sek. etter hver analyttsyklus. Kinetiske konstanter blir beregnet ved anvendelse av den uvanlige dobbeltrefererende metoden (kontrollreferanse: binding av rhVEGF for å oppfange molekylet Geit Anti Human IgG, blank på den målende strømningscelle, rhVEGF-konsentrasjon "0", modell: Langmuir-binding 1:1, (R_{max} satt til lokal på grunn av oppfangingsmolekylbinding).

Ang-2-binding ELISA

Bindingsegenskapene til de bispesifikke tetravalente antistoffene blir vurdert i en ELISA-analyse med fullengde Ang-2-His-protein (R&D Systems). For dette formålet blir Falcon polystyren klar forsterkede mikrotiterplater belagt med 100 μ l 1 μ g/mL rekombinant human Ang-2 (R&D Systems, carrier-free) i PBS i 2 t ved romtemperatur, eller over natt ved 4°C. Brønnene blir vasket tre ganger med 300 μ l PBST (0,2 % Tween 20) og blokkert med 200 μ l 2 % BSA 0,1 % Tween 20 i 30 min. ved romtemperatur, og deretter vasket tre ganger med 300 μ l PBST. 100 μ L/brønn av en fortyningsserie av de rensede bispesifikke tetravalente antistoffene i PBS (Sigma) blir tilsatt til brønnene, og inkubert i 1 t på en mikrotiterplaterister ved romtemperatur. Brønnene blir vasket tre ganger med 300 μ l PBST (0,2 % Tween 20) og bundet antistoff blir detektert med 100 μ L/brønn 0,1 μ g/ml F(ab') <hk>POD (Biozol kat. nr. 206005) i 2 % BSA 0,1 % Tween 20 som deteksjonsantistoff i 1 t på en mikrotiterplaterister ved romtemperatur. Ubundet deteksjonsantistoff blir vasket bort tre ganger med 300 μ L/brønn PBST, og bundet deteksjonsantistoff blir detektert ved tilsetning av 100 μ L ABTS/brønn. Bestemmelse av absorbansen blir utført på et Tecan fluorspektrometer ved en målt bølgelengde på 405 nm (referansebølgelengde 492 nm).

Ang-2-binding BIACORE

Binding av de bispesifikke tetravalente antistoffene til human Ang-2 blir undersøkt ved overflateplasmonresonans ved anvendelse av en BIACORE T100 instrument (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Sverige). Forklart i korte trekk, for affinitetsmålinger blir geit<hlgG-Fc> polyklonale antistoffer immobilisert på en CM5-chip via aminkobling for presentasjon av de bispesifikke tetravalente antistoffene overfor human Ang-2. Bindingen blir målt i HBS-buffer (HBS-P (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005 % Tween 20, pH 7,4), 25°C. Renset Ang-2-His (R&D Systems eller rensset lokalt) blir tilsatt i forskjellige konsentrasjoner i løsning. Assosiasjon blir målt ved en Ang-2-injeksjon i 3 minutter, dissosiasjon blir målt ved vasking av chipoverflaten med HBS-buffer i 3 minutter, og en KD-verdi blir vurdert ved anvendelse av en 1:1 Langmuir bindingsmodell. Grunnet heterogenisiteten til Ang-2-prepareringen, kan ingen 1:1 binding bli observert; KD-verdier er følgelig kun relative beregninger. Negative kontrolldata (f.eks. bufferkurver) blir subtrahert fra prøvekurver for korreksjon av systeminstrinsisk baselinjedrift, og for reduksjon av bakgrunnsstøysignal. Biacore T100 Evaluation Software versjon 1.1.1 blir anvendt for analyse av sensorgrammer, og for beregning av affinitetsdata. Alternativt kan Ang-2 bli oppfanget med et oppfangingsnivå på 2000-1700 RU via et PentaHisAntibody

(Pentaø-His-Ab BSA-fritt, Qiagen nr. 34660) som er immobilisert på en CM5-chip via aminkobling (BSA-fri) (se nedenfor).

Ang-2-VEGF-brodannende ELISA

5 Bindingsegenskapene til de bispesifikke tetravalente antistoffene blir vurdert i en ELISA-analyse med immobilisert fullengde VEGF165-His-protein (R&D Systems) og humant Ang-2-His-protein (R&D Systems) for deteksjon av bundet bispesifikt antistoff. Kun et bispesifikt tetravalent <VEGF-Ang-2> antistoff har evne til å binde samtidig til VEGF og Ang-2, og følgelig brodanne de to antigenene mens
10 monospesifikke "standard" IgG1-antistoffene ikke har evne til simultan binding til VEGF og Ang-2 (figur 7).

For dette ble Falcon polystyren klare forsterkede mikrotiterplater belagt med 100 µl 2 µg/mL rekombinant human VEGF165 (R&D Systems) i PBS 1 2 t ved romtemperatur
15 eller over natt ved 4°C. Brønnene ble vasket tre ganger med 300 µl PBST (0,2 % Tween 20) og blokkert med 200 µl 2 % BSA 0,1 % Tween 20 i 30 min. ved romtemperatur, og deretter vasket tre ganger med 300 µl PBST. 100 µL brønn av en fortyningsserie av rensede bispesifikke tetravalente antistoffer i PBS (Sigma) blir tilsatt til brønnene og inkubert i 1 t på en mikrotiterplateryster ved romtemperatur.
20 Brønnene ble vasket tre ganger med 300 µl PBST (0,2 % Tween 20) og bundet antistoff blir detektert ved tilsetning av 100 µl 0,5 µg/ml human Ang-2-His (R&D Systems) i PBS. Brønnene ble vasket tre ganger med 300 µl PBST (0,2 % Tween 20) og bundet Ang-2 blir detektert med 100 µl 0,5 µg/mL <Ang-2>mIgG1-biotinantistoff (BAM0981, R&D Systems) i 1 t ved romtemperatur. Ubundet deteksjonsantistoff blir
25 vasket bort med tre ganger 300 µl PBST (0,2 % Tween 20) og bundet antistoff blir detektert ved tilsetning av 100 µl 1:2000 streptavidin-POD-konjugat (Roche Diagnostics GmbH, kat. nr. 11089153) 1:4 fortynnet i blokkeringsbuffer i 1 t ved romtemperatur. Ubundet streptavidin-POD-konjugat blir vasket bort med tre-seks
30 ganger 300 µl PBST (0,2 % Tween 20) og bundet streptavidin-POD-konjugat blir detektert ved tilsetning av 100 µl ABTS/brønn. Bestemmelse av absorbans blir utført på et Tecan fluorspektrometer ved en målingsbølglengde på 405 nm (referansebølglengde 492 nm).

Demonstrering av simultan binding av bispesifikt tetravalent antistoff

<VEGF-Ang-2> til VEGF-A og Ang-2 av Biacore

35 For å ytterligere bearbeide data fra brodannende ELISA blir en ytterligere analyse etablert for å bekrefte simultan binding til VEGF og Ang-2 ved anvendelse av

overflateplasmonresonansteknologi på et Biacore T100 instrument ifølge følgende protokoll, og analysert ved anvendelse av T100 programvaren (T100 Control, versjon 2.01 T100 Evaluation, versjon 2.01, T100 Kinetics Summary, versjon 1.01): Ang-2 blir oppfanget med et oppfangingsnivå på 2000-1700 RU i PBS, 0,005 % (volum/volum) Tween 20 løpebuffer via et PentaHisAntibody (PentaHis-Ab BSA-fri, Qiagen nr. 34660) som er immobilisert på en CM5-chip via aminkobling (BSA-fritt). HBS-N-buffer virket som løpebuffer i løpet av koblingen, aktivering blir utført ved blanding av EDC/NHS. PentaHis-Ab BSA-fritt Capture-Antibody blir fortynnet i koblingsbuffer NaAc, pH 4,5, c = 30 µg/mL, deretter blir fortsatt aktiverte karboksylgrupper blokkert ved injeksjon av 1 M etanolamin; ligandtetthet på 5000 og 17000 RU ble testet. Ang-2 med en konsentrasjon på 500 nM blir oppfanget av PentaHis-Ab ved en strømning på 5 µL/min. fortynnet med løpebuffer + 1 mg/ml BSA. Deretter blir <Ang-2, VEGF> bispesifikt tetravalent antistoffbinding til Ang-2 og til VEGF demonstrert ved inkubasjon med rhVEGF og dannelsen av et sandwichkompleks. For dette blir det bispesifikke tetravalente <VEGF-Ang-2> antistoff bundet til Ang-2 ved en strømningsrate på 50 µL/min., og en konsentrasjon på 100 nM, fortynnet med løpebuffer + 1 mg/ml BSA, og samtidig binding blir detektert ved inkubasjon med VEGF (rhVEGF, R&D Systems kat. nr. 293-VE) i PBS + 0,005 % (volum/volum) Tween 20 løpebuffer ved en strømning på 50 µL/min., og en VEGF-konsentrasjon på 150 nM. Assosiasjonstid 120 sek., dissosiasjonstid 1200 sek.. Regenerering blir utført etter hver syklus ved en strømning på 50 µL/min. med 2 x 10 mM glysin pH 2,0, og en kontaktid på 60 sek. Sensorgrammer blir korrigert ved anvendelse av vanlig dobbeltreferering (kontrollreferanse: binding av bispesifikt antistoff og rhVEGF for å oppfange molekylet PentaHisAb). Blankprøver for hver Ab blir målt med rhVEGF-konsentrasjon "0".

Dannelsen av HEK293-Tie2-cellelinje

For å bestemme ingerferensen til <Ang-2, VEGF> bispesifikke tetravalente antistoffer med Ang-2-stimulert Tie2-fosorylering og binding av Ang-2 til Tie2 på cellene, ble en rekombinant HEK293-Tie2-cellelinje dannet. Forklart i korte trekk, ble pcDNA3-basert plasmid (RB22-pcDNA3 Topo hTie2) kodende for fullengde human Tie2 under kontroll av en CMV-promoter, og en neomycinresistensmarkør transfektert ved anvendelse av Eugene (Roche Applied Science) som transfeksjonsreagens inn i HEK293-celler (ATCC) og resistantceller ble valgt i DMEM 10 % FCS, 500 µg/ml G418. Individuelle kloner ble isolert via en kloningssylinder, og deretter analysert for Tie2-ekspresjon av FACS. Klon 22 ble identifisert som klon med høy og stabil Tie2-ekspresjon selv i fravær av G418

(HEK293-Tie2 klon 22). HEK293-Tie2 klon 22 ble deretter anvendt for cellulære analyser: Ang-2-indusert Tie2-fosforylering og Ang-2-cellulær ligandbindingsanalyse.

Ang2-indusert Tie2-fosforyleringsanalyse

5 Inhibisjon av Ang-2-indusert Tie2-fosforylering av <Ang-2, VEGF> bispesifikke tetravalente antistoffer blir målt ifølge følgende analyseprinsipp. HEK293-Tie2 klon 22 blir stimulert med Ang-2 i 5 minutter i fravær eller nærvær av Ang-2-antistoff, og P-Tie2 blir kvantifisert av en sandwich ELIS. Forklart i korte trekk, blir 2x10⁵ HEK293-Tie2 klon 22-celler pr. brønn dyrket over natt på en Poly-D-Lysin-belagt 96-brønn

10 mikrotiterplate i 100 µl DMEM, 10 % FCS, 500 µg/ml geneticin. Neste dag ble en titreringsrad på <Ang-2, VEGF> bispesifikke tetravalente antistoffer dannet i en mikrotiterplate (4-ganger konsentrasjon, 75 µl sluttvolum/brønn, duplikater), og blandet med 75 µl av en Ang-2 (R&D Systems # 623-AN) fortynning (3,2 µg/ml som 4-ganger konsentrasjonsløsning). Antistoffer og Ang-2 blir pre-inkubert i 15 min. ved

15 romtemperatur. 100 µl av blandingen ble tilsatt til HEK293-Tie2 klon 22-celler (pre-inkubert i 5 min. med 1 mM NaV3O₄, Sigma #S6508) og inkubert i 5 min. ved 37°C. Deretter ble cellene vasket med 200 µl iskald PBS + 1 mM NaV3O₄ pr. brønn, og lysert ved tilsetning av 120 µl lyseringsbuffer (20 mM Tris, pH 8,0, 137 mM NaCl, 1 % NP-40, 10 % glyserol, 2 mM EDTA, 1 mM NaV3O₄, 1 mM PMSF og 10 µg/ml aprotinin)

20 pr. brønn på is. Cellene blir lysert i 30 min. ved 4°C på en mikrotiterplaterister, og 100 µl lysat blir overført direkte på en p-Tie2 ELISA-mikrotiterplate (R&D Systems, R&D #DY990) uten forhåndssentrifugering, og uten bestemmelse av totalprotein. P-Tie2-mengder blir kvantifisert ifølge forhandlerens instruksjoner, og IC₅₀-verdier for inhibisjon blir bestemt ved anvendelse av XLfit4-analys plug-in for Excel (Dose-response one site, modell 205). IC₅₀-verdier kan bli sammenliknet innenfor et

25 eksperiment, men kan variere fra eksperiment til eksperiment.

VEGF-indusert HUVEC proliferasjonsanalyse

VEGF-indusert HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, Promocell #C-12200)

30 proliferasjon blir valgt for å måle den cellulære funksjonen av <Ang-2, VEGF> bispesifikke tetravalente antistoffer. Forklart i korte trekk, ble 5000 HUVEC-celler (lavt passeringsnummer, <S passeringer) pr. 96 brønner inkubert i 100 µl "starvation" medium (EMB-2 Endothelial basal medium 2, Promocell # C-22211, 0,5 % FCS, penicillin/streptomycin) i en kollagen I-belagt BD Biocoat Collagen I 96-brønn

35 mikrotiterplate (BD #354407/35640 over natt. Varierende konsentrasjoner av <Ang-2, VEGF> bispesifikt tetravalent antistoff blir blandet med rhVEGF (30 ng/ml sluttkonsentrasjon, BD # 354107) og pre-inkubert i 15 minutter ved romtemperatur.

Deretter blir blandingen tilsatt til HUVEC-cellene, og de ble inkubert i 72 t ved 37°C, 5 % CO₂. På analysedagen blir platene ekvilibrert til romtemperatur ved 30 min., og cellelevedyktighet/proliferasjon ble bestemt ved anvendelse av CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability analysekit ifølge manualen (Promega, # G7571/2/3).

5 Luminescens blir bestemt i et spektrofotometer.

Eksempel 1

Produksjon, ekspresjon, rensing og karakterisering av et bispesifikt og tetravalent antistoff som gjenkjenner Ang-2 og VEGF-A

10 I et første eksempel ble et bispesifikt tetravalent antistoff uten en linker mellom de respektive antistoffkjedene som gjenkjenner Ang-2 og VEGF-A dannet ved fusjonering via en (G4S)₄-konnektor en VH-CL-domenefusjon overfor VEGF-A, til C-terminusen av den tunge kjeden til et antistoff som gjenkjenner Ang-2 (SEKV. 1 eller en korresponderende IgG1-allotype). For å oppnå det bispesifikke tetravalente
15 antistoffet, ble denne tungkjedekonstruksjonen ko-uttrykt med plasmider kodende for den respektive lette kjeden av Ang-2-antistoffet (SEKV. 3) og en VL-CH1-domenefusjon som gjenkjenner VEGF-A (SEKV. 2). Skjemaet for det respektive antistoffet er gitt i fig. 5.

20 Det bispesifikke tetravalente antistoffet blir dannet og beskrevet i den generelle metodedelen ved klassiske molekylærbiologiske teknikker, og blir uttrykt forbigående i HEG293F-cellene som beskrevet ovenfor. Deretter ble det rensset fra supernatanten ved en kombinasjon av protein A affinitetskromatografi og størrelseseksklusjonskromatografi. Det oppnådde produktet ble karakterisert for
25 identitet ved massespektrometri, og analytiske egenskaper så som renhet ved SDS-PAGE, monomerinnhold og stabilitet.

Ekspresjon	Rensing	
Titer [µg/ml]	Utbytte sluttprodukt	Homogenisitet (sluttprodukt)
21	19,2 mg/L	95 %

30 Disse data viser at det bispesifikke tetravalente antistoffet kan bli produsert i gode utbytter og er stabilt.

Påfølgende binding til Ang-2 og VEGF-A samt simultan binding ble studert ved ELISA- og Biacore-analyser beskrevet ovenfor, og de funksjonelle egenskapene så som

inhibisjon av Tie2-fosorylering og inhibisjon av VEGF-indusert HUVEC-proliferasjon blir analysert ved å vise at det dannede bispesifikke tetravalente antistoffet har evne til å bli bundet til Ang-2 og VEGF-A, og blokkerer deres aktivitet simultant.

5 **Eksempel 2**

Produksjon, ekspresjon, rensing og karakterisering av et bispesifikt og tetravalent antistoff som gjenkjenner Ang-2 og VEGF-A

I et andre eksempel ble et bispesifikt tetravalent antistoff uten en linker mellom de respektive antistoffkjedene som gjenkjenner Ang-2 og VEGF-A dannet ved fusjonering
 10 via en (G4S)₄-konnektor en VH-CL-domenefusjon overfor VEGF-A til N-terminusen av den tunge kjeden til et antistoff som gjenkjenner Ang-2 (SEKV. 4 eller en korresponderende IgG1-allotype). For å oppnå det bispesifikke tetravalente antistoffet, ble denne tungkjedekonstruksjonen ko-uttrykt med plasmider kodende for den respektive lette kjeden av Ang-2-antistoffet (SEKV. 3) og en VL-CH1-
 15 domenefusjon som gjenkjenner VEGF-A (SEKV. 2). Skjemaet for det respektive antistoffet er gitt i fig. 6.

Bispesifikt tetravalent antistoff ble dannet som beskrevet i den generelle metodedelen ved klassiske molekylærbiologiske teknikker, og blir uttrykt forbigående i HEK293F-
 20 celler som beskrevet ovenfor. Deretter ble det rensset fra supernatanten ved en kombinasjon av protein A affinitetskromatografi og størrelseseksklusjonskromatografi. Det kombinerte produktet ble karakterisert for identitet ved massespektrometri, og analytiske egenskaper så som renhet ved SDS-PAGE, monomerinnhold og stabilitet.

Ekspresjon	Rensing	
Titer [µg/ml]	Utbytte sluttprodukt	Homogenisitet (sluttprodukt)
18	12,4 mg/L	95 %

25

Disse data viser at de spesifikke tetravalente antistoffer kan bli produsert i gode utbytter, og er stabilt.

30 Som påfølgende binding til Ang-2 og VEGF-A samt simultan binding ble studert ved ELISA- og Biacore-analyser beskrevet ovenfor, og funksjonelle egenskaper så som inhibisjon av Tie2-fosorylering og inhibisjon av VEGF-indusert HUVEC-proliferasjon blir analysert, og viser at det dannede bispesifikke tetravalente antistoffet har evne til å bli bundet til Ang-2 og VEGF-A, og blokkerer deres aktivitet simultant.

Eksempel 3**Produksjon, ekspresjon, rensing og karakterisering av et bispesifikt og tetravalent antistoff som gjenkjenner Ang-2 og VEGF-A**

I et tredje eksempel ble et bispesifikt tetravalent antistoff uten en linker mellom de respektive antistoffkjedene som gjenkjenner Ang-2 og VEGF-A dannet ved fusjonering via en (G4S)₄-konnektor av en VH-CH1 Fab-domene, og for Ang-2 til den C-terminale enden av den tunge kjeden av et CH1-CL-utvekslingsantistoff som gjenkjenner VEGF (SEKV. 5 eller en korresponderende IgG1-allotype). For å oppnå det bispesifikke tetravalente antistoffet, ble denne tungkjedekonstruksjonen ko-uttrykt med plasmider kodende for den respektive lette kjeden av Ang-2-antistoff (SEKV. 3) og en VL-CH1-domenefusjon som gjenkjenner VEGF-A (SEKV. 2)- Skjemaet til det respektive antistoffet er vist i fig. 7.

Det bispesifikke tetravalente antistoffet ble dannet som beskrevet i den generelle metod delen ved klassiske molekylære biologiske teknikker, og blir uttrykt forbigående i HEK293F-celler som beskrevet ovenfor. Deretter ble det rensset fra supernatanten ved en kombinasjon av protein A affinitetskromatografi, og størrelseseksklusjonskromatografi. Det oppnådde produktet ble karakterisert for identitet ved massespektrometri, og analytiske egenskaper så som renhet ved SDS-PAGE, monomerinnhold og stabilitet.

Ekspresjon	Rensing	
Titer [μ g/ml]	Utbytte sluttprodukt	Homogenisitet (sluttprodukt)
8,5-9	1,8-4,1 mg/L	100 %

Disse data viser at det bispesifikke tetravalente antistoffet kan bli produsert i gode utbytter, og er stabilt.

Påfølgende binding til Ang-2 og VEGF-A samt samtidig binding ble studert ved ELISA- og Biacore-analyser beskrevet ovenfor, og de funksjonelle egenskapene så som inhibisjon av Tie2-fosorylering og inhibisjon av VEGF induerte HUVEC-proliferasjon blir analysert, og viser at det dannede bispesifikke tetravalente antistoffet har evne til å bli bundet til Ang-2 og VEGF-A, og blokkerer deres aktivitet samtidig.

- 1 -

Sekvensliste

<110> F. Hoffmann-La Roche AG
 <120> Bispecific antigen binding proteins
 <130> 26145 WO
 <150> EP09007857.7
 <151> 2009-06-16
 <160> 5
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 709
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> unmodified heavy chain <Ang-2> with C-terminal fused <VEGF> VH-CL domains of modified Fab Fragment (CH1-CL exchange)
 <400> 1
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
245 250 255

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
260 265 270

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
275 280 285

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
290 295 300

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
325 330 335

- 3 -

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415

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

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 450 455 460

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 465 470 475 480

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 485 490 495

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly
 500 505 510

Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 515 520 525

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
 530 535 540

Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Leu

545 550 555 560

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

- 5 -

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr
 100 105 110

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 115 120 125

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 130 135 140

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 145 150 155 160

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 180 185 190

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 195 200 205

Pro Lys Ser Cys
 210

- 6 -

<211> 215
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> unmodified light chain <Ang-2>

<400> 3

Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
 85 90 95

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Thr Val Ala
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

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

- 7 -

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 4

<211> 709

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> unmodified heavy chain <Ang-2> with N-terminal fused <VEGF> VH-CL domains of modified Fab Fragment (CH1-CL exchange)

<400> 4

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60

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

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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 130 135 140

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
145 150 155 160

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
165 170 175

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu
245 250 255

Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys
260 265 270

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg
275 280 285

Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn
290 295 300

Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met
305 310 315 320

Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu
325 330 335

Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Asn Pro
340 345 350

Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly Ala Phe Asp Ile

- 9 -

355		360		365
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly				
370		375		380
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly				
385		390		395 400
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val				
	405		410	415
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe				
	420		425	430
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val				
	435		440	445
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val				
	450		455	460
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys				
465		470		475 480
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu				
	485		490	495
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr				
	500		505	510
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val				
	515		520	525
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val				
530		535		540
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser				
545		550		555 560
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu				
	565		570	575

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

50

- 11 -

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60

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

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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 130 135 140

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 145 150 155 160

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 165 170 175

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 225 230 235 240

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 245 250 255

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 260 265 270

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 275 280 285

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 290 295 300

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315 320

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 325 330 335

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 340 345 350

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 355 360 365

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 370 375 380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 385 390 395 400

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 405 410 415

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 420 425 430

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 435 440 445

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 450 455 460

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln
 465 470 475 480

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val

- 14 -

690

695

700

Glu Pro Lys Ser Cys
705

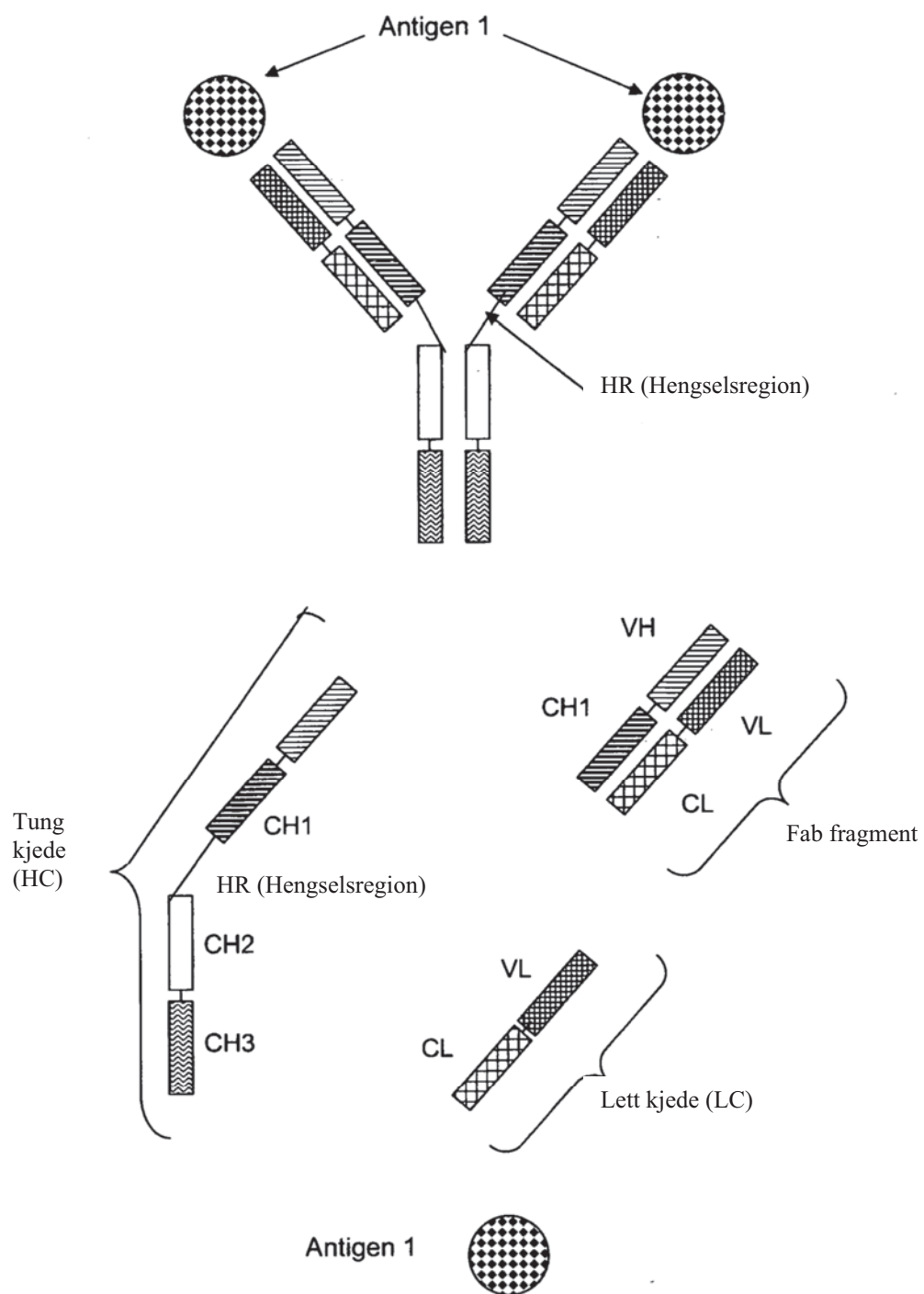
PATENTKRAV

1. Et bispesifikt antigenbindende protein, omfattende:
 - a) to lette kjeder og to tunge kjeder av et antistoff, som spesifikt bindes til et første antigen, og som omfatter to Fab-fragmenter;
 - b) to ytterligere Fab-fragmenter av et antistoff som spesifikt bindes til et andre antigen, hvor nevnte ytterligere Fab-fragmenter blir fusjonert både via en peptidkobler, enten ved den C- eller N-terminale enden av de tunge kjedene av a); idet i Fab-fragmentene blir følgende modifikasjoner utført:
 - i) i begge Fab-fragmentene i a), eller i begge Fab-fragmentene i b), blir de variable domenene VL og VH erstattet med hverandre, og/eller de konstante domenene CL og CH1 blir erstattet med hverandre,
 - ii) i begge Fab-fragmentene ifølge a) blir de variable domenene VL og VH erstattet med hverandre, og de konstante domenene CL og CH1 blir erstattet med hverandre, og i begge Fab-fragmentene i b) blir de variable domenene VL og VH erstattet med hverandre, eller de konstante domenene CL og CH1 blir erstattet med hverandre,
 - iii) i begge Fab-fragmentene i a) blir de variable domenene VL og VH erstattet med hverandre, eller de konstante domene CL og CH1 blir erstattet med hverandre, og i begge Fab-fragmentene i b) blir de variable domenene VL og VH erstattet med hverandre, og de konstante domenene CL og CH1 blir erstattet med hverandre,
 - iv) i begge Fab-fragmentene ifølge a) blir de variable domene VL og VH erstattet med hverandre, og i begge Fab-fragmentene i b) blir de konstante domenene CL og CH1 erstattet med hverandre, eller
 - v) i begge Fab-fragmentene i a) blir de konstante domenene CL og CH1 erstattet med hverandre, og i begge Fab-fragmentene i b) blir de variable domenene VL og VH erstattet med hverandre.
2. Det bispesifikke antigenbindende proteinet ifølge krav 1, hvor nevnte ytterligere Fab-fragmenter er fusjonert både via en peptidkobler enten til den C-terminale enden av de tunge kjedene ifølge a), eller til den N-terminale enden av de tunge kjedene i a).
3. Det bispesifikke antigenbindende proteinet ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d a t i Fab-fragmentene blir følgende modifikasjoner utført:
 - i) i begge Fab-fragmentene ifølge a), eller i begge Fab-fragmentene ifølge b),

blir de variable domenene VL og VH erstattet med hverandre, og/eller de konstante domenene CL og CH1 blir erstattet med hverandre.

4. Det bispesifikke antigenbindende protein ifølge krav 3,
 5 k a r a k t e r i s e r t v e d a t i Fab-fragmentene blir følgende modifikasjoner utført:
 i) i begge Fab-fragmentene ifølge a) blir de variable domenene VL og VH
 erstattet med hverandre, og/eller de konstante domenene CL og CH1 blir erstattet
 med hverandre.
- 10 5. Det bispesifikke antigenbindende proteinet ifølge krav 4,
 k a r a k t e r i s e r t v e d a t i Fab-fragmentene blir følgende modifikasjoner utført:
 i) i begge Fab-fragmentene ifølge a) blir de konstante domenene CL og CH1
 erstattet med hverandre.
- 15 6. Det bispesifikke antigenbindende proteinet ifølge krav 3,
 k a r a k t e r i s e r t v e d a t i Fab-fragmentene blir følgende modifikasjoner utført:
 i) i begge Fab-fragmentene ifølge b) blir de variable domenene VL og VH
 erstattet med hverandre, og/eller de konstante domenene CL og CH1 blir erstattet
 med hverandre.
- 20 7. Det bispesifikke antigenbindende proteinet ifølge krav 6,
 k a r a k t e r i s e r t v e d a t i Fab-fragmentene blir følgende modifikasjoner utført:
 i) i begge Fab-fragmentene ifølge b) blir de konstante domenene CL og CH1
 erstattet med hverandre.
- 25 8. En fremgangsmåte for fremstilling av et bispesifikt antigenbindende protein
 ifølge kravene 1-7, omfattende de følgende trinnene
 a) transformering av en vertscelle med vektorer omfattende
 nukleinsyremolekyler kodende for et bispesifikt antigenbindende protein ifølge kravene
 30 1-7,
 b) dyrking av vertscellen under betingelser som muliggjør syntese av nevnte
 antigenbindende proteinmolekyl, og
 c) isolering av nevnte antigenbindende proteinmolekyl fra nevnte kultur.
- 35 9. En vertscelle omfattende vektorene ifølge krav 8.

10. En farmasøytisk sammensetning omfattende det bispesifikke antigenbindende protein ifølge kravene 1-7, og minst én farmasøytisk akseptabel eksipient.
11. Det bispesifikke antigenbindende protein ifølge kravene 1-7, for behandling av cancer.
12. Anvendelse av det bispesifikke antigenbindende protein ifølge kravene 1-7, for fremstilling av et medikament for behandling av cancer.

Fig. 1

58

2/9

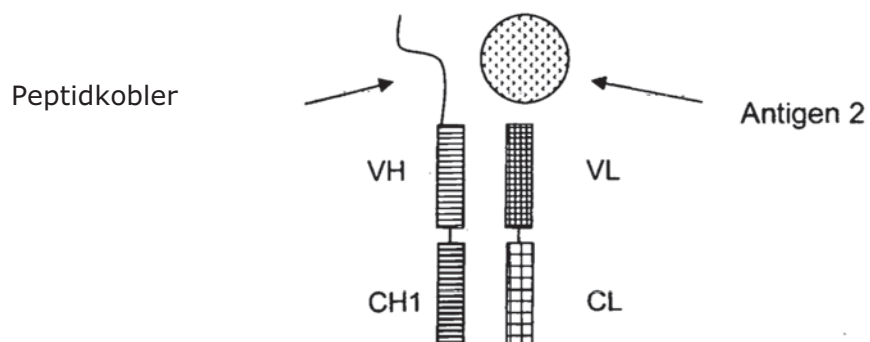
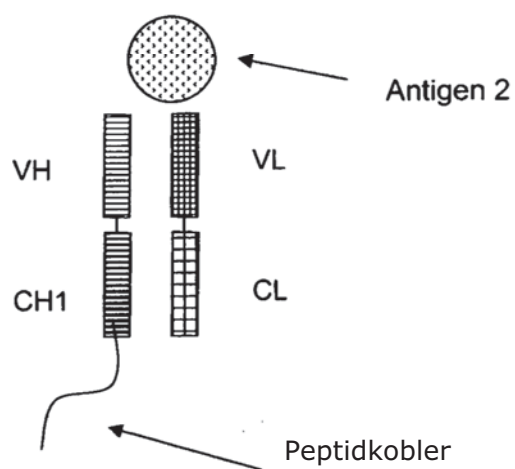
Fig. 2a**Fig. 2b**

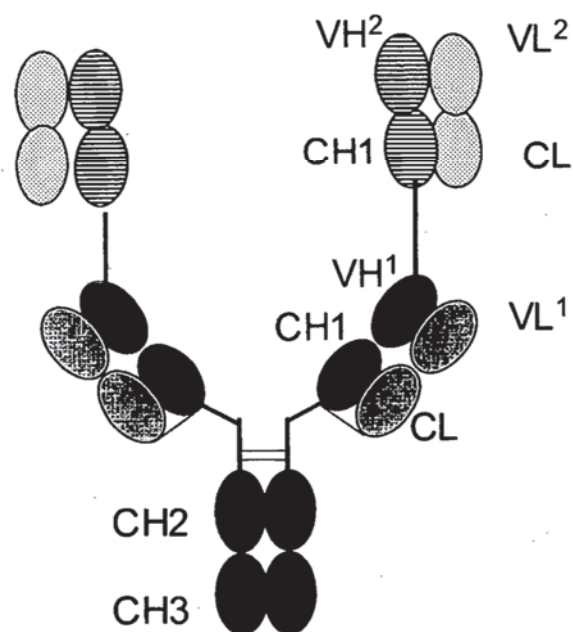
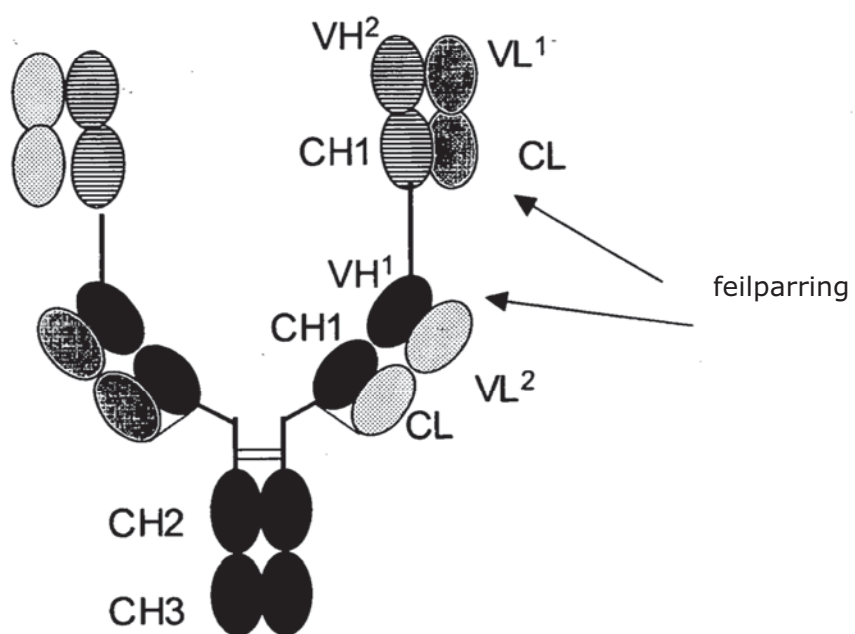
Fig. 3a**Fig. 3b**

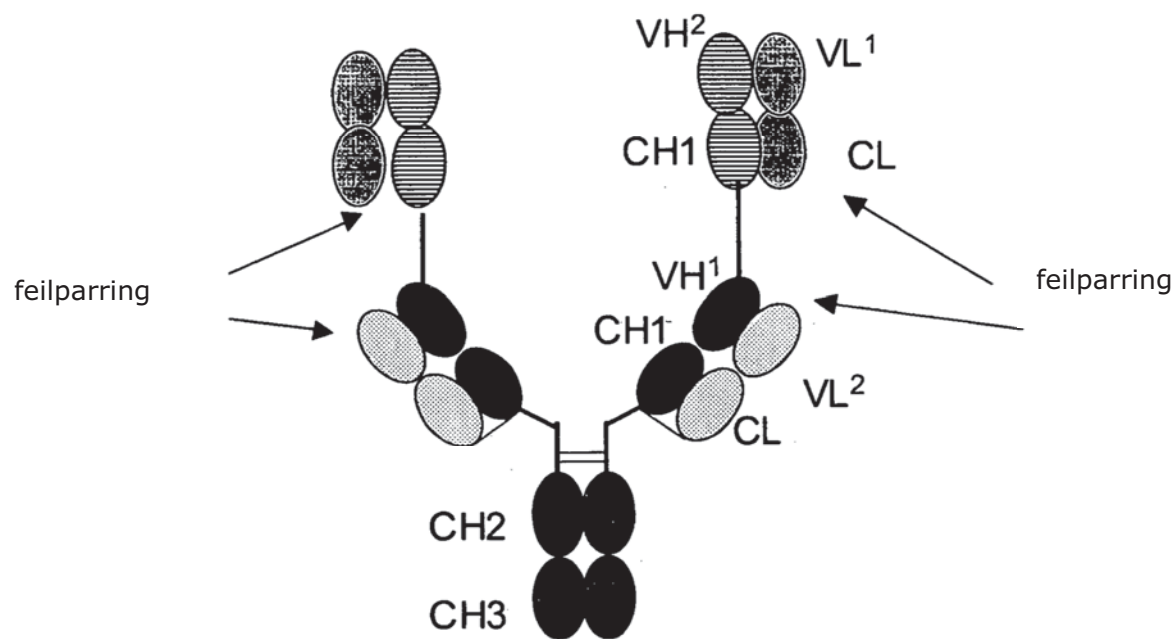
Fig. 3c

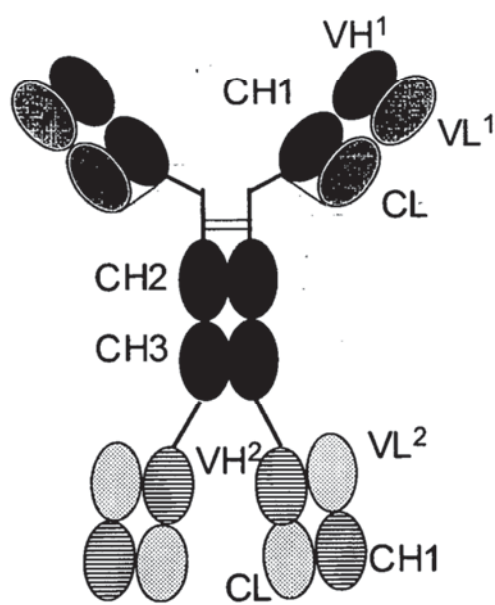
Fig. 4a

Fig. 4b

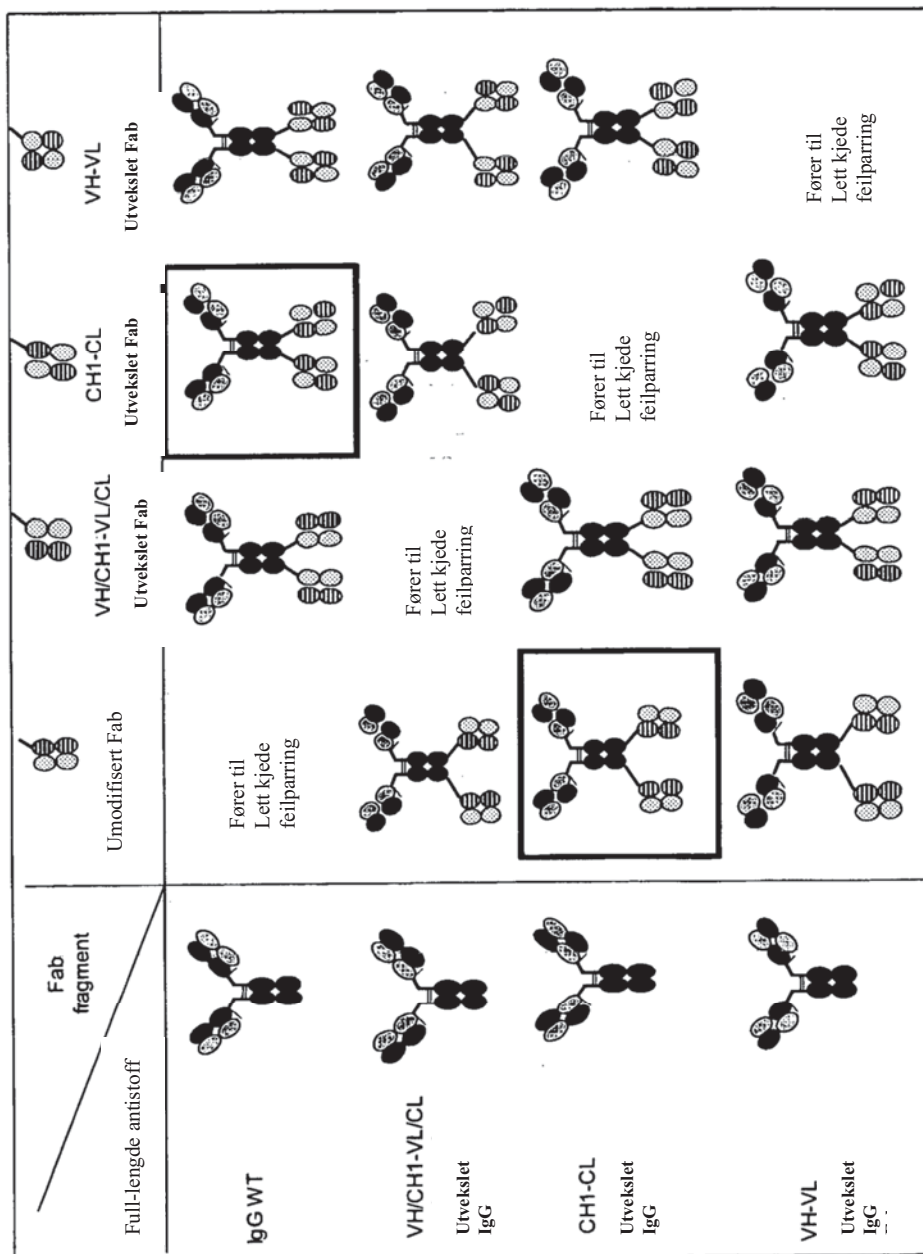


Fig. 4c

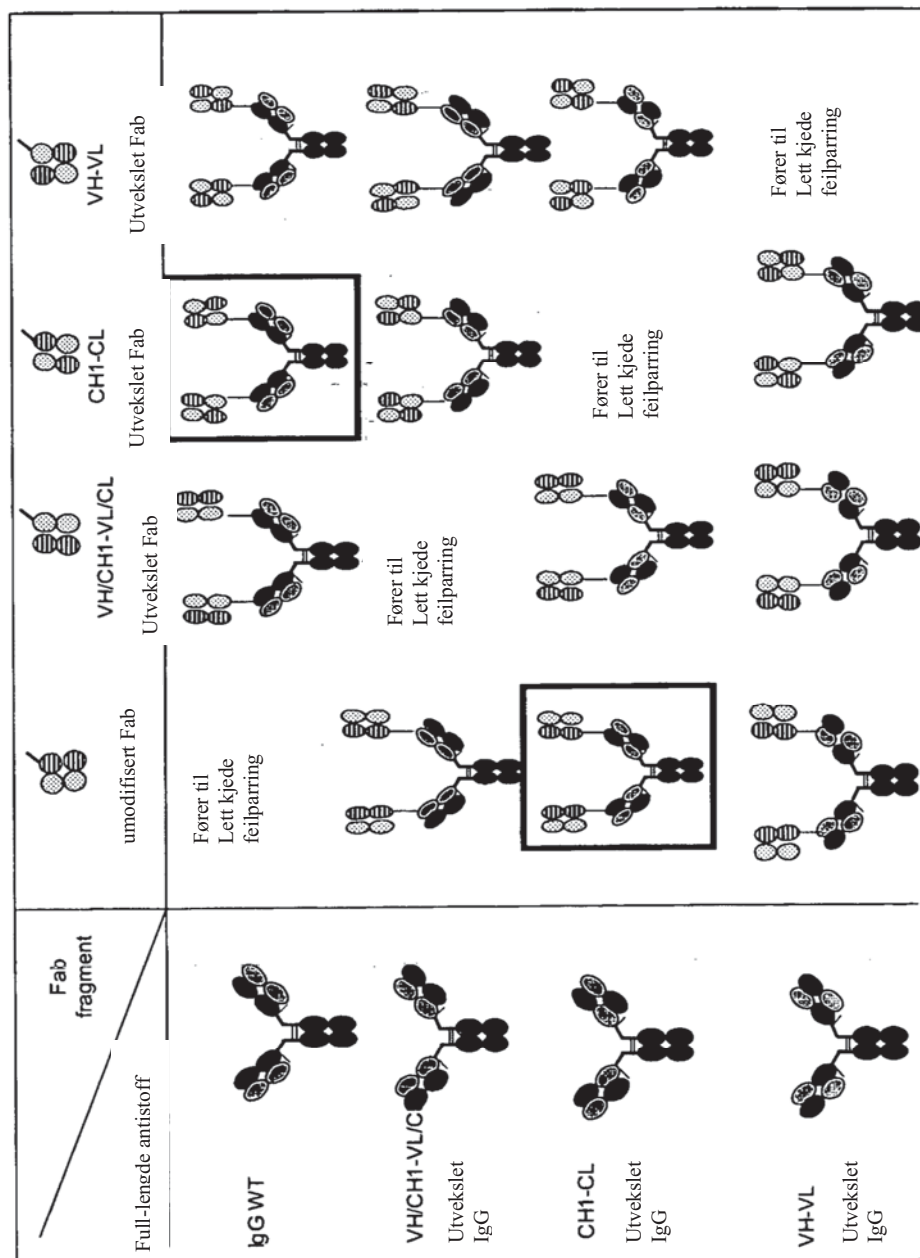


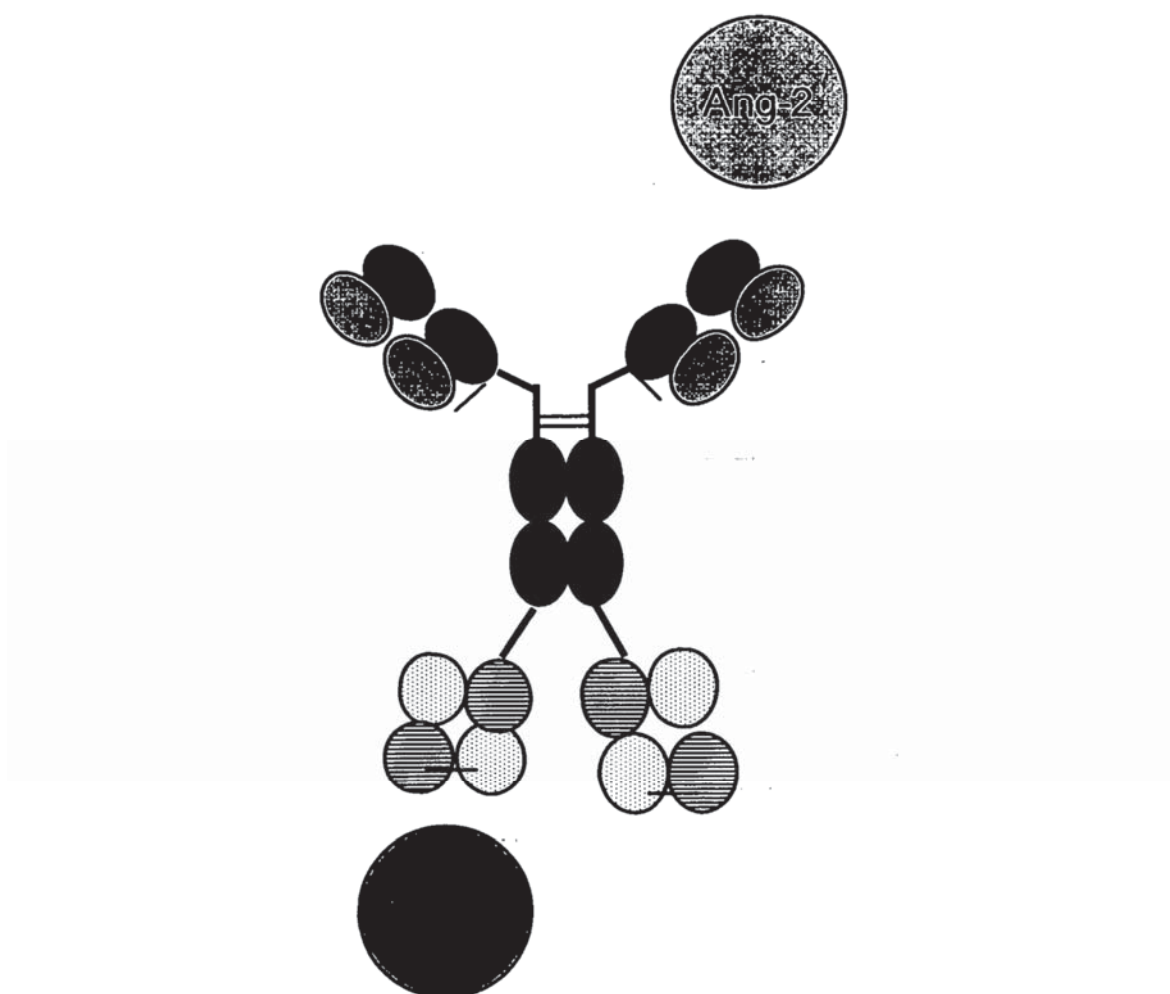
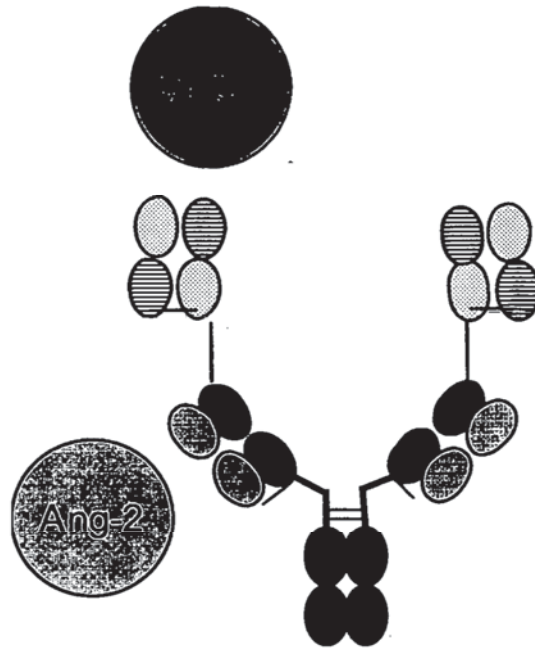
Fig. 5

Fig. 6**Fig. 7**