

(19) **DANMARK**



Patent- og
Varemærkestyrelsen

(10) **DK/EP 2504359 T3**

(12) **Oversættelse af
europæisk patentskrift**

-
- (51) Int.Cl.: **C 07 K 16/00 (2006.01)** **C 07 K 16/18 (2006.01)** **C 07 K 16/46 (2006.01)**
- (45) Oversættelsen bekendtgjort den: **2016-07-25**
- (80) Dato for Den Europæiske Patentmyndigheds bekendtgørelse om meddelelse af patentet: **2016-03-23**
- (86) Europæisk ansøgning nr.: **10798744.8**
- (86) Europæisk indleveringsdag: **2010-11-24**
- (87) Den europæiske ansøgnings publiceringsdag: **2012-10-03**
- (86) International ansøgning nr.: **EP2010068134**
- (87) Internationalt publikationsnr.: **WO2011064257**
- (30) Prioritet: **2009-11-27 DE 102009047243**
- (84) Designerede 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 RS SE SI SK SM TR**
- (73) Patenthaver: **Orgentec Diagnostika GmbH, Carl-Zeiss-Strasse 49, 55129 Mainz, Tyskland**
- (72) Opfinder: **POPPE, Robert, Bebelstrasse 48, 55128 Mainz, Tyskland**
- (74) Fuldmægtig i Danmark: **Chas. Hude A/S, H.C. Andersens Boulevard 33, 1780 København V, Danmark**
- (54) Benævnelse: **MONOSPECIFIKKE POLYPEPTIDREAGENSER**
- (56) Fremdragne publikationer:
EP-A1- 1 757 622
WO-A1-2007/062466
WO-A1-2008/131252
WO-A1-2009/135627
WO-A2-01/51644
WO-A2-2007/109321
HUST MICHAEL ET AL: "Single chain Fab (scFab) fragment", BMC BIOTECHNOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD. LONDON, GB, Bd. 7, Nr. 1, 8. März 2007 (2007-03-08), Seite 14, XP021023594, ISSN: 1472-6750, DOI: DOI:10.1186/1472-6750-7-14
LE GALL F ET AL: "Immunosuppressive properties of anti-CD3 single-chain Fv and diabody", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, Bd. 285, Nr. 1, 1. Februar 2004 (2004-02-01), Seiten 111-127, XP004489671, ISSN: 0022-1759, DOI: DOI:10.1016/J.JIM.2003.11.007
MULLER K M ET AL: "The first constant domain (CH1 and CL) of an antibody used as heterodimerization domain for bispecific miniantibodies", FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 422, Nr. 2, 30. Januar 1998 (1998-01-30), Seiten 259-264, XP004261818, ISSN: 0014-5793, DOI: DOI:10.1016/S0014-5793(98)00021-0
SHAO CHANGLI ET AL: "The expression and characterization of a bifunctional protein in E. coli for autologous erythrocyte agglutination test.", CELLULAR & MOLECULAR IMMUNOLOGY AUG 2008 LNKD-PUBMED:18761818, Bd. 5, Nr. 4, August 2008 (2008-08), Seiten 299-306, XP002627304, ISSN: 1672-7681
LONG M C ET AL: "Construction and characterization of monoclonal antibodies against western equine

Fortsættes ...

- encephalitis virus.", HYBRIDOMA APR 2000 LNKD- PUBMED:10868791, Bd. 19, Nr. 2, April 2000 (2000-04),
Seiten 121-127, XP002627305, ISSN: 0272-457X
- TINCANI A ET AL: "Minimal requirements for antiphospholipid antibodies ELISAs proposed by the European
Forum on antiphospholipid antibodies", THROMBOSIS RESEARCH, TARRYTOWN, NY, US, Bd. 114, Nr. 5-6, 1.
Januar 2004 (2004-01-01), Seiten 553-558, XP004613201, ISSN: 0049-3848, DOI:
DOI:10.1016/J.THROMRES.2004.06.035
- DÜBEL ET AL.: "Rekombinante Antikörper - Werkzeuge gegen Krebs, Infektionen und
Autoimmunerkrankungen ?", BIOLOGIE IN UNSERER ZEIT, Bd. 34, Nr. 6, Dezember 2004 (2004-12), Seiten 372-
379, XP002640338, Weinheim in der Anmeldung erwähnt
- NIEBA L ET AL: "Disrupting the hydrophobic patches at the antibody variable/constant domain interface:
Improved in vivo folding and physical characterization of an engineered scFv fragment", PROTEIN
ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 10, Nr. 4, 1. Januar 1997 (1997-01-01) , Seiten
435-444, XP002249462, ISSN: 0269-2139, DOI: DOI:10.1093/PROTEIN/10.4.435
- OLAFSEN TOVE ET AL: "Characterization of engineered anti-p185HER-2 (scFv-CH3)₂ antibody fragments
(minibodies) for tumor targeting", PROTEIN ENGINEERING, DESIGN AND SELECTION, OXFORD JOURNAL,
LONDON, GB, Bd. 17, Nr. 4, 1. April 2004 (2004-04-01), Seiten 315-323, XP002484237, ISSN: 1741-0126, DOI:
DOI:10.1093/PROTEIN/GZH040
- ICHIKAWA K ET AL: "A chimeric antibody with the human gamma1 constant region as a putative standard for
assays to detect IgG beta2-glycoprotein I-dependent anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies.",
ARTHRITIS AND RHEUMATISM NOV 1999 LNKD- PUBMED:10555042, Bd. 42, Nr. 11, November 1999 (1999-11),
Seiten 2461-2470, XP002640339, ISSN: 0004-3591
- SAZINSKY STEPHEN L ET AL: "Aglycosylated immunoglobulin G1 variants productively engage activating Fc
receptors", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF
SCIENCES, Bd. 105, Nr. 51, 23. Dezember 2008 (2008-12-23), Seiten 20167-20172, XP009143223, ISSN: 0027-
8424, DOI: DOI:10.1073/PNAS.0809257105
- WU A M ET AL: "Multimerization of a chimeric anti-CD20 single-chain Fv-Fc fusion protein is mediated through
variable domain exchange", PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 14, Nr.
12, 1. Januar 2001 (2001-01-01), Seiten 1025-1033, XP002982160, ISSN: 0269-2139, DOI:
DOI:10.1093/PROTEIN/14.12.1025
- LI ERQIU ET AL: "Mammalian cell expression of dimeric small immune proteins (SIP)", PROTEIN
ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 10, Nr. 6, 1. Januar 1997 (1997-01-01) , Seiten
731-736, XP002252049, ISSN: 0269-2139, DOI: DOI:10.1093/PROTEIN/10.6.731
- A. Schouten: "Plantibodies : requirements for expression and subcellular targeting", , 1998, XP002640340,
Gefunden im Internet: URL:[http://library.wur.nl/WebQuery/wda/lan g?dissertatie/nummer=2513](http://library.wur.nl/WebQuery/wda/lan%20g?dissertatie/nummer=2513) [gefunden am
2011-06-07]

Beskrivelse

Den foreliggende opfindelse angår en ny antigen-bindende proteinkonstruktion eller „modubody“, der indeholder mindst tre funktionelle enkelt-domænemoduler i et antistof. Modubodies indeholder et domæne fra den variable tungkædere-region af et antistof (VH), et domæne fra den variable letkædere-region af et antistof (VL) og binder sig monospecifikt til et antigen. Desuden indeholder modubodies et domæne fra den konstante region af antistoffer. Modubodies kan anvendes til diagnostiske eller terapeutiske formål.

10

Opfindelsens baggrund

Antistofstruktur

Antistoffer er plasmaglycoproteiner, der består af flere polypeptidkæder, der er forbundet ved hjælp af disulfidbroer. Et standardantistof består af to identiske tunge immunglobulin (Ig)-kæder og to identiske lette kæder. Begge antistofkæder består af forskellige ca. 110 aminosyrerester lange proteindomæner, der er opbygget i form af en karakteristisk immunglobulinfoldning af β -foldebade. Den tunge kæde består af et variabelt (VH) domæne og tre eller fire konstante domæner (CH1, CH2, CH3, CH4). Den lette kæde består af et variabelt (VL) og et konstant (CL) domæne. De variable andele af den tunge og den lette kæde, særligt de hypervariable komplementaritetsbestemmende regioner (CDR) medvirker til antigenspecificitet. Immunsystemet leverer en stor diversitet af antistoffer mod vidt forskellige antigener. Antistoffer kan tilordnes forskellige klasser, f.eks. IgM, IgA, IgG, IgE, IgD.

25

Antistoffragmenter og substrukturer

Antistoffragmenter kan opnås gennem enzymatisk spaltning eller ved hjælp af rekombinante fremgangsmåder. Et Fab-fragment, der er forsynet med antisofidentifikationsfunktionen indeholder, forbundet med hinanden via disulfidbroer, VH-CH1-domænerne fra den tunge kæde og VL-CL-domænerne fra den lette kæde, mens Fv-fragmentet kun omfatter de variable regioner fra den tunge og den lette kæde. Disse fragmenter, der består af flere proteinunderenheder, kan imidlertid kun vanskeligt fremstilles i biologisk aktiv form

med et tilfredsstillende udbytte (Read et al. (2007), Appl. Environ. Microbiol. 73: 5088-96).

5 Et enkeltkædet Fv-fragment (scFv) udgør en lille ca. 28 kDa tung antigenbindende substruktur i form af en kovalent kobling af VH- og VL-domæner via en peptidlinker (Hu et al. (1996), Cancer Res 56: 3055-61). Foldningeffektiviteten, den undertiden manglende stabilitet og toksiciteten ved disse strukturer begrænser imidlertid ofte udbyttet ved fremstillingen af biologisk aktive scFv i bakterielle ekspressionssystemer (Nieba et al. (1997), Protein Eng 10: 435-44).

10

Som Minibody (mini-antistof) betegnes et ca. 75 kDa tungt kimært molekyle fra et scFv og en hinge-region fra den tunge kæde fusioneret med CH3-domænet, der understøttet af CH3-domænet sammenlagres med et bivalent molekyle, der er forbundet kovalent via disulfidbroer i hinge-regionen (Wu, EP0627932B1). CH3-domænet tjener i den forbindelse som dimeriseringsdomæne til fremstilling af homodimerer (jf. Dübel et al., Biol. Unserer Zeit, 34. Jg., Nr. 6, S. 372-379, 2004). Disse molekyler fremviser ved ekspression i *E. coli* imidlertid lave ekspressionsrater og proteolytisk nedbrydning i hinge-regionen. (Hu. et al. (1996), Cancer Research 56: 3055-61).

20

Ligesom Minibody har Diabody to antigenbindingssteder. I Diabody er VL- og VH-domæner i form af en polypeptidkæde forbundet til et divalent og bispecifikt molekyle (Hollinger et al. (1993), PNAS 90: 6444-48).

25 Monobodies udgør kimære antigenbindende polypeptider, der inden for en fibronektin type III-skabelon præsenterer hypervariable CDR-sløjfer (Koide, EP0985039B1). Disse molekyler tilvejebringer en værdifuld klasse af nye affinitetsreagenser. Ved transplantation af CDR-sløjfer til en heterolog fibronektinskabelon går imidlertid effektor- og detektionsfunktioner af naturligt forekommende antistoffer tabt.

30

Nanobodies består af enkeltkædede antigenbindende V_HH-domæner (variabelt domæne af et tungkæde-antistof) og beror på iagttagelsen af, at der ved kameler og lamaer forekommer naturlige og funktionelle antistoffer, der kun består af tunge

kæder (Caserman und Harmers, EP19930919098). Opløseligheden af humane VH-domæner (variable tungkæde-domæner) er imidlertid ofte indskrænket på grund af hydrofobe regioner, der i det intakte antistof interagerer med regioner fra den lette kæde (Barthelemy et al. (2007) J. Biol. Chem. 283: 3639-54).

5

EP 1 575 622 A1 angår bivalente antistofkonstrukter, der har et heterotetramert eller homodimert format, der stabiliseres af disulfidbroer.

Shao & Zhang (Cellular and Molecular Immunology, bind 5, nr. 4, side 299-306, 10 2008) beskriver ekspressionen og karakteriseringen af et bifunktionelt protein i *E coli* til en autolog erythrocyt-agglutineringsstest. Hvad angår det bifunktionelle protein, drejer det sig om et rekombinant fusionsprotein fra en ScFv (VH-linker-VL), der koder for anti-H-antigenet i det monoklonale antistof 2E8, og en HIV-1 gp41-antigenpeptid.

15

Li et al. (Protein Engineering, bind 10, nr. 6, side 731-736, 1997) beskriver ekspressionen af dimere små immunproteine (small immune proteins; SIP) i pattedyrsceller. Hvad angår SIP, drejer det sig om bivalente molekyler, der eventuelt er stabiliseret af disulfidbroer.

20

Antistoffer i immundiagnose

Der findes en lang række immunassayformater til i en biologisk prøve at bestemme tilstedeværelsen eller koncentrationen af et specifikt antistof, f.eks. mod 25 et patogen, et autoantigen eller et allergen. I reglen er disse assays indrettet til påvisning af en specifik antistofklasse eller en kombination af bestemte antistofklasser og anvender specifikke interne kontroller eller kalibratorer. Immunoassays, der eksempelvis er egnet til bestemmelse af humane antistoffer, indeholder i reglen en positivkontrol, en negativkontrol samt en indeksskalibrator 30 eller en klassificering af forskellige kalibratorkoncentrationer (standardrække) til udarbejdelse af en kalibreringskurve, med hvilken antistofkoncentrationer kan interpoleres i en prøve. Sædvanligvis fremstilles disse kontrol- og kalibreringsreagenser ved fortynding af seropositive plasmaer eller sera i et egnet fortyndingsmedium.

Eksempelvis præpareres kalibratorerne og kontrollerne til den isotypespecifikke bestemmelse af β 2-glycoprotein-autoantistoffer af serummet fra humane donorer, der indeholder høje koncentrationer af disse autoantistoffer fra klasserne IgG, IgM
5 og/eller IgA. Anvendelsen af humant seropositivt serum eller plasma til fremstilling af kontroller og kalibratører er imidlertid forbundet med en lang række ulemper som f.eks. vanskeligheden, der består i at tilvejebringe sådanne reagenser i store mængder og egnet kvalitet, forskelle i bindingskarakteristika ved forskellige serier, heterogen polyklonal specifitet, heterogen isotypesammensætning, forekomst af
10 patogener, omkostninger etc.

Da antistoffer med høj specifitet og affinitet binder sig til antigener, har de afgørende betydning inden for immundiagnose. Størrelsen af det naturlige antistofmolekyle og dets komplekse opbygning af flere polypeptidkæder med et
15 stort antal af inter- og intradomæner, tværbindinger via disulfidbroer samt glykosileringspositioner udgør en betydelig vanskelighed i forbindelse med konstruktionen og den rekombinante ekspression af specifikke antistoffer.

Hackett et al. (EP1018019 B1) præsenterer en fremgangsmåde til fremstilling af
20 reagenser til anvendelse som kalibratører og kontroller, hvor reagensen er et kimært monoklonalt antistof, der omfatter variable regioner af den tunge og lette kæde fra en første værtsart, fusioneret til de konstante regioner af den tunge og den lette kæde fra en anden værtsart, der svarer til værtsarten for antistoffet, der skal bestemmes. Fremstilling af disse arts-kimære monoklonale antistoffer
25 forudsætter imidlertid et omfattende teknisk arbejde, der er enestående inden for produktion af monoklonale antistoffer. Hackett nævner ganske vist den teoretiske mulighed for også at anvende polypeptider som kunstige kalibratører, der specifikt binder sig til en forudbestemt ligand og er fusioneret til en region af antistoffer fra de ønskede værtsarter. Hackett leverer imidlertid ingen fremgangsmåde, ved
30 hjælp af hvilken der kan opbygges enkeltkædede syntetiske polypeptidkalibratører.

Der er således et vedvarende behov for små, antistof-lignende molekyler, der identificerer et antigen specifikt, med antistoffer danner komplekser mod naturlige

immunglobuliner og kan fremstilles i stor mængde i bakterielle ekspressionssystemer.

Sammenfatning af opfindelsen

5

En genstand for opfindelsen er en fusionspolypeptid, der omfatter

(i) et første domæne, der omfatter den variable tungkædereion af et antistof (VH) eller i det mindste et afsnit heraf, der formidler antigenbindingen,

(ii) et andet domæne, der omfatter den variable letkædereion af et antistof (VL)

10 eller i det mindste et afsnit heraf, der formidler antigenbindingen, og

(iii) et tredje domæne, der omfatter et afsnit af en konstant tungkædereion af et antistof (CHX),

hvor domænet (iii) har en længde på 80-130 aminosyrerester og aminosyrepositioner,

15 hvis sidekæder svarende til konceptet for „knobs-into-holes“-anordningen har interaktioner, er modificeret,

hvor domænerne (i), (ii) og (iii) er forbundet med hinanden via peptidlinkere (L),

hvor peptidlinkerne (L) uafhængigt af hinanden har en længde på 25-45

aminosyrerester og udelukkende består af glycin- og/eller serinrester, og hvor

20 fusionspolypeptidet ikke danner intermolekylære disulfidbroer og ikke indeholder hinge-regioner af antistoffer.

En yderligere genstand for opfindelsen er en nukleinsyre, der koder for en fusionspolypeptid som angivet ovenfor.

25

Endnu en yderligere genstand for opfindelsen er en værtscelle, der indeholder en nukleinsyre ifølge opfindelsen.

Endnu en yderligere genstand for opfindelsen er en fremgangsmåde til fremstilling

30 af et fusionspolypeptid ved kultivering af en værtscelle ifølge opfindelsen og

udvinding af fusionspolypeptid fra cellen eller kultursupernatanten.

Yderligere aspekter ved den foreliggende opfindelse angår anvendelsen af fusionspolypeptider som reagenser i diagnostiske eller biokemiske test samt medicinske anvendelser af fusionspolypeptider, nukleinsyrer og værtsceller.

- 5 De ovenfor beskrevne fusionspolypeptider ifølge opfindelsen betegnes som „modubodies“.

Modubodies er konstruktioner, der består af domæner af de variable tunge (VH) og variable lette (VL) kæder i et antistof og en eller flere domæner af den

10 konstante region af den tunge kæde (CH1, CH2, CH3, CH4) i antistoffer, idet disse domæner af et antistof er koblet sammen med hinanden via egnede linkersekvenser i form af en lineær sekvens af funktionsmoduler, der er struktureret uafhængigt af hinanden. De enkelte domæner har en længde på 80-130 aminosyrer. Modubodies består af en enkelt polypeptidkæde og har et enkelt

15 antigenbindingssted, der dannes af domænerne VH og VL. Modubodies kan ikke danne intermolekylære disulfidbroer, således at de foreligger som monomerer. Modubodies har ingen hinge-regioner af antistoffer. De er dermed miniatureversioner af monovalente antistoffer, der i form af en enkelt proteinkæde kan fremstilles let og i store mængder i egnede ekspressionssystemer, f.eks.

20 bakterielle ekspressionssystemer. Modubodies er på grundlag af deres enkeltkædede struktur, deres begrænsede størrelse, den monoklonale sammensætning, deres lette fremstilling og deres stabilitet ideelle reagenser til biokemisk forskning, til anvendelse i diagnostiske assays og som helbredende midler.

25

En modubody er således et kimært molekyle med en typisk opbygning som på **figur 1**, der består af separate funktionsmoduler, der afledes af domæner af de variable tunge (VH) og variable lette (VL) kæder af et antistof og et eller flere domæner af den konstante region af den tunge kæde (CHX, f.eks. CH1, CH2, CH3 eller CH4) af antistoffer. De enkelte funktionsmodule, der er struktureret

30 uafhængigt af hinanden, er koblet sammen med hinanden i en lineær sekvens via egnede linkersekvenser (L).

Beskrivelse af tegningerne

Figur 1:

Skematisk opbygning af en udførelsesform for et fusionspolypeptid (modubody) ifølge opfindelsen, hvor **VL** udgør et domæne af den variable lette kæde, **VH** et domæne af den variable tunge kæde og **CHX** et domæne af den konstante region af den tunge kæde (CH1, CH2, CH3 eller CH4) af antistoffer. De enkelte domæner er forbundet med hinanden via heterologe, fleksible peptidlinkere **L** i en lineær sekvens.

Figur 2:

10 Karakterisering af bindingsreaktionen ved et scFv-CAD-reaktionsmodul til målet β 2-glycoprotein.

Til ELISA-detektion af den specifikke β 2-glycoprotein-bindingsaktivitet ved scFv-CAD-reaktionsmodulet blev der påført fortyndingsserier af scFv-CAD i den viste koncentration på mikrotiterplader, der var belagt med β 2-glycoprotein og til kontrol 15 med kvægserumalbumin (BSA). Bindingen blev bestemt med et peroxidase-markeret RGS-6X-His-antistof (Qiagen, Hilden) og en tetramethylbenzidin (TMB)-farvereaktion ved måling af O.D. 450.

Figur 3:

20 Karakterisering af stabiliteten af et scFv-CAD-reaktionsmodul over for temperaturstress.

A. For at kunne undersøge indflydelsen fra 50 °C temperaturstress på β 2-glycoprotein-bindingsaktiviteten ved CAD-scFv blev det rensede proteinmodul i en koncentration af 5 μ g/ml over et tidsrum på 0-180 minutter udsat for en temperatur 25 på 50 °C. Bindingen af scFv-CAD til β 2-glycoprotein blev i ELISA bestemt med et peroxidase-markeret RGS-6X-His-antistof og en TMB-farvereaktion ved måling af O.D. 450.

B. For at bestemme inaktiveringstemperaturen af scFv-CAD blev det rensede proteinmodul i en koncentration af 5 μ g/ml i et kalibratorfortyndingsmedium i 10 30 min udsat for en serie af temperaturer på 20 °C til 90 °C. Bindingen af scFv-CAD til β 2-glycoprotein blev i ELISA bestemt med et peroxidase-markeret RGS-6X-His-antistof og en TMB-farvereaktion ved måling af O.D. 450.

Figur 4:

Karakterisering af kalibratorfunktionen af en CAD-IgG-CH3 modubody ved binding til målet β 2-glycoprotein og detektion med et anti-human-IgG-peroxidase sekundært antistof. CAD-IgG-CH3 blev påført i den viste koncentration på mikrotiterplader, der var belagt med β 2-glycoprotein, og bindingen blev bestemt med et peroxidase-markeret anti-human-IgG-antistof (Jackson Immunoresearch) og en TMB-farvereaktion ved måling af O.D. 450.

Figur 5:

Karakterisering af stabiliteten af en CAD-IgG-CH3 modubody over for temperaturstress. Stabiliteten over for varrestress blev undersøgt, idet fortyndinger af CAD-IgG-CH3 modubody i de viste koncentrationer blev inkuberet i 60 minutter og 90 minutter ved 50 °C og blev undersøgt ved sammenligning med en ved rumtemperatur opbevaret fortyndingsserie i anti- β 2-glycoproteinimmunoassayet. I den forbindelse blev bindingen af CAD-IgG-CH3 modubody til β 2-glycoprotein bestemt med et peroxidase-markeret anti-human-IgG-antistof og en TMB-farvereaktion ved måling af O.D. 450.

Figur 6:

Karakterisering af stabiliteten af en CAD-IgG-CH3 modubody over for opbevaring ved 36 °C. Stabiliteten over for øget opbevaringstemperatur blev undersøgt, idet fortyndinger af CAD-IgG-CH3 modubody i de viste koncentrationer blev inkuberet i 1, 2, 4, 7, 10 dage ved 36 °C og blev undersøgt ved sammenligning med en fortyndingsserie, der blev opbevaret ved 4 °C, i anti- β 2-glycoproteinimmunassayet. I den forbindelse blev bindingen af CAD-IgG-CH3 modubody til β 2-glycoproteinet bestemt med et peroxidase-markeret anti-human-IgG antistof og en TMB-farvereaktion ved måling af O.D. 450.

Figur 7:

Karakterisering af stabiliteten af en CAD-IgG-CH3 modubody over for indtørring. Stabiliteten over for indtørring blev undersøgt, idet fortyndinger af CAD-IgG-CH3 modubody blev tørret i en Speedvak-anordning under vakuum ved 22 °C og efterfølgende blev gensolubiliseret til de viste koncentrationer. Derefter blev bindingen af den gensolubiliserede CAD-IgG-CH3 modubody til β 2-glycoprotein

bestemt med et peroxidase-markeret anti-human-IgG-antistof og en TMB-farvereaktion ved måling af O.D. 450.

Figur 8:

- 5 Karakterisering af stabiliteten af en CAD-IgG-CH3 modubody over for gentagne nedfrysnings-optøningscyklusser. Stabiliteten over for gentagne nedfrysnings-optøningscyklusser blev undersøgt, ved at fortyndinger af CAD-IgG-CH3 modubody blev nedfrosset i fem gentagne nedfrysnings-optøningscyklusser ved -
- 70 °C og optøet igen ved 37 °C og efterfølgende blev undersøgt med de viste
- 10 koncentrationer i anti-β2-glycoproteinimmunassayet. I den forbindelse blev bindingen af CAD-IgG-CH3 modubody til β2-glycoproteinet bestemt med et peroxidase-markeret anti-human-IgG-antistof og en TMB-farvereaktion ved måling af O.D. 450.

15 **Figur 9:**

- Karakterisering af kalibratorfunktionen af CAD-IgG-CH2-modubody ved binding til målet β2-glycoprotein og detektion med et anti-human-IgG-peroxidase sekundært antistof. CAD-IgG-CH2 blev påført i den viste koncentration på mikrotiterplader, der var blevet belagt med β2-glycoprotein i kompleks med cardiolipin, og
- 20 bindingen blev bestemt med et peroxidase-markeret anti-human-IgG-antistof (Jackson Immunoresearch) og en TMB-farvereaktion ved måling af O.D. 450 nm.

Figur 10:

- Karakterisering af stabiliteten af CAD-IgG-CH2-modubody over for indtørring.
- 25 Stabiliteten over for indtørring blev undersøgt, idet fortyndinger af CAD-IgG-CH2-modubody blev indtørret i en Speedvak-anordning under vakuum ved 22 °C og efterfølgende blev gensolubiliseret til de viste koncentrationer. Derefter blev bindingen af den gensolubiliserede CAD-IgG-CH2-modubody til β2-glycoprotein bestemt med et peroxidase-markeret anti-human-IgG-antistof og en TMB-
- 30 farvereaktion ved måling af O.D. 450 nm.

Figur 11:

Karakterisering af stabiliteten af CAD-IgG-CH2-modubody over for gentagne nedfrysnings-optøningscyklusser. Stabiliteten over for gentagne nedfrysnings-

optøningscyklusser blev undersøgt, ved at fortyndinger af CAD-IgG-CH2-modubodies i fem gentagne nedfrysningsoptøningscyklusser blev nedfrosset ved -70 °C og optøet igen ved 37 °C og efterfølgende blev undersøgt med de viste koncentrationer på mikrotiterplader, der var belagt med β 2-glycoprotein i kompleks med cardiolipin. I den forbindelse blev bindingen af CAD-IgG-CH2-modubody til β 2-glycoprotein bestemt med et peroxidase-mærket anti-human-IgG-antistof og en TMB-farvereaktion ved måling af O.D. 450 nm.

Figur 12:

Karakterisering af kalibratorfunktionen af den multifunktionelle CAD-IgM-IgA-IgG-modubody ved binding til målet β 2-glycoprotein og separat detektion med de isotypespecifikke anti-human-IgM-, Anti-human-IgA- og anti-human-IgG-peroxidase sekundære antistoffer. CAD-IgM-IgA-IgG blev påført i den viste koncentration på mikrotiterpladen, der var belagt med β 2-glycoprotein i kompleks med cardiolipin, og bindingen blev bestemt ved separate bestemmelser med isotypespecifikke peroxidase-mærkede anti-human-IgM-, anti-human-IgA- og anti-human-IgG-antistoffer (Jackson ImmunoResearch) og en TMB-farvereaktion ved måling af O.D. 450 nm.

Figur 13:

Karakterisering af stabiliteten af CAD-IgM-IgA-IgG-modubody over for indtørring. Stabiliteten over for indtørring blev undersøgt, ved at fortyndinger af CAD-IgM-IgA-IgG-modubody blev tørret i en Speedvak-anordning under vakuum ved 22 °C og efterfølgende blev gensolubiliseret til de viste koncentrationer. Derefter blev bindingen af den gensolubiliserede CAD-IgM-IgA-IgG-modubody til β 2-glycoprotein bestemt ved separate bestemmelser med isotypespecifikke peroxidase-mærkede anti-human-IgM-, anti-human-IgA- og anti-human-IgG-antistoffer (Jackson ImmunoResearch) og en TMB-farvereaktion ved måling af O.D. 450nm.

30

Figur 14:

Karakterisering af stabiliteten af CAD-IgM-IgA-IgG-modubody over for gentagne nedfrysningsoptøningscyklusser. Stabiliteten over for gentagne nedfrysningsoptøningscyklusser blev undersøgt, ved at fortyndinger af CAD-IgM-IgA-IgG-

modubody i fem gentagne nedfrysningsoptøningscyklusser blev nedfrosset ved -70 °C og optøet igen ved 37 °C og efterfølgende blev undersøgt med de viste koncentrationer på mikrotiterplader, der var belagt med β 2-glycoprotein i kompleks med cardiolipin. Derefter blev bindingen af CAD-IgM-IgA-IgG-modubody til β 2-glycoprotein bestemt ved separate bestemmelser med isotypespecifikke peroxidase-markerede anti-human-IgM-, anti-human-IgA- og anti-human-IgG-antistoffer (Jackson Immunoresearch) og en TMB-farvereaktion ved måling af O.D. 450nm.

10 **Figur 15:**

Karakterisering af bindingsreaktionen ved CAD-IgG-CH3-Knob02-modubody til målet β 2-glycoprotein. Til ELISA detektion af den specifikke β 2-glycoprotein-bindingssaktivitet ved CAD-IgG-CH3-Knob02-modubody blev der påført fortyndingsserier af CAD-IgG-CH3-Knob02 i den viste koncentration på mikrotiterplader, der var belagt med β 2-glycoprotein og til kontrol med kvægserumalbumin (BSA). Bindingen blev bestemt med et peroxidase-mærket RGS-6X-His-antistof (Qiagen, Hilden) og en tetramethylbenzidin (TMB)-farvereaktion ved måling af O.D. 450nm.

20 Udførlig beskrivelse af opfindelsen

Hidtidige fremgangsmåder til fremstilling af antistoffer, antistoffragmenter og små antistofflignende molekyler har en lang række begrænsninger med hensyn til muligheden for at fremstille disse med lave omkostninger i biologisk aktiv form.

25

Hidtidige fremgangsmåder til fremstilling af kalibratorer og standardmaterialer til diagnostiske assays indebærer en lang række ulemper med hensyn til disponibilitet, ensartede bindings- og stabilitetskarakteristika, sikring af fravær af patogener og fremstillingsomkostninger. Disse indskrænkninger og ulemper afhjælpes med den foreliggende opfindelse. Derudover er der et vedvarende behov for små antistof-lignende molekyler, der identificerer et antigen specifikt og danner komplekser med antistoffer mod naturlige immunglobuliner.

30

Den foreliggende beskrivelse muliggør fremstilling af monospecifikke polypeptidreagenser - „modubodies“ – til biokemisk forskning, til anvendelse i diagnostiske assays eller som bestanddel af lægemidler.

En modubody er en kimær enkeltkædet fusionspolypeptid, der består af mindst tre domæner, nemlig et første domæne fra den variable tungkædere region af et antistof (VH), et andet domæne fra den variable letkædere region af et antistof (VL) og et tredje domæne, der omfatter et delafsnit af en konstant tungkædere region af et antistof (CHX). De enkelte domæner er forbundet med hinanden via egnede peptidlinkere. Modubodyen er monovalent, dvs. den har et enkelt antigenbindingssted.

De præsenterede modubodies har eksempelvis en struktur (begyndende ved N-terminus) som følger:

VH - L - VL - L - CHX eller

VL - L - VH - L - CHX,

hvor VH er den variable tungkædere region af et antistof eller i det mindste et afsnit heraf, der formidler antigenbindingen, VL er den variable letkædere region af et antistof eller i det mindste et afsnit heraf, der formidler antigenbindingen, L er en peptidlinker og CHX er et domæne, der omfatter et delafsnit af en konstant tungkædere region af et antistof. CHX kan eksempelvis vælges fra afsnittene CH1, CH2, CH3 og CH4 fra den konstante tungkædere region af antistoffer, fortrinsvis af antistoffer fra klasserne IgG, IgM, IgE og IgA, særligt foretrukket af humane antistoffer fra klasserne IgG, IgM, IgE og IgA. Foretrukne eksempler på domæne CHX er IgG-CH1, IgG-CH2, IgG-CH3, IgA-CH2, IgA-CH3, IgM-CH2, IgM-CH3 og IgM-CH4, særligt fra de respektive humane antistoffer.

Det første domæne (VH) og det andet domæne (VL) danner sammen med hinanden antigenbindingsstedet (bindingsmodul). De vælges fortrinsvis på en sådan måde, at de begge stammer fra et enkelt oprindeligt antistof. Dette oprindelige antistof er et vilkårligt monoklonalt antistof, f.eks. et monoklonalt antistof fra en ikke-human pattedyrsart (f.eks. rotte, mus eller kanin), et humant antistof eller et humaniseret antistof.

Modubodyen kan være indrettet til et antigen efter ønske, eksempelvis et diagnostisk eller terapeutisk relevant antigen. Foretrukne eksempler på specifikke

antigener er β 2-glycoprotein, phosphatidylserin, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF-A), Tumor Necrosis Factor (TNF-alpha), Smoothed Homolog (SMO), Protein Patched Homolog (PTC1), B-Lymphocyte Antigen (CD20), Cytotoxic T-Lymphocyte Protein 4 (CTLA4), Amyloid beta A4 Protein (APP),
 5 Presenilin-1 (PS1), CC-Chemokine Receptor (CCR-5), Telomer Repeat-binding Factor 1 (TRF1) og Toll-like Receptors (TLR1-10).

Det første og det andet domæne af polypeptidet ifølge opfindelsen kan indeholde de fuldstændige variable tung- eller letkædereioner af et antistof eller i det
 10 mindste et afsnit heraf, der formidler antigenbindingen. Fortrinsvis indeholder domænerne i det mindste regionerne CDR1, CDR2 og CDR3 i den pågældende tung- eller letkædereion fuldstændigt og i det mindste dele af de tilsvarende framework-regioner FR1, FR2, FR3 og FR4. Længden af domænerne VH og VL udgør mindst 80, mindst 90 eller mindst 100 aminosyrerester og op til 110 eller op
 15 til 120 aminosyrerester.

Fusionspolypeptidet ifølge opfindelsen indeholder i det mindste et domæne, der omfatter et afsnit af en konstant tungkædereion af et antistof (CHX). Fortrinsvis ligger domæne henholdsvis domænerne af den tredje type C-terminalt i forhold til
 20 VH- og VL-domænerne. Et tredje domæne kan indeholde et fuldstændigt afsnit af en konstant tungkædereion eller et delafsnit heraf, der giver fusionspolypeptidet en tilstrækkelig strukturel stabilitet. Længden af et tredje domæne udgør mindst 80, mindst 90 eller mindst 100 aminosyrerester og op til 110, op til 120 eller op til 130 aminosyrerester. Fusionspolypeptidet kan eventuelt indeholde flere domæner
 25 af den tredje type, der er ens eller forskellige, f.eks. 2, 3 eller 4. Hvis der foreligger flere domæner af den tredje type, er disse hver især forbundet med hinanden via peptidlinkere og fortrinsvis placeret ved fusionspolypeptidets C-terminus.

Eksempler på den strukturelle opbygning af fusionspolypeptider ifølge opfindelsen med 2 (eller 3) domæner af den tredje type er som følger:

30
 VH - L - VL - L - CHX1 - L - CHX2 (-L-CHX3) eller
 VL - L - VH - L - CHX1 - L - CHX2 (-L-CHX3),

hvor VH, L og VL er defineret som ovenfor og CHX1, CHX2 og CHX3 hver især er et tredje domæne CHX som defineret ovenfor.

- Fusionspolypeptidet indeholder domæner af en første, anden og tredje type, der
- 5 hver især er forbundet med hinanden via peptidlinkere (L). Disse peptidlinkere består af sekvenser, der er heterologe i forhold til aminosyresekvenser af domænerne af første, anden og tredje type sind henholdsvis af sekvenser, der ikke foreligger i naturlige immunglobuliner. Peptidlinkerne, der forbinder de enkelte domæner med hinanden, kan i hvert enkelt tilfælde være ens eller forskellige.
- 10 Peptidlinkerne har uafhængigt af hinanden en længde på 25-45 og særligt foretrukket på 30-40 aminosyrerester. Desuden er peptidlinkerne fleksible linkere uden sekundærstruktur. Peptidlinkerne er sammensat udelukkende af glycin- og/eller serinrester. Særligt egnet er peptidlinkerne, der indeholder flere sekvenser af sekvens SGGGG. Et særligt foretrukket eksempel på en peptidlinker er vist i
- 15 SEQ ID NO: 3. Der kan eventuelt også foreligge linkersekvenser ved fusionspolypeptidets N- og/eller C-terminus.

- Foruden domænerne (i), (ii) og (iii) samt peptidlinkerne, der er placeret mellem domænerne, kan fusionspolypeptidet eventuelt indeholde yderligere
- 20 sekvensafsnit, eksempelvis et signalpeptidafsnit, der er placeret ved N- og/eller C-terminus og letter ekspressionen og/eller sekretionen af polypeptidet. Desuden kan fusionspolypeptidet indeholde et eller flere yderligere ikke-immunglobulin-domæner, f.eks. påvisnings- eller identifikationsdomæner, dvs. peptidsekvenser (tags), der er egnet til påvisning eller identifikation af fusionspolypeptidet, f.eks. et
- 25 FLAG-epitop eller en poly-his-sekvens. Desuden kan fusionspolypeptidet eventuelt også indeholde et eller flere ikke-immunglobulin-effektordomæner. De yderligere domæner er – såfremt de forefindes – fortrinsvis forbundet med den resterende fusionspolypeptid via en peptidlinker, f.eks. en peptidlinker som defineret ovenfor.
- 30 Særligt foretrukne eksempler på fusionspolypeptider ifølge opfindelsen indeholder et eller flere domæner VH, VL og/eller CHX som defineret ovenfor, der har en identitet på aminosyreniveau på mindst 90 %, fortrinsvis på mindst 95 % i forhold til de tilsvarende domæner iht. SEQ ID NO: 1 (VL), SEQ ID NO: 2 (VH), SEQ ID NO: 4 (VH, VL), SEQ ID NO: 8 (IgG-CH1), SEQ ID NO: 10 (IgG-CH2), SEQ ID

NO: 12 (IgG-CH3), SEQ ID NO: 14 (IgA-CH2), SEQ ID NO: 16 (IgA-CH3), SEQ ID NO: 18 (IgM-CH2), SEQ ID NO: 20 (IgM-CH3) eller SEQ ID NO: 22 (IgM-CH4).

Fusionspolypeptidet ifølge opfindelsen kan eventuelt indbefatte en eller flere
5 modifikationer i forhold til den naturlige sekvens af de deri indeholdte VH-, VL- og CHX-domæner. Således kan eksempelvis mindst en asparaginrest ved en glykosileringsposition, f.eks. i et CHX-domæne, være erstattet af en anden aminosyrerest, fortrinsvis serin, alanin eller glycin. Derudover kan eventuelt mindst
10 en cysteinrest, f.eks. i et CHX-domæne, der ikke danner en disulfidbro med en anden cysteinrest, der forefindes i det pågældende domæne, og derfor potentielt bevirker dannelsen af intermolekylære disulfidbroer, være erstattet af en anden aminosyrerest, fortrinsvis serin, alanin eller glycin.

Modubodies ifølge opfindelsen er kunstige monospecifikke antistoflignende
15 molekyler, der i form af en enkelt proteinkæde kan fremstilles let og i store mængder i egnede ekspressionssystemer, f.eks. bakterielle ekspressionssystemer. Som reagenser for biokemiske eller diagnostiske assays kan modubodies binde specifikt via et bindingsmodul (VH + VL) og påvises specifikt via et reaktionsmodul (CHX) med arts- og isotypespecifikke sekundære
20 antistoffer. En sekvens af flere reaktionsmoduler (f.eks. CHX1 og CHX2 eller CHX og en ikke-immunglobulin-påvisnings- eller identifikationsdomæne) muliggør detektion med forskellige reagenser, f.eks. med forskellige arts- eller isotypespecifikke sekundære antistoffer. Som reagenser for terapeutiske
funktioner kan modubodies via et bindingsmodul binde sig specifikt til et antigen
25 på en målstruktur og via et reaktionsmodul (CHX) eller en serie af reaktionsmoduler (f.eks. CHX1 og CHX2 eller CHX og et ikke-immunglobulin-effektordomæne) udøve specifikke effektorfunktioner.

CHX-domæner, der potentielt kan danne dimerer, bliver modificeret på en sådan
30 måde, at en dimerisering kan udelukkes og modubodies foreligger monovalent.

Aminosyrepositioner, hvis sidekæder har interaktioner svarende til konceptet for „knobs-into-holes“-anordningen (Crick, F.H.C. (1952), Nature, 170: 882-883), modificeres.

Således kan aminosyrepositioner, hvis sidekæder udformer kontakter på grænsefladen af IgG₁-CH3-dimerer (Ridgway J.B.B et al. (1996), Protein Engineering, 9: 617-621), modificeres på en sådan måde, at der på over for

5 hinanden liggende kontaktsteder i IgG-CH3-dimeren foreligger voluminøse aminosyresidekæder og en dimerisering blokeres sterisk af denne „knob-knob“-position. Interaktionen mellem de kontakterende aminosyresidekæder i to IgG₁-CH3-domæner kan eksempelvis blokeres ved udskiftning af

10 aminosyrepositionerne Threonin 366, Threonin 394, Phenylalanin 405 med Tyrosin i position 366, 394 og 405 (nummereringsskema svarende til Kabat EU Index (Kabat et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest* 5 th Edition, NIH Publication 91-3242).

Modubodies ifølge opfindelsen udmærker sig desuden ved en overraskende

15 stabilitet, f.eks. stabilitet over for temperaturstress eller stabilitet over for tørrings-/rekonstitutions- eller nedfrysnings-/optøningscyklusser. Således bevares, i forhold til en ubehandlet prøve, også i fortyndede opløsninger (5 µg/ml) af modubodies over 90 % af antigenbindingsaktiviteten efter 10 dages inkubation ved 36 °C eller efter tørring og rekonstitution eller efter nedfrysnings-/optøningscyklusser, der er

20 gentaget 5 gange.

de novo konstruktion af en modubody omfatter fortrinsvis følgende trin:

a) valg af rumligt afgrænsede domæner fra immunglobuliner med kendt eller modelleret rumlig struktur under hensyntagen til sekvens- og

25 strukturdatabaseinformationer;

b) disulfidbrooptimering af de valgte domæner, idet cysteinpositioner, der i sammenhæng med den intakte immunglobulin danner disulfidbroer uden for det valgte domæne, redigeres til en strukturneutral aminosyre, fortrinsvis serin, alanin eller glycin;

30 c) optionel redigering af asparagin-koblede glykosilerings-positioner fortrinsvis til serin, alanin eller glycin;

d) forbindelse af et udvalg af funktionsmodulerne, der resulterer af trinnene a) til c), med fleksible linkersekvenser, der består af aminosyrerne glycin og/eller serin og særligt foretrukket svarer til linkersekvensen (SEQ ID NO: 3), idet afhængigt af

funktionsmodulets position inden for modubodyen og kloningsstrategien en modulsekvens, der resulterer af trinnene a) til c), kan forbindes med en fleksibel linkersekvens, og linkersekvensen kan danne funktionsmodulets N- eller C-terminus, og idet der optionelt kan genereres en aminosyresekvens, der omfatter

5 flere funktionsmoduler, eller en aminosyresekvens, der opbygger den komplette modubody;

e) oversættelse af aminosyresekvenserne, der resulterer af trinnene a) til d), til korresponderende DNA-sekvenser, fortrinsvis under hensyntagen til en codonhyppighedstabel, der er optimeret til det planlagte ekspressionssystem, idet

10 de resulterende DNA-sekvenser optionelt kan forsynes med flankerende restriktionsenzymgrænseflader og konservative basesubstitutioner til undgåelse af uønskede restriktionsenzymgrænseflader;

f) fremstilling af sekvenserne, der er defineret i trin e), som syntetisk DNA ved gensyntese og kloning af de genetiske enheder, der koder enkelte

15 funktionsmoduler eller en serie af flere ens eller forskellige funktionsmoduler, til egnede vektorer, kloning af hele modubodyen ved sammenføjning af de enkelte funktionsmoduler eller funktionsmodulserier tilsigter funktionsmodulsekvens og antal, idet der optionelt også direkte kan klones en genetisk enhed, der koder den komplette modubody.

20

Denne konstruktionsmåde, f.eks. valget af rumligt afgrænsede domæner, undgåelse af disulfidbroer, der stabiliserer en dimer, og forbindelse af de enkelte moduler ved hjælp af fleksible glycin-serin linkere med en foretrukket længde på 30-40 aminosyrer har til hensigt, at de enkelte moduler kan agere uafhængigt af

25 hinanden.

Opfindelsen angår desuden en nukleinsyre, f.eks. et DNA eller RNA, der koder for en fusionspolypeptid som beskrevet ovenfor. Denne nukleinsyre kan eventuelt foreligge i en operativ forbindelse med en ekspressionskontrolsekvens, f.eks. en

30 promotor. Opfindelsen angår dermed også ekspressionsvektorer, der indeholder en nukleinsyresekvens, der koder for en fusionspolypeptid ifølge opfindelsen, og er egnede til ekspression af denne nukleinsyre i en værtscelle. Værtscellen kan være en prokaryotisk værtscelle såsom en gram-negativt bakterie som f.eks. *E. coli* eller en gram-negativt bakterie som f.eks. *B. subtilis* men også en eukaryotisk

værtscelle, f.eks. en gærcele, en svampecelle, en insektcelle eller en pattedyrscelle. For at forbedre ekspressionen af nukleinsyren i den valgte værtscelle kan den optimeres med hensyn til codonanvendelse i den pågældende værtscelle. Tilsvarende fremgangsmåder er kendt af fagmanden.

5

En yderligere genstand for opfindelsen er en værtscelle som angivet ovenfor, der indeholder en nukleinsyre ifølge opfindelsen. Nukleinsyren kan føres ind i den pågældende værtscelle med kendte teknikker, f.eks. transformation eller transfektion. Til fremstilling af fusionspolypeptidet ifølge opfindelsen kan
10 værtscellen kultiveres og fusionspolypeptidet udvindes fra cellen eller kultursupernetanten efter metoder, der principielt er kendt.

Fusionspolypeptiderne ifølge opfindelsen kan eksempelvis anvendes som reagens i en diagnostisk eller biokemisk test, særligt i en test, der er baseret på
15 immunologiske metoder, eksempelvis som kontrol- eller kalibratorreagens eller også som testreagens til bestemmelse af en analyt. Påvisningen af fusionspolypeptiderne ifølge opfindelsen kan i den forbindelse foretages via CHX-domænet(-erne) f.eks. under anvendelse af isotype- eller artsspecifikke identifikationsreagenser, f.eks. sekundære antistoffer og/eller via ikke-
20 immunglobulin-identifikationsdomæner under anvendelse af specifikke bindingspartnere til disse domæner. Tilsvarende testformater kendes af fagmanden.

Desuden kan fusionspolypeptidet, nukleinsyren eller værtscellen ifølge den
25 foreliggende opfindelse også anvendes til medicinske formål, f.eks. inden for human- eller veterinærmedicin. Fusionspolypeptider kan eksempelvis anvendes som immunologiske lægemidler, eventuelt koblet sammen med ikke-immunglobulin-effektordomæner, f.eks. radionukleider eller toksiner.

Nukleinsyrerne, der koder for fusionspolypeptidet, kan eksempelvis anvendes som
30 nukleinsyrevaccine.

En endnu yderligere genstand for opfindelsen er således en farmaceutisk sammensætning, der indeholder fusionspolypeptidet, nukleinsyren eller værtscellen sammen med farmaceutisk egnede bærestoffer. Indgivelsen af den

farmaceutiske sammensætning kan udføres efter kendte metoder, som de eksempelvis anvendes til terapi med antistoffer eller DNA-vaccinering, til et subjekt, f.eks. en menneskelig patient, der har brug for en tilsvarende terapeutisk behandling.

5

Desuden skal den foreliggende opfindelse forklares ved hjælp af de følgende eksempler.

Eksempler

Eksempel 1: Konstruktion, kloning og karakterisering af et β 2-glycoprotein-bindingsmodul (scFv-CAD)

5

1.1 Konstruktion af scFv-CAD

Det følgende eksempel beskriver konstruktionen af et β 2-glycoprotein-specifikt bindingsmodul (scFv-CAD) i form af en syntetisk konstruktion.

10

Andele af den variablen region af den lette kæde VL (SEQ ID NO:1) og af den variable region af den tunge kæde VH (SEQ ID NO:2) i det monoklonale antistof WBCAL-1, der stammer fra en musemodel for antiphospholipidsyndromet, F1 mus fra New Zealand white X BXSB (Ichikawa et al. (1999), *Arthritis and Rheumatism* 42:2461) blev valgt som elementer til et β 2-glycoproteinidentifikationsmodul, føjet sammen med en fleksibel linker (SEQ ID NO: 3) og flankerende sekvenser til en kunstig proteinsekvens scFv-RP-CAD-P (SEQ ID NO: 4). Denne proteinsekvens blev under hensyntagen til en codonhyppighedstabel oversat til en nukleinsyresekvens, der er optimeret til ekspresion i *E. coli*, forsynet med flankerende kloningssekvenser og fremstillet ved hjælp af gensyntese som kunstig DNA-sekvens scFv-RP-CAD-N, der koder for et β 2-glycoprotein-identifikationsmodul (SEQ ID NO: 5). VL-domænet strækker sig fra aminosyre 1-118 i SEQ ID NO: 4, VH-domænet strækker sig fra aminosyre 159-272 i SEQ ID NO: 4.

25

1.2 Kloning af scFv-CAD

Til konstruktionen blev den under eksempel 1.1 beskrevne syntetiske DNA-sekvens scFv-RP-CAD-N (SEQ ID NO: 5), der koder for et β 2-glycoprotein-detektionsdomæne, amplificeret med primerne RP-CAD01 (SEQ ID NO: 6), RP-CAD02 (SEQ ID NO: 7) ved polymerasekædereaktion (PCR). 856 basepar (bp)-amplifikatet blev isoleret efter agarosegelelektroforese med QiaExII-kit (Qiagen, Hilden). Det isolerede fragment blev først fordøjet med restriktionsenzymet Hind III og derefter underkastet en BglII partial fordøjelse. Restriktionsfragmentet blev

ligeret med plasmid pQE-80L (Qiagen, Hilden), der blev fordøjet med de kompatible enzymer BamHI og HindIII, og transformeret til *E. coli*-stamme NovaBlue (Merck, Nottingham). Transformationsopløsningen blev udpladet på LB-agarplader, der var suppleret med 50 µg/ml carbenicillin, og inkuberet natten over (n.o.), (16-20 h) ved 36 °C. Enkeltkolonier af den resulterende *E. coli*-stamme CAD-pQE80-NovaBlue blev formeret på rysteanordningen ved 180 omdrejninger i minuttet (o/min) i LB-mediet, der var suppleret med 50 µg/ml carbenicillin (LB-Carb) (36 °C, o.n.). Fra enkeltklonkulturene blev der oprettet frysestammekulturer. 1 ml fra enkeltklonkulturene blev i hvert enkelt tilfælde anvendt til plasmidpræparation. De isolerede plasmider blev analyseret ved hjælp af EcoRI/HindIII-fordøjelse. Kloner med et forventet 901 bp-fragment blev undersøgt yderligere ved induktionsanalyse. Hertil blev de udvalgte enkeltkloner dyrket i LB-Carb og induceret ved en O.D.500 på 0,5 til 1,0 ved tilsætning af et kulturvolumen LB-Carb, 1 mM isopropylthiogalactosid (IPTG) til ekspresion af proteinet, der var kodet ved hjælp af det klonede DNA-fragment, og kultiveret i 16 timer (h), ved 36 °C, 180 o/min. Induktionscellerne blev lyseret i natriumdodecylsulfat (SDS)-holdigt prøvebuffer, proteiner blev separeret ved SDS-polyacrylamidgelelektroforese (PAGE). I Western-Blot blev ekspresionen af et forventet 30 kDa scFv-CAD-protein påvist ved detektion med et Anti-RGS-6xHis-peroxidase-koblet antistof (Qiagen, Hilden). Den korrekte kloning blev bekræftet ved sekvensering.

1.3 Ekspresion af scFv-CAD

Den under 1.2. med ekspresionskonstruktet transformerede *E. coli*-stamme CAD-pQE80-NovaBlue blev dyrket i LB-Carb-mediet ved 36 °C indtil en O.D.500 på 0,5 til 1,0 og induceret ved tilsætning af IPTG til syntese af scFv-CAD. Den inducerede kultur blev kultiveret ved 36 °C i 4 timer til natten over. Induktionscellerne blev høstet og lyseret efter lysozymbehandling i et 8 M urinstofholdigt Tris-HCl-natriumchlorid-buffer (TBS). Ekspimeret scFv-CAD blev renses ved en kombination af affinitets- og ionbytningskromatografi til homogenitet. I det coomassieblåt farvede SDS-polyacrylamidgel er scFv-CAD-proteinet synligt i form af et 30 kDa-bånd. Berigelsen af β2-glycoprotein-bindingsaktiviteten ledsages af rensning af 30 kDa-båndet.

1.4 Karakterisering af scFv-CAD

Bindingsspecifiteten af scFv-CAD blev kontrolleret in Enzyme linked

- 5 Immunosorbent-Assay (ELISA) med mikrotiterplader belagt med β 2-glycoprotein henholdsvis kvægserumalbumin (BSA). Stabiliteten af scFv-CAD over for varmestress blev undersøgt ved egnede fortyndinger af scFv-CAD.

1.4.1 Bindingsspecifitet af scFv-CAD

10

- For at bestemme, om scFv-CAD har en specifik β 2-glycoproteinbindingsaktivitet, blev det rensede proteinmodul testet med immunoassays. Til dette formål blev fortyndingsserier af scFv-CAD påført på mikrotiterplader til Anti- β 2-glycoprotein-assayet, der var belagt med β 2-glycoprotein (ORG 521, ORGENTEC Diagnostika
- 15 GmbH, Mainz), og til kontrol af bindingsspecifiteten på BSA-belagte plader og inkuberet 30 min ved 20-25 °C. Mikrotiterpladerne blev vasket og bindingen af scFv-CAD blev bestemt med et peroxidase-markeret RGS-6X-His-antistof (Qiagen, Hilden) og en tetramethylbenzidin (TMB)-farvereaktion ved måling af O.D. 450. I den forbindelse blev der som vist på **Figur 2** allerede ved en
- 20 koncentration af scFv-CAD på 19 ng/ml påvist en specifik binding til β 2-glycoprotein. Sammenligningen af reaktionsniveauet for scFv-CAD-fortyndingstrinnene ved binding til β 2-glycoprotein henholdsvis BSA belagte mikrotiterplader viser, at der ikke forekommer nogen uspecifik binding i koncentrationsområdet på 0,019-10 μ g/ml scFv-CAD.

25

1.4.2 Temperaturstabilitet ved scFv-CAD

- For at undersøge indflydelsen af temperaturstress på den specifikke β 2-glycoprotein-bindingsaktivitet ved scFv-CAD blev det rensede proteinmodul udsat
- 30 for en temperatur på 50 °C i en koncentration på 5 μ g/ml i et tidsrum på 0-180 minutter. Bindingen af scFv-CAD til β 2-glycoprotein blev bestemt i et immunoassay som beskrevet under 1.4.1. I den forbindelse viste scFv-CAD-modulet, der var fortyndet i kalibratorfortyndingsmediet, sig, som vist på **figur 3A**, at være resistent over for en temperatur på 50 °C i 3 timer.

For at bestemme inaktiveringstemperaturen af scFv-CAD blev det rensede proteinmodul udsat for en serie af temperaturer på 20 °C til 90 °C i en koncentration på 5 µg/ml i et kalibratorfortyndingsmedium i 10 min. Bindingen af de varmebehandlede scFv-CAD-fortyndinger til β 2-glycoprotein blev bestemt i et immunoassay som beskrevet under 1.4.1. I den forbindelse viste scFv-CAD-modulet sig, som vist på **figur 3B**, at være stabilt op til en temperatur på 50 °C, fra en temperatur på 60 °C opstod der en betydelig inaktivering.

10 Eksempel 2: Konstruktion af en serie af reaktionsmoduler for modubodies

Det følgende eksempel beskriver konstruktionen af en serie af reaktionsmoduler, der er afledt fra domæner af den konstante region af den tunge kæde i humane antistoffer. Til dette formål blev strukturelt og funktionelt afgrænsede domæner afledt fra proteinsekvenser af den tunge kæde af humane antistoffer fra klasserne IgG, IgA, IgM med kendt rumlig struktur. De udvalgte proteinsekvenser blev kontrolleret med henblik på potentielle interdomæne-disulfidbroer. Cysteinpositioner, der uden for det valgte domæne danner disulfidbroer med regioner af det intakte immunglobulin, blev redigeret fra cystein til serin. Ved enkelte glykosileringspositioner blev der ligeledes udført en redigering fra asparagin til serin. De udvalgte immunglobulindomænesekvenser blev sammenføjet til kunstige reaktionsmodulsekvenser som elementer til reaktionsmoduler med en fleksibel linker (SEQ ID NO: 3) og flankerende sekvenser. Disse reaktionsmodulsekvenser blev baseret på en codonhyppighedstabel oversat til en nukleinsyresekvens, der er optimeret til ekspression i *E. coli*, forsynet med flankerende kloningssekvenser og fremstillet ved gensyntese som kunstige DNA-sekvenser.

2.1 Konstruktion af et humant IgG-CH1-reaktionsmodul

30

Fra Worldwide Protein Data Bank (pdb), (Berman et al. (2003), Nature Structural Biology 10: 980) blev sekvenspositionerne 125-219 udvalgt fra krystalstrukturen af Fab-fragmentet i Anti-Factor Ix-antistoffet 10c12 på baggrund af proteinstrukturdatabaseposten pdb 3D69H som repræsentativt IgG-CH1-domæne.

Den udvalgte IgG-CH1 immunglobulindomænesekvens blev som element til et IgG-CH1-reaktionsmodul med en fleksibel linker (SEQ ID NO: 3) føjet sammen til en kunstig proteinsekvens Sc-RP-CH1-G-P (SEQ ID NO: 8) og under hensyntagen til en codonhyppighedstabel oversat til en nukleinsyresekvens, der er
5 optimeret til ekspresion i *E. coli*, forsynet yderligere med flankerende kloningssekvenser (BamHI, HindIII) og fremstillet ved gensyntese som kunstig DNA-sekvens Sc-RP-CH1-G-N (SEQ ID NO: 9). IgG-CH1-domænet strækker sig fra aminosyre 37-131 i SEQ ID NO: 8.

10 2.2 Konstruktion af et humant IgG-CH2-reaktionsmodul

Fra krystalstrukturen af det muterede Adcc-forstærkede Fc-fragment blev sekvenspositionerne 15-116 på baggrund af proteinstrukturdatabaseposten pdb 2QL1A udvalgt som repræsentativt IgG-CH2-domæne. Den udvalgte IgG-CH2-
15 immunglobulindomænesekvens blev som element til et IgG-CH2-reaktionsmodul med en fleksibel linker (SEQ ID NO: 3) føjet sammen til en kunstig proteinsekvens Sc-RP-CH2-G-P (SEQ ID NO: 10) og under hensyntagen til en codonhyppighedstabel oversat til en nukleinsyre, der er optimeret til ekspresionen i *E. coli*, yderligere forsynet med flankerende kloningssekvenser
20 (BamHI/HindIII) og fremstillet ved gensyntese som kunstig DNA-sekvens Sc-RP-CH2-G-N (SEQ ID NO: 11). IgG-CH2-domænet strækker sig fra aminosyre 37-138 i SEQ ID NO: 10.

25 2.3 Konstruktion af et humant IgG-CH3-reaktionsmodul

Fra krystalstrukturen af den tunge kæde af et humant immunglobulin med en hinge-deletion blev sekvenspositionerne 330-428 på baggrund af proteinstrukturdatabaseposten pdb 1MCO_H (GI: 494350) udvalgt som repræsentativt IgG-CH3-
30 immunglobulindomænesekvens blev som element til et IgG-CH3-reaktionsmodul med en fleksibel linker (SEQ ID NO: 3) føjet sammen til en kunstig proteinsekvens Sc-RP-CH3-G-P (SEQ ID NO: 12) og under hensyntagen til en codonhyppighedstabel oversat til en nukleinsyresekvens, der er optimeret til ekspresion i *E. coli*, yderligere forsynet med flankerende kloningssekvenser

(BamHI/HindIII) og fremstillet ved gensyntese som kunstig DNA-sekvens Sc-RP-CH3-G-N (SEQ ID NO: 13). IgG-CH3-domænet strækker sig fra aminosyre 37-135 i SEQ ID NO: 12.

5 2.4 Konstruktion af et humant IgA-CH2-reaktionsmodul

Fra en strukturmodel for humant IgA, der blev afledt på basis af neutronspreddning i opløsning og homologimodellering (Boehm et al. (1999) J.Mol.Biol. 286: 1421-1447), blev sekvenspositionerne 126-222 (i henhold til UNIPROT P01876) fra
10 proteinstrukturdatabaseposten pdb 1IGA på baggrund af den rumlige struktur af den tunge kæde af humant IgA1 udvalgt som repræsentativt IgA-CH2-domæne. Ved positionerne 182, 192 blev cystein redigeret til serin. Den udvalgte og redigerede IgA-CH2-immunglobulindomænesekvens blev som element til et IgA-CH2-reaktionsmodul med en fleksibel linker (SEQ ID NO: 3) føjet sammen til en
15 kunstig proteinsekvens Sc-RP-CH2-A-P (SEQ ID NO: 14) og under hensyntagen til en codonhyppighedstabel oversat til en nukleinsyresekvens, der er optimeret til ekspresion i *E. coli*, yderligere forsynet med flankerende kloningssekvenser (BamHI/HindIII) og fremstillet ved gensyntese som kunstig DNA-sekvens Sc-RP-CH2-A-N (SEQ ID NO: 15). IgA-CH2-domænet strækker sig fra aminosyre 37-133
20 in SEQ ID NO: 14.

2.5 Konstruktion af et humant IgA-CH3-reaktionsmodul

Fra proteinstrukturdatabaseposten PDB 1IGA blev sekvenspositionerne 227-331 (i
25 henhold til UNIPROT P01876) på baggrund af den rumlige struktur af den tunge kæde af humant IgA1 udvalgt som repræsentativt IgA-CH3-domæne. Den udvalgte IgA-CH3-immunglobulindomænesekvens blev som element til et IgA-CH3-reaktionsmodul med en fleksibel linker (SEQ ID NO: 3) føjet sammen til en kunstig proteinsekvens sc-RP-CH3-A-P (SEQ ID NO: 16) og under hensyntagen
30 til en codonhyppighedstabel oversat til en nukleinsyresekvens, der er optimeret til ekspresion i *E. coli*, yderligere forsynet med flankerende kloningssekvenser (BamHI/HindIII) og fremstillet ved gensyntese som kunstig DNA-sekvens sc-RP-CH3-A-N (SEQ ID NO: 17). IgA-CH3-domænet strækker sig fra aminosyre 37-141 i SEQ ID NO: 16.

2.6 Konstruktion af et humant IgM-CH2-reaktionsmodul

Fra en strukturmodel af humant IgM, der blev afledt på basis af røntgenstråling i opløsning og modellering (Perkins et al. (1991) J.Mol.Biol. 221:1345-1366) blev sekvenspositionerne 106-217 (i henhold til UNIPROT P01871) fra proteinstrukturdatabaseposten pdb 2rcj på baggrund af den rumlige struktur af den tunge kæde af humant IgM udvalgt som repræsentativt IgM-CH2-domæne og redigeret. Ved position 214 blev cystein redigeret til serin, ved position 109 blev asparagin redigeret til serin. Den udvalgte og redigerede IgM-CH2-immunglobulindomænesekvens blev som element til et IgM-CH2-reaktionsmodul med en fleksibel linker (SEQ ID NO: 3) føjet sammen til en kunstig proteinsekvens Sc-RP-CH2-M-P (SEQ ID NO: 18) og under hensyntagen til en codonhyppighedstabel oversat til en nukleinsyresekvens, der er optimeret til ekspresion i *E. coli*, yderligere forsynet med flankerende kloningssekvenser (BamHI/HindIII) og fremstillet ved gensyntese som kunstig DNA-sekvens Sc-RP-CH2-M-N (SEQ ID NO: 19). IgM-CH2-domænet strækker sig fra aminosyre 37-148 i SEQ ID NO: 18.

2.7 Konstruktion af et humant IgM-CH3-reaktionsmodul

Fra proteinstrukturdatabaseposten pdb 2rcj blev sekvenspositionerne 218-323 (entsprechend UNIPROT P01871) på baggrund af den rumlige struktur af den tunge kæde af humant IgM udvalgt som repræsentativt IgM-CH3-domæne og redigeret. Ved position 291 blev cystein redigeret til serin, ved positionerne 272 og 279 blev asparagin redigeret til serin. Den udvalgte og redigerede IgM-CH3-immunglobulindomænesekvens blev som element til et IgM-CH3-reaktionsmodul med en fleksibel linker (SEQ ID NO: 3) føjet sammen til en kunstig proteinsekvens Sc-RP-CH3-M-P (SEQ ID NO: 20) og under hensyntagen til en codonhyppighedstabel oversat til en nukleinsyresekvens, der er optimeret til ekspresion i *E. coli*, yderligere forsynet med flankerende kloningssekvenser (BamHI/HindIII) og fremstillet ved gensyntese som kunstig DNA-sekvens Sc-RP-CH3-M-N (SEQ ID NO: 21). IgM-CH3-domænet strækker sig fra aminosyre 37-142 i SEQ ID NO: 20.

2.8 Konstruktion af et humant IgM-CH4-reaktionsmodul

Fra proteinstrukturdatabaseposten pdb 2rcj blev sekvenspositionerne 324-452 (i
5 henhold til UNIPROT P01871) på baggrund af den rumlige struktur af den tunge
kæde af humant IgM udvalgt som repræsentativt IgM-CH3-domæne og redigeret.
Ved position 451 blev cystein redigeret til serin, ved positionerne 439 blev
asparagin redigeret til serin. Den udvalgte og redigerede IgM-CH3-
immunglobulindomænesekvens blev som element til et IgM-CH3-reaktionsmodul
10 med en fleksibel linker (SEQ ID NO: 3) føjet sammen til en kunstig proteinsekvens
Sc-RP-CH4-M-P (SEQ ID NO: 22) og under hensyntagen til en
codonhyppighedstabel oversat til en nukleinsyresekvens, der er optimeret til
ekspression i *E. coli*, yderligere forsynet med flankerende kloningssekvenser
(BamHI/HindIII) og fremstillet ved gensyntese som kunstig DNA-sekvens Sc-RP-
15 CH4-M-N (SEQ ID NO: 23). IgM-CH4-domænet strækker sig fra aminosyre 37-165
i SEQ ID NO: 22.

2.9 Konstruktion af et monovalent humant IgG-CH3-Knob02-reaktionsmodul

20 Fra krystalstrukturen af den tunge kæde af et humant immunglobulin med en
hinge-deletion blev sekvenspositionerne 330-428 på baggrund af
proteinstrukturdatabaseposten pdb 1MCO_H (GI:494350) udvalgt som
repræsentativt IgG-CH3-domæne og redigeret. I den forbindelse blev positioner af
aminosyrerester, hvis sidekæder danner kontakter ved grænsefladen til IgG₁-CH3-
25 dimerer (Ridgway J.B.B et al. (1996), Protein Engineering, 9: 617-621), modificeret
på en sådan måde, at der ikke kan ske en dimerisering af IgG-CH3-domænet. Ved
positionerne 351 og 379 blev threonin redigeret til tyrosin, ved position 390 blev
phenylalanin redigeret til tyrosin. Den udvalgte og redigerede IgG-CH3
immunglobulindomæne-sekvens blev som element til et IgG-CH3-Knob02-
30 reaktionsmodul med en fleksibel linker (SEQ ID NO: 3) føjet sammen til en kunstig
proteinsekvens Sc-RP-CH3-G-Knob02-P (SEQ ID NO: 32) og under hensyntagen
til en codonhyppighedstabel oversat til en nukleinsyresekvens, der er optimeret til
ekspression i *E. coli*, yderligere forsynet med flankerende kloningssekvenser
(BamHI/HindIII) og fremstillet ved gensyntese som kunstig DNA-sekvens Sc-RP-

CH3-G-Knob02-N (SEQ ID NO: 33). IgG-CH3-Knob02-domænet strækker sig fra aminosyre 37-135 in SEQ ID NO: 32.

Eksempel 3: Den enkeltkædede CAD-IgG-CH3 modubody

5

3.1 Konstruktion og kloning af den enkeltkædede CAD-IgG-CH3 modubody

Det følgende eksempel beskriver konstruktionen og kloningen af den β -glycoprotein-specifikke modubody CAD-IgG-CH3, der er forsynet med IgG-CH3-
10 detektionsdomæne.

Til konstruktion af CAD-IgG-CH3-modubodyen blev modulerne scFv-CAD (eksempel 1) og IgG-CH3 (eksempel 2.3) sammensat til en CAD-IgG-CH3 kodende sekvens (SEQ ID NO: 26) ved restriktionsfordøjelse og ligation i
15 domænerækkefølgen VL-linker-VH-linker-IgG-CH3.

Hertil blev det under eksempel 2.3 beskrevne syntetiske IgG-CH3-reaktionsmodul Sc-RP-CH3-G-N i henhold til sekvens SEQ ID NO: 13 amplificeret med primerne CH05 (SEQ ID NO: 24) og CH04 (SEQ ID NO: 25) ved hjælp af PCR. 443 b-
20 amplifikatet blev isoleret efter agarosegelelektroforese med QiaExII-kit (Qiagen, Hilden). Det isolerede fragment blev først fordøjet med restriktionsenzymene Bell og HindIII. Restriktionsfragmenterne blev ligeret med det under eksempel 1 beskrevne CAD-scFv-pQE80-vektorkonstrukt, der blev fordøjet med de kompatible enzymer BamHI og HindIII, og transformeret til *E. coli*-stamme NovaBlue (Merck,
25 Nottingham). Transformationsopløsningen blev udpladet på LB-agarplader, der var suppleret med carbenicillin (50 μ g/ml), og inkuberet natten over ved 36 °C. Enkeltkolonier af den resulterende *E. coli*-stamme CAD-IgG-CH3-pQE80-NovaBlue blev formeret i LB-Carb-mediet (36 °C, natten over 180 o/min). Fra enkeltklonkulturerne blev der oprettet frysestammekulturer, 1 ml fra
30 enkeltklonkulturerne blev i hvert enkelt tilfælde anvendt til plasmidpræparation. De isolerede plasmider blev analyseret ved hjælp af EcoRI/HindIII-fordøjelse. Kloner med et forventet 1312 bp-fragment blev undersøgt yderligere ved induktionsanalyse. Hertil blev de udvalgte enkeltkloner dyrket i LB-Carb og induceret ved en O.D.500 på 0,5 til 1,0 ved tilsætning af et kulturvolumen LB-Carb,

der var suppleret med 1 mM IPTG, til ekspresion af det rekombinante protein og kultiveret i 16 timer ved 36 °C, 180 o/min. Induktionscellerne blev lyseret i SDS-prøvebuffer, proteiner blev separeret ved hjælp af SDS-PAGE. I Western-Blot blev ekspresionen af den forventede 44 kDa-CAD-IgG-CH3-
5 modubody påvist ved detektion med et Anti-RGS-6xHis-peroxidase-koblet antistof (Qiagen, Hilden). Den korrekte kloning blev bekræftet ved sekvensering.

3.2 Ekspresion og rensning af den enkeltkædede CAD-IgG-CH3-modubody

10 Det følgende eksempel beskriver ekspresion og rensning af det β 2-glycoprotein-specifikke modubody CAD-IgG-CH3, der er forsynet med et humant IgG-CH3-detektionsdomæne.

Den under 3.1 med ekspresionskonstruktet transformerede *E. coli*-stamme CAD-IgG-CH3-pQE80-NovaBlue blev dyrket i LB-Carb-mediet ved 36 °C indtil en
15 O.D.500 på 0,5 til 1.0 og under tilsætning af IPTG induceret til syntese af CAD-IgG-CH3 modubody. Den inducerede kultur blev kultiveret ved 36 °C i 4 timer til natten over. Induktionscellerne blev høstet og lyseret efter lysozymbehandling i et 8 M urinstof-holdigt TBS-buffer. Eksprimerede scFv-CAD-modubodies blev rensat
20 ved en kombination af affinitets- og ionbytningskromatografi for at opnå homogenitet. I det coomassieblåt farvede SDS-polyacrylamidgel er et 44 kDa-bånd synligt. Berigelsen af β 2-glycoprotein-bindingsaktiviteten og en reaktivitet med et peroxidase-koblet anti-human-IgG sekundært antistof (Jackson Immunoresearch) ledsages af rensning af 44 kDa-båndet.

25

3.3 Karakteristika for det enkeltkædede CAD-IgG-CH3-modubody

Det følgende eksempel beskriver karakteriseringen af det β 2-glycoprotein-specifikke modubody CAD-IgG-CH3, der er forsynet med et humant IgG-CH3-
30 detektionsdomæne med hensyn til specifik antigenidentifikation via et anti-human-IgG sekundært antistof og stabilitet over for øgede temperaturer, indtørring og nedfrysningsoptønings-cykler.

3.3.1 Kalibratorfunktion af CAD-IgG-CH3-modubody

For at bestemme, om CAD-IgG-CH3-modubody har bevaret β 2-glycoprotein-bindings-aktiviteten ved scFv-CAD, og bindingen til antigenet via et anti-human-IgG sekundært antistof kan påvises specifikt, blev rensede CAD-IgG-CH3-
5 præparationer undersøgt i et anti- β 2-glycoproteinimmunoassay. Den rensede CAD-IgG-CH3-modubody blev i en fortyndingsserie med koncentrationerne 0 μ g/ml, 0,31 μ g/ml, 0,62 μ g/ μ l, 1,25 μ g/ml, 2,5 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 20 μ g/ml i et kalibratorfortyndingsmedium påført på mikrotiterplader, der var belagt med β 2-glycoprotein. Antigen-bindingsaktiviteten blev bestemt under
10 inkubationsbetingelserne, der er beregnet til anti- β 2-glycoprotein-assayet (ORG 521, ORGENTEC GmbH, Mainz), og et anti-human-IgG-peroxidase-markeret sekundært antistof i en koncentration på 80 ng/ml. På **figur 4** er forløbet af det under de valgte reaktionsbetingelser bestemte OD 450 nm vist afhængigt af koncentrationen. Under de valgte reaktionsbetingelser blev CAD-IgG-CH3-
15 modubody påvist ved en koncentration på 5 μ g/ml med en O.D. 450 på 2,2.

3.3.2 Stabilitet af CAD-IgG-CH3-modubody

Til karakterisering af robustheden af CAD-IgG-CH3-modubody blev fortyndinger i
20 kalibratorfortyndingsmedium udsat for stressfaktorerne 50 °C-varmestress, øget opbevaringstemperatur ved 36 °C, tørhed og gentagne nedfrysningsoptøningscyklusser. I sammenligning med ubehandlede prøver blev β 2-glycoprotein-bindingsaktiviteten og detekterbarheden bestemt med et anti-hu-IgG-peroxidase-markeret sekundært antistof (Jackson Immunoresearch).
25

3.3.2.1 Stabilitet af CAD-IgG-CH3-modubody over for varmestress

Stabiliteten over for varmestress blev undersøgt, ved at fortyndinger af CAD-IgG-CH3-modubody i kalibratorfortyndingsmedium blev inkuberet i koncentrationerne 0
30 μ g/ml, 0,31 μ g/ml, 0,62 μ g/ μ l, 1,25 μ g/ml, 2,5 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 20 μ g/ml i 60 minutter og 90 minutter ved 50 °C og blev undersøgt ved sammenligning med en ved rumtemperatur opbevaret fortyndingsserie i anti- β 2-glycoproteinimmunoassayet. I den forbindelse blev β 2-glycoprotein-bindingsaktiviteten bestemt under inkubationsbetingelserne, der er beregnet til

anti- β 2-glycoprotein-assayet (ORG 521, ORGENTEC GmbH, Mainz), og et anti-human-IgG-peroxidase-markeret sekundært antistof i en koncentration på 80 ng/ml. På **figur 5** er forløbet af det under de valgte reaktionsbetingelser bestemte OD 450 nm for fortyndingsserierne ved inkubation i 60 og 90 minutter ved 50 °C

5 vist i sammenligning med fortyndingsserien, der var opbevaret ved rumtemperatur. Under de valgte reaktionsbetingelser blev funktionen af CAD-IgG-CH3-modubody i fortyndinger i koncentrationsområdet på 0,31 μ g/ml til 20 μ g/ml ved 50 °C temperaturstress i 60 minutter eller 90 minutter ikke indskrænket.

10 3.3.2.2 Stabilitet af CAD-IgG-CH3-modubody over for opbevaring ved 36 °C

Stabiliteten over for øget opbevaringstemperatur blev undersøgt, ved at fortyndinger af CAD-IgG-CH3-modubody i koncentrationerne 0 μ g/ml, 0,31 μ g/ml, 0,62 μ g/ml, 1,25 μ g/ml, 2,5 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 20 μ g/ml i

15 kalibratorfortyndingsmedium blev inkuberet i 1, 2, 4, 7, 10 dage ved 36 °C og blev undersøgt ved sammenligning med en under 4 °C opbevaret fortyndingsserie i anti- β 2-glycoproteinimmunoassayet. I den forbindelse blev β 2-glycoprotein-bindingsaktiviteten bestemt under inkubationsbetingelserne, der er beregnet til anti- β 2-glycoprotein-assayet (ORG 521, ORGENTEC GmbH, Mainz), og et anti-

20 human-IgG-peroxidase-markeret sekundært antistof i en koncentration på 80 ng/ml. På **figur 6** er forløbet af det under de valgte reaktionsbetingelser bestemte OD 450 nm for fortyndingsserierne ved opbevaring i 1, 2, 4, 7, 10 dage ved 36 °C vist i sammenligning med fortyndingsserien, der var opbevaret ved 4 °C. Under de valgte reaktionsbetingelser blev funktionen af CAD-IgG-CH3-modubody i

25 fortyndinger i koncentrationsområdet på 0,31 μ g/ml til 20 μ g/ml ved opbevaring ved 36 °C i en periode på ti dage ikke indskrænket.

3.3.2.3 Stabilitet af CAD-IgG-CH3-modubody over for indtørring

30 Stabiliteten over for indtørring blev undersøgt, ved at fortyndinger af CAD-IgG-CH3-modubody i kalibratorfortyndingsmedium i 50 μ l portioner i koncentrationerne 0 μ g/ml, 3,1 μ g/ml, 6,21 μ g/ml, 12,5 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml blev tørret i en speedvak under vakuum ved 22 °C. De tørrede prøver blev gensolubileret med et 450 μ l kalibratorfortyndingsmedium og 50 μ l vand til en

fortyndingsserie med koncentrationerne 0 µg/ml, 0,31 µg/ml, 0,62 µg/µl, 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml og undersøgt i sammenligning med en ubehandlet fortyndingsserie i et anti-β2-glycoprotein-cardiolipinimmunoassay. I den forbindelse blev β2-glycoprotein-bindingsaktiviteten bestemt under

5 inkubationsbetingelserne, der er beregnet til anti-cardiolipin-β2-glycoprotein-assayet (ORG 515, ORGENTEC GmbH, Mainz), og et anti-human-IgG-peroxidase-mærket sekundært antistof i en koncentration på 80 ng/ml. På **figur 7** er forløbet af det under de valgte reaktionsbetingelser bestemte OD 450 nm for de indtørrede prøver vist i sammenligning med den ubehandlede fortyndingsserie.

10 Under de valgte reaktionsbetingelser blev funktionen af CAD-IgG-CH3-modubody i fortyndinger i koncentrationsområdet på 3,1 µg/ml til 200 µg/ml ikke indskrænket som følge af indtørring.

3.3.2.4 Stabilitet af CAD-IgG-CH3-modubody over for nedfrysningsoptøningscykluser

15

Stabiliteten over for gentagne nedfrysningsoptøningscykluser blev undersøgt, ved at fortyndinger af CAD-IgG-CH3-modubody i kalibratorfortyndingsmedium i 50 µl portioner i koncentrationerne 0 µg/ml, 3,1 µg/ml, 6,21 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25

20 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml i fem gentagne nedfrysningsoptøningscykluser blev nedfrosset ved -70 °C og optøet igen ved 37 °C. Derefter blev prøverne fortyndet med 450 µl kalibratorfortyndingsmedium til en fortyndingsserie med koncentrationerne 0 µg/ml, 0,31 µg/ml, 0,62 µg/µl, 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml og undersøgt ved sammenligning

25 med en ubehandlet CAD-IgG-CH3-fortyndingsserie i anti-β2-cardiolipin-glycoprotein-immunoassayet. I den forbindelse blev β2-glycoprotein-bindingsaktiviteten bestemt under inkubationsbetingelserne, der er beregnet til anti-cardiolipin-β2-glycoprotein-assayet (ORG 515, ORGENTEC GmbH, Mainz), og et anti-human-IgG-peroxidase-mærket sekundært antistof i en koncentration

30 på 80 ng/ml. På **figur 8** er forløbet af det under de valgte reaktionsbetingelser bestemte OD 450 nm vist for de gentagne gange nedfrosne og optøede prøver i sammenligning med den ubehandlede fortyndingsserie. Under de valgte reaktionsbetingelser blev funktionen af CAD-IgG-CH3-modubody i

koncentrationsområdet på 3,1 µg/ml til 200 µg/ml ikke indskrænket som følge af gentagne nedfrysningsoptønings-cykluser.

Eksempel 4: Den enkeltkædede CAD-IgG-CH2-modubody

5

4.1 Konstruktion og kloning af den enkeltkædede CAD-IgM-CH2-modubody

Det følgende eksempel beskriver konstruktion og kloning af den β2-glycoprotein-specifikke modubody CAD-IgG-CH2, der er forsynet med et monomert humant
10 IgG-CH2-detektionsdomæne.

Til konstruktion af CAD-IgG-CH2-modubody blev modulerne scFv-CAD (eksempel 1) og IgG-CH2 (eksempel 2.2) sammensat ved restriktionsfordøjelse og ligation i domænerækkefølgen VL-linker-VH-linker-IgG-CH2 til en CAD-IgG-CH2 kodende
15 sekvens (SEQ ID NO: 27). Hertil blev det under eksempel 2.2 beskrevne syntetiske IgG-CH2-reaktionsmodul Sc-RP-CH2-G-N i henhold til sekvens SEQ ID NO: 11 med primerne CH03 (SEQ ID NO: 28) og CH04 (SEQ ID NO: 25) ampliceret ved hjælp af PCR. 443 bp-amplifikatet blev gelisolert efter agarosegelelektroforese med QiaExII-Kit (Qiagen, Hilden). Det gelisolerede
20 fragment blev først fordøjet med restriktionsenzymet *Bcl*I og *Hind*III. Restriktionsfragmenterne blev ligeret med det under eksempel 1 beskrevne CAD-scFv-CAD-pQE80-vektorkonstrukt, der blev fordøjet med de kompatible enzymer *Bam*HI og *Hind*III, og transformeret til *E. coli*-stamme NovaBlue (Merck, Nottingham). Transformationsopløsningen blev udpladet på LB-agarplader, der var
25 suppleret med carbenicillin (50 µg/ml), og inkuberet natten over (n.o.) ved 36 °C. Enkeltkolonier af den resulterende *E. coli*-stamme CAD-IgG-CH2-pQE80-NovaBlue blev formeret i LB-medium, der var suppleret med carbenicillin (50 µg/ml) (LB-Carb.) (36 °C, natten over 180 (o/min). Fra enkeltklonkulturene blev der oprettet frysestammekulturer, 1 ml fra enkeltklonkulturene blev i hvert
30 enkelt tilfælde anvendt til plasmidpræparation. De isolerede plasmider blev analyseret ved hjælp af *Eco*RI/*Hind*III-fordøjelse. Kloner med et forventet 1321 bp-fragment blev undersøgt yderligere ved induktionsanalyse. Hertil blev de udvalgte enkeltkloner dyrket i LB-Carb og induceret ved en O.D.500 på 0,5 til 1,0 ved tilsætning af et kulturvolumen LB-Carb, der var suppleret med 1 mM IPTG til

ekspression af det rekombinante protein og kultiveret i 16 timer ved 36 °C, 180 o/min. Induktionscellerne blev lyseret i SDS-prøvebuffer, proteiner blev separeret ved hjælp af SDS-PAGE. I Western-Blot blev ekspressionen af et forventet 44 kDa-CAD-IgG-CH2-modubody påvist ved detektion med et Anti-RGS-6xHis-
5 peroxidase-koblet antistof (Qiagen, Hilden). Den korrekte kloning blev bekræftet ved sekvensering.

4.2 Ekspression og rensning af den enkeltkædede CAD-IgG -CH2-modubody

10 Det følgende eksempel beskriver ekspression og rensning af den β 2-glycoprotein-specifikke modubody CAD-IgG-CH2, der er forsynet med et monomert humant IgG-CH2-detektionsdomæne.

Den under 4.1 med ekspressionskonstruktet transformerede *E. coli*-stamme CAD-IgG-CH2-pQE80-NovaBlue blev dyrket i LB-Carb.-medium ved 36 °C indtil en
15 O.D.500 på 0,5 til 1,0 og induceret ved tilsætning af IPTG til syntese af CAD-IgG-CH2-modubody. Den inducerede kultur blev kultiveret ved 36 °C i 4 timer natten over. Induktionscellerne blev høstet og lyseret efter lysozymbehandling i et 8 M urinstof-holdigt TBS -buffer. Eksprimerede CAD-IgG-CH2-modubodies blev rensat
20 ved hjælp af Ni-NTA-affinitetskromatografi. I det coomassieblåt farvede SDS-polyacrylamidgel er et 44 kDa-bånd synligt. Berigelsen af β 2-glycoprotein-bindingsaktiviteten og en reaktivitet med et peroxidase-koblet anti-human-IgG-sekundært antistof (Jackson Immunoresearch) ledsages af rensning af 44 kDa-båndet.

25

4.3 Karakteristika for den enkeltkædede CAD-IgG-CH2-modubody

Det følgende eksempel beskriver karakteriseringen af den β 2-glycoprotein-specifikke modubody CAD-IgG-CH2, der er forsynet med et monomert humant
30 IgG-CH2-detektionsdomæne med hensyn til specifik antigenidentifikation, specifik påviselighed via et anti-human-IgG sekundært antistof og stabilitet over for øgede temperaturer, indtørring og nedfrysnings-optøningscyklusser.

4.3.1 Kalibratorfunktion af CAD-IgG-CH2-modubody

For at bestemme, om CAD-IgG-CH2-modubody har bevaret β 2-glycoprotein-bindingsaktiviteten ved scFv-CAD, og bindingen til antigenet via et anti-human-IgG sekundært antistof kan påvises specifikt, blev rensede CAD-IgG-CH2-

5 præparationer undersøgt i anti-cardiolipin/ β 2-glycoproteinimmunoassayet. Den rensede CAD-IgG-CH2-modubody blev påført i en fortyndingsserie med koncentrationerne 0 μ g/ml, 0,62 μ g/ μ l, 1,25 μ g/ml, 2,5 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 20 μ g/ml, 40 μ g/ml i kalibratorfortyndingsmedium på mikrotiterplader, der var belagt med β 2-glycoprotein i kompleks med cardiolipin. Antigen-bindingsaktiviteten blev

10 bestemt under inkubationsbetingelserne, der er beregnet til anti-cardiolipin-assayet (ORG 515, ORGENTEC GmbH, Mainz), og et anti-human-IgG-peroxidase-markeret sekundært antistof (Jackson Immunoresearch) i en koncentration på 200 ng/ml. På **figur 9** er forløbet af det under de valgte reaktionsbetingelser bestemte OD 450 nm vist afhængigt af koncentrationen.

15 Under de valgte reaktionsbetingelser blev CAD-IgG-CH2-modubody påvist ved en koncentration på 20 μ g/ml med et O.D. 450 nm på 1,7.

4.3.2 Stabilitet af CAD-IgG-CH2-modubody over for indtørring

20 Stabiliteten over for indtørring blev undersøgt, ved at fortyndinger af CAD-IgG-CH2-modubody i kalibratorfortyndingsmedium i 50 μ l portioner i koncentrationerne 0 μ g/ml, 3,1 μ g/ml, 6,21 μ g/ml, 12,5 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml blev tørret i en Speedvak-anordning under vakuum ved 22 °C. De tørrede prøver blev gensolubiliseret med et 450 μ l kalibratorfortyndingsmedium og 50 μ l

25 vand til en fortyndingsserie med koncentrationerne 0 μ g/ml, 0,31 μ g/ml, 0,62 μ g/ μ l, 1,25 μ g/ml, 2,5 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 20 μ g/ml og påført i sammenligning med en ubehandlet fortyndingsserie på mikrotiterplader, der var belagt med β 2-glycoprotein i kompleks med cardiolipin. Antigen-bindingsaktiviteten blev bestemt under inkubationsbetingelserne, der er beregnet til anti-cardiolipin-assayet (ORG

30 515, ORGENTEC GmbH, Mainz), og et anti-human-IgG-peroxidase-markeret sekundært antistof i en koncentration på 200 ng/ml. På **figur 10** er forløbet af det under de valgte reaktionsbetingelser bestemte OD 450 nm for de indtørrede prøver vist i sammenligning med den ubehandlede fortyndingsserie. Under de valgte reaktionsbetingelser blev funktionen af CAD-IgG-CH2-modubody i

fortyndinger i koncentrationsområdet på 3,1 µg/ml til 200 µg/ml ikke indskrænket som følge af indtørring.

4.3.3 Stabilitet af CAD-IgG-CH2-modubody over for nedfrysningsoptøningscyklusser

Stabiliteten over for gentagne nedfrysningsoptøningscyklusser blev undersøgt, idet fortyndinger af CAD-IgG-CH2-modubody i kalibratorfortyndingsmedium i 50 µl portioner i koncentrationerne 0 µg/ml, 3,1 µg/ml, 6,21 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml i fem gentagne nedfrysningsoptøningscyklusser blev nedfrosset ved -70 °C og optøet igen ved 37 °C. Efterfølgende blev prøverne fortyndet med 450 µl kalibratorfortyndingsmedium til en fortyndingsserie med koncentrationerne 0 µg/ml, 0,31 µg/ml, 0,62 µg/ml, 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml og i sammenligning med en ubehandlet CAD-IgG-CH2-fortyndingsserie påført på mikrotiterplader, der var belagt med β2-glycoprotein i kompleks med cardiolipin. Antigen-bindingsaktiviteten blev bestemt under inkubationsbetingelserne, der er beregnet til anti-cardiolipin-assayet (ORG 515, ORGENTEC GmbH, Mainz), og et anti-human-IgG-peroxidase-mærket sekundært antistof (Jackson Immunoresearch) i en koncentration på 200 ng/ml. På **figur 11** er forløbet af det under de valgte reaktionsbetingelser bestemte OD 450 nm vist for de gentagne gange nedfrosne og optøede prøver i sammenligning med den ubehandlede fortyndingsserie. Under de valgte reaktionsbetingelser blev funktionen af CAD-IgG-CH2-modubody i koncentrationsområdet på 3,1 µg/ml til 200 µg/ml ikke indskrænket som følge af gentagne nedfrysningsoptøningscyklusser.

Eksempel 5: Den enkeltkædede multifunktionelle CAD-IgM-IgA-IgG-modubody

I den enkeltkædede multifunktionelle modubody CAD-IgM-IgA-IgG er der indeholdt fire funktionsmoduler i en lineær rækkefølge. En β2-glycoproteinidentifikationsdomæne og flere reaktionsmoduler, der afledes af CH3-domæner af den tunge kæde i det humane immunglobulin IgM, IgA og IgG er

forbundet via peptidlinkere. Detektionen af CAD-IgM-IgA-IgG-modubody kan således foretages via forskellige isotypespecifikke sekundære antistoffer.

5.1 Konstruktion og kloning af den enkeltkædede CAD-IgM-IgA-IgG-modubody

5

Det følgende eksempel beskriver konstruktion og kloning af den β 2-glycoprotein-specifikke modubody CAD-IgM-IgA-IgG, der er forsynet med humane IgM-, IgG- og IgA-CH3-detektionsdomæner.

- 10 Til konstruktion af CAD-IgM-IgA-IgG-modubody blev modulerne scFv-CAD (eksempel 1) , IgM-CH3 (eksempel 2.7), IgA-CH3 (eksempel 2.5) og IgG-CH3 (eksempel 2.3) ved restriktionsfordøjelse og ligation i domænerækkefølgen VL-linker-VH-linker-IgM-CH3-linker-IgA-CH3-linker-IgG-CH3 sat sammen til en CAD-IgM-IgA-IgG kodende sekvens (SEQ ID NO: 29). Hertil blev reaktionsmodulerne
- 15 IgM-CH3, IgA-CH3 og IgG-CH3 i en iterativ proces fra restriktioner af vektorkonstrukter og insertligationer indsat i det under eksempel 1 beskrevne CAD-scFv-pQE80-vektorkonstrukt. I det første konstruktionstrin blev det under eksempel 2.7 beskrevne syntetiske IgM-CH3-reaktionsmodul Sc-RP-CH3-M-N i henhold til sekvens SEQ ID NO: 21 amplificeret med primerne CH09 (SEQ ID NO:
- 20 30) og CH04 (SEQ ID NO: 25) ved hjælp af PCR. 455 bp-amplifikatet blev gelisolereet efter agarosegelelektroforese med QiaExII-kittet (Qiagen, Hilden). Det gelisolerede fragment blev fordøjet med restriktionsenzymene Bell og HindIII. Restriktionsfragmenterne blev ligeret med det under eksempel 1 beskrevne scFv-CAD-pQE80-vektorkonstrukt, der blev fordøjet med de kompatible enzymer
- 25 BamHI og HindIII, og transformeret til *E. coli*-stamme NovaBlue (Merck, Nottingham) og udpladet på LB-agarplader, der var suppleret med carbenicillin (50 μ g/ml) og inkuberet natten over ved 36 °C. Fra en enkeltklon med korrekt insertligation blev der isoleret plasmid-DNA. I et andet konstruktionstrin blev det under eksempel 2.5 beskrevne syntetiske IgA-CH3-reaktionsmodul Sc-
- 30 RP-CH3-A-N i henhold til SEQ ID NO: 17 amplificeret med primerne CH07 (SEQ ID NO: 31) og CH04 (SEQ ID NO: 25) ved hjælp af PCR. 452 bp-amplifikatet blev gelisolereet efter agarosegelelektroforese med QiaExII-Kit (Qiagen, Hilden). Det isolerede fragment blev fordøjet med restriktionsenzymene Bell og HindIII. Restriktionsfragmenterne blev ligeret med vektorkonstruktet, som blev isoleret i

det første konstruktionstrin, og som blev fordøjet med de kompatible enzymer BamHI og HindIII, og transformeret til *E. coli*-stamme NovaBlue (Merck, Nottingham) og udpladet på LB-agarplader, der var suppleret med carbenicillin (50 µg/ml), og inkuberet natten over ved 36 °C. Fra en enkeltklon med

5 korrekt insertligation blev der isoleret plasmid-DNA. I et tredje konstruktionstrin blev det under eksempel 2.3 beskrevne syntetiske IgG-CH3-reaktionsmodul Sc-RP-CH3-G-N i henhold til sekvens SEQ ID NO: 13 amplificeret med primerne CH05 (SEQ ID NO: 24) og CH04 (SEQ ID NO: 25) ved hjælp af PCR. 434 bp-amplifikatet blev gelisolert efter agarosegelelektroforese med QiaExII-Kit (Qiagen,

10 Hilden). Det isolerede fragment blev fordøjet med restriktionsenzymene Bell og HindIII. Restriktionsfragmenterne blev liggeret med vektorkonstruktet, som blev isoleret i det andet konstruktionstrin, og som blev fordøjet med de kompatible enzymer BamHI og HindIII, og transformeret til *E. coli*-stamme NovaBlue (Merck, Nottingham). Transformationsopløsningen blev udpladet på LB-agarplader, der var

15 suppleret med carbenicillin (50 µg/ml), og inkuberet natten over ved 36 °C. Enkeltkolonier af den resulterende *E. coli*-stamme CAD-IgM-IgA-IgG-pQE80-NovaBlue blev formeret i LB-medium, der var suppleret med carbenicillin (50 µg/ml) (LB-Carb.) (36 °C, natten over 180 o/min). Fra enkeltklonkulturene blev der oprettet frysestammekulturer, 1 ml fra enkeltklonkulturene blev i hvert enkelt

20 tilfælde anvendt til plasmidpræparation. De isolerede plasmider blev analyseret ved hjælp af EcoRI/HindIII-fordøjelse. Kloner med et forventet 2173 bp-fragment blev undersøgt yderligere ved induktionsanalyse. Hertil blev de udvalgte enkeltkloner dyrket i LB-Carb og induceret ved en O.D.500 på 0,5 til 1,0 ved tilsætning af et kulturvolumen LB-Carb, der var suppleret med 1 mM IPTG,

25 til ekspresion af proteinet, der var kodet ved hjælp af det klonede DNA-konstrukt, og kultiveret i 16 timer ved 36 °C, 180 o/min. Induktionscellerne blev lyseret i SDS-prøvebuffer, proteiner blev separeret ved hjælp af SDS-PAGE. I Western-Blot blev ekspresionen af det forventede 72 kDa CAD-IgM-IgA-IgG-modubody påvist ved detektion med et Anti-RGS-6xHis-peroxidase-koblet antistof (Qiagen, Hilden). Den

30 korrekte kloning blev bekræftet ved sekvensering.

5.2 Ekspresion og rensning af den enkeltkædede CAD-IgM-IgA-IgG-modubody

Det følgende eksempel beskriver ekspresion og rensning af den β 2-glycoprotein-specifikke modubody CAD-IgM-IgA-IgG, der er forsynet med humant IgM-CH3, IgA-CH3 og IgG-CH3-detektionsdomæner.

- 5 Den under 5.1 med ekspresionskonstruktet transformerede *E. coli*-stamme CAD-IgM-IgA-IgG-pQE80-NovaBlue blev dyrket i LB-Carb medium ved 36 °C indtil et O.D.500 på 0,5 til 1.0 og induceret ved tilsætning af IPTG til syntese af CAD-IgM-IgA-IgG-modubody. Den inducerede kultur blev kultiveret ved 36 °C i 4 timer natten over. Induktionscellerne blev høstet og lyseret efter lysozymbehandling i et
- 10 8 M urinstof-holdigt TBS-buffer. Eksprimerede CAD-IgM-IgA-IgG-modubodies blev rensset ved hjælp af affinitetskromatografi. I det coomassieblåt farvede SDS-polyacrylamidgel er et 72 kDa-bånd synligt. Berigelsen af β 2-glycoprotein-bindingsaktiviteten og en reaktivitet med peroxidase-koblet anti-human-IgM, -IgA- og -IgG sekundære antistoffer (Jackson Immunoresearch) ledsages af rensningen
- 15 af 72 kDa-båndet.

5.3 Karakteristika af den enkeltkædede CAD-IgM-IgA-IgG-modubody

- Det følgende eksempel beskriver karakteriseringen af den β 2-glycoprotein-specifikke modubody CAD-IgM-IgA-IgG, der er forsynet med humane IgM-CH3-, IgA-CH3- og IgG-CH3-detektionsdomæner med hensyn til specifik
- 20 antigenidentifikation, specifik påviselighed via anti-human-IgM-, -IgA- og -IgG sekundære antistoffer og stabilitet over for nedfrysnings-optøningscyklusser.

25 5.3.1 Kalibratorfunktion af CAD-IgM-IgA-IgG-modubody

- For at bestemme, om CAD-IgM-IgA-IgG-modubody har bevaret β 2-glycoprotein-bindingsaktiviteten ved scFv-CAD, og bindingen til antigenet via forskellige isotypespecifikke anti-human sekundære antistoffer kan påvises, blev rensede
- 30 CAD-IgM-IgA-IgG-præparationer undersøgt i anti- β 2-glycoprotein/cardiolipin-immunoassayet. Den rensede CAD-IgM-IgA-IgG-modubody blev påført i en fortyndingsserie med koncentrationerne 0 μ g/ml, 0,31 μ g/ml, 0,62 μ g/ml, 1,25 μ g/ml, 2,5 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 20 μ g/ml i kalibratorfortyndingsmedium på mikrotiterplader belagt med β 2-glycoprotein i kompleks med cardiolipin. Antigen-

bindingsaktiviteten blev bestemt under inkubationsbetingelserne, der er beregnet til anti-cardiolipin-assayet (ORG 515, ORGENTEC GmbH, Mainz), i separate bestemmelser med anti-human-IgM-, anti-human-IgA- og anti-human-IgG-peroxidase-markerede sekundære antistoffer i koncentrationer på 80 ng/ml. På

5 **figur 12** er forløbet af OD 450 nm-bestemmelserne vist med de valgte detektionsantistoffer afhængigt af koncentrationen af CAD-IgM-IgA-IgG-modubody. Under de valgte reaktionsbetingelser blev CAD-IgM-IgA-IgG-modubody påvist ved en koncentration på 5 µg/ml ved detektion med anti-human-IgM, anti-human-IgA og anti-human-IgG sekundære antistoffer med O.D. 450 nm-

10 værdier på 2,8, 1,8 og 2,7.

5.3.2 Stabilitet af CAD-IgM-IgA-IgG-modubody over for indtørring

Stabilitet over for indtørring blev undersøgt, ved at fortyndinger af CAD-IgM-IgA-IgG-modubody i kalibratorfortyndingsmedium i 50 µl portioner i koncentrationerne

15 0 µg/ml, 3,1 µg/ml, 6,21 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml blev tørret i en Speedvak-anordning under vakuum ved 22 °C. De tørrede prøver blev gensolubiseret med 450 µl kalibratorfortyndingsmedium og 50 µl vand til en fortyndingsserie med koncentrationerne 0 µg/ml, 0,31 µg/ml, 0,62 µg/ml, 1,25

20 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml og ved sammenligning med en ubehandlet fortyndingsserie påført på mikrotiterplader belagt med β2-glycoprotein i kompleks med cardiolipin. Antigen-bindingsaktiviteten blev bestemt under inkubationsbetingelserne, der er beregnet til anti-cardiolipin-assayet (ORG 515, ORGENTEC GmbH, Mainz), i separate bestemmelser med anti-human-IgM-, anti-

25 human-IgA- og anti-human-IgG-peroxidase-markerede sekundære antistoffer (Jackson Immunoresearch) i koncentrationer på 80 ng/ml. På **figur 13** er forløbet af OD 450 nm-bestemmelserne vist med de valgte detektionsantistoffer ved ubehandlede prøvefortyndingstrin i en sammenligning med indtørrede prøvefortyndingstrin. Under de valgte reaktionsbetingelser blev funktionen af CAD-

30 IgM-IgA-IgG-modubody i fortyndinger i koncentrationsområdet på 3,1 µg/ml til 200 µg/ml ikke indskrænket som følge af indtørring.

5.3.2.3 Stabilitet af CAD-IgM-IgA-IgG-modubody over for nedfrysningsoptøningscykluser

Stabiliteten over for gentagne nedfrysningsoptøningscyklusser blev undersøgt, idet fortyndinger af CAD-IgM-IgA-IgG-modubody i kalibratorfortyndingsmedium i 50 µl portioner i koncentrationerne 0 µg/ml, 3,1 µg/ml, 6,21 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml in i fem gentagne nedfrysningsoptøningscyklusser blev nedfrosset ved -70 °C og optøet igen ved 37 °C. Efterfølgende blev prøverne med 450 µl kalibratorfortyndingsmedium fortyndet til en fortyndingsserie med koncentrationerne 0 µg/ml, 0,31 µg/ml, 0,62 µg/ml, 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml og ved sammenligning med en ubehandlet CAD-IgM-IgA-IgG-fortyndingsserie påført på mikrotiterplader belagt med β2-glycoprotein i kompleks med cardiolipin. Antigen-bindingsaktiviteten blev bestemt under inkubationsbetingelserne, der er beregnet til anti-cardiolipin-assayet (ORG 515, ORGENTEC GmbH, Mainz), i separate bestemmelser med anti-human-IgM-, anti-human-IgA- og anti-human-IgG-peroxidase-mærkede sekundære antistoffer (Jackson Immunoresearch) i koncentrationerne på 80 ng/ml. På **figur 14** er forløbet af OD 450 nm-bestemmelserne vist med de valgte detektionsantistoffer ved ubehandlede prøvefortyndingstrin i en sammenligning med de gentagne gange nedfrosne og optøede prøver. Under de valgte reaktionsbetingelser blev funktionen af CAD-IgM-IgA-IgG-modubody i fortyndinger i koncentrationsområdet på 3,1 µg/ml til 200 µg/ml ikke indskrænket som følge af gentagne nedfrysningsoptøningscyklusser.

Eksempel 6: Den enkeltkædede CAD-IgG-CH3-Knob02-modubody

6.1 Konstruktion og kloning af den enkeltkædede CAD-IgG-CH3-Knob02-modubody

Det følgende eksempel beskriver konstruktion og kloning af den enkeltkædede β2-glycoprotein-specifikke modubody CAD-IgG-CH3-Knob02, der er forsynet med et monomert modificeret humant IgG-CH3-Knob02-detektionsdomæne.

Til konstruktion af CAD-IgG-CH3-Knob02-modubody blev modulerne scFv-CAD (eksempel 1) og IgG-CH3-Knob02 (eksempel 2.9) ved restriktionsfordøjelse og ligation i domænerækkefølgen VL-linker-VH-linker-IgG-CH3-Knob02 sat sammen

til en CAD-IgG-CH3-Knob02 kodende sekvens (SEQ ID NO: 34). Hertil blev det under eksempel 2.9 beskrevne syntetiske IgG-CH3-Knob02-reaktionsmodul Sc-RP-CH3-Knob02-G-N i henhold til sekvens SEQ ID NO: 33 frigjort fra vektorkonstruktet IgG-CH3-Knob02-pMA ved fordøjelse med

5 restriktionsenzymene BamHI og HindII.

417 bp restriktionsfragmentet blev gelisoleret efter agarosegelelektroforese med QiaExII-kit (Qiagen, Hilden) og ligeret med det under eksempel 1 beskrevne CAD-scFv-pQE80-vektorkonstrukt, der blev fordøjet med de kompatible enzymer

10 BamHI og HindIII. Ligationsprodukterne blev transformeret til *E. coli*-stamme NovaBlue (Merck, Nottingham). Transformationsopløsningen blev udpladet på LB-agarplader, der var suppleret med carbenicillin (50 µg/ml), og inkuberet natten over ved 36 °C. Enkeltkolonier af den resulterende *E. coli*-stamme CAD-IgG-CH3-Knob02-pQE80-NovaBlue blev formeret i LB-medium, der var

15 suppleret med carbenicillin (50 µg/ml) (LB-Carb.), (36 °C, natten over, 180 o/min). Fra enkeltklonkulturerne blev der oprettet frysestammekulturer, 1 ml fra enkeltklonkulturerne blev i hvert enkelt tilfælde anvendt til plasmidpræparation. De isolerede plasmider blev analyseret ved hjælp af EcoRI/HindIII-fordøjelse. Kloner med et forventet 1308 bp-fragment blev undersøgt yderligere ved

20 induktionsanalyse. Hertil blev de udvalgte enkeltkloner dyrket i LB-Carb og induceret ved et O.D.500 på 0,5 til 1,0 ved tilsætning af et kulturvolumen LB-Carb., der var suppleret med 1 mM IPTG, til ekspresion af proteinet, der var kodet ved hjælp af det klonede DNA-fragment, og kultiveret i 16 timer ved 36 °C, 180

25 o/min. Induktionscellerne blev lyseset i SDS-prøvebuffer, proteiner blev separeret ved hjælp af SDS-PAGE. I Western-Blot blev ekspresionen af den forventede 44 kDa-CAD-IgG-CH3-Knob02-modubody påvist ved detektion med med et Anti-RGS-6xHis-peroxidase-koblet antistof (Qiagen, Hilden). Den korrekte kloning blev bekræftet ved sekvensering.

30 6.2 Ekspresion og rensning af den enkeltkædede CAD-IgG-CH3-Knob02-Modubodies

Det følgende eksempel beskriver ekspresion og rensning af den β 2-Glycoprotein-specifikke modubody CAD-IgG-CH3-Knob02, der er forsynet med et modificeret humant IgG-CH3-Knob02 detektionsdomæne.

- 5 Den under 6.1 med ekspresionskonstruktet transformerede *E. coli*-stamme CAD-IgG-CH3-Knob02-pQE80-NovaBlue blev dyrket i LB-Carb medium ved 36 °C indtil et O.D.500 på 0,5 til 1.0 og induceret ved tilsætning af IPTG til syntese af CAD-CAD-IgG-CH3-Knob02-modubody. Den inducerede kultur blev kultiveret ved 36 °C i 4 timer natten over. Induktionscellerne blev høstet og lyseret efter
- 10 lysozymbehandling i et 8 M urinstof-holdigt TBS-buffer. Eksprimerede CAD-IgG-CH3-Knob02-modubodies blev rensset ved hjælp af Ni-NTA-affinitetskromatografi. I det coomassieblåt farvede SDS-polyacrylamidgel er et 44 kDa-bånd synligt. Berigelsen af β 2-glycoprotein-bindingsaktiviteten og en reaktivitet med et peroxidase-koblet anti-human-IgG sekundært antistof (Jackson Immunoresearch)
- 15 ledsages af rensningen af 44 kDa-båndet.

6.3 Binding af CAD-IgG-CH3-Knob02-modubody til β 2-glycoprotein

- For at bestemme, om CAD-IgG-CH3-Knob02-modubody bevarede β 2-
- 20 glycoprotein-bindingsaktiviteten ved scFv-CAD, blev rensede CAD-IgG-CH3-Knob02-præparationer testet med immunoassays. Hertil blev fortyndingsserier for CAD-IgG-CH3-Knob02-modubody påført på mikrotiterplader til det med β 2-glycoprotein belagte anti- β 2-glycoprotein-assay (ORG 521, ORGENTEC Diagnostika GmbH, Mainz) og til kontrol af bindingsspecificiteten på BSA-belagte
 - 25 plader og inkuberet i 30 min ved 20-25 °C. Mikrotiterpladerne blev vasket, og bindingen ved CAD-IgG-CH3-Knob02-modubody blev bestemt med et peroxidase-markeret RGS-6X-His-antistof (Qiagen, Hilden) og en tetramethylbenzidin (TMB)-farvereaktion ved måling af O.D. 450 nm. På **figur 15** er forløbet af det under de
 - 30 valgte reaktionsbetingelser bestemte OD 450 nm vist afhængigt af koncentrationen. Allerede ved en koncentration af CAD-IgG-CH3-Knob02-modubody på 19 ng/ml blev der påvist en specifik binding til β 2-glycoprotein. Sammenligningen af reaktionsniveauet i CAD-IgG-CH3-Knob02-fortyndingstrinnene ved bindingen til β 2-Glycoprotein- henholdsvis BSA-belagte

mikrotiterplader viser, at der i koncentrationsområdet på 0,019-10 µg/ml CAD-IgG-CH3-Knob02 ikke forekommer en uspecifik binding.

SEQUENCE LISTING

5

<110> ORGENTEC Diagnostika GmbH

<120> Monospezifische Polypeptidreagenzien

<130> 46816P WO

<160> 34

10 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> WBCAL-1 VL

<400> 1

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 2
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> WBCAL-1 VH
 <400> 2

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Leu Asp Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

10 Ser Val
 <210> 3
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> peptide linker
 <400> 3

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Ser Gly Ser Gly
 35

- <210> 4
- <211> 276
- <212> PRT
- 5 <213> Artificial
- <220>
- <223> scFv-RP-CAD-P
- <220>
- <221> DOMAIN
- 10 <222> (1)..(118)
- <223> VL domain
- <220>
- <221> DOMAIN
- <222> (159)..(272)
- 15 <223> VH domain
- <400> 4

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

Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 20 25 30

Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu
 35 40 45

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

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

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

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly
 100 105 110

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Glu Val
 145 150 155 160

Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val
 165 170 175

Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met
 180 185 190

His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu
 195 200 205

Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Ser Tyr Asn Glu Lys Phe Arg Gly
 210 215 220

Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
 225 230 235 240

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
 245 250 255

Gly Thr Leu Asp Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
 260 265 270

Thr Val Ser Ser
 275

<210> 5

<211> 862

<212> DNA

5 <213> Artificial

<220>

<223> scFv-RP-CAD-N

<400> 5

```

ggtaccgat ccctggtcc gcgtggttct gatgttctga tgaccagac accgctgtct      60
ctgccggta gcctgggtga tcaggcaagc attagctgtc gtagcagcca gagcattggt     120
catagcaatg gcaataccta tctggaatgg tatctgcaga aaccgggtca gagcccgaaa     180
ctgctgattt ataaagtgag caatcgcttt agcgggtgtc cggatcgttt tagcggttca     240
ggttctggca ccgattttac cctgaaaatt agccgtgttg aagcagaaga tctgggctgtt     300
tattattggt ttcagggtag ccatgttccg tatacctttg gtggtggcac caaactggaa     360
attaaacgta ccggtagcgg tagtggaggt ggtggaagcg gtggtggcgg ttctggcggt     420
ggaggttctt ctggtggcgg tggatcaggt ggaggtggct caggcgggtg cggtagcggc     480
agcggtgaag ttcagctgca gcagagcggc ccggaactgg ttaaaccggg tgcaagcgtt     540
aaaattagct gtaaagccag cggctatacc tttaccgatt attatatgca ttgggttcgt     600
cagcgtccgg gtcagggtct ggaatggatt ggtgaaattt atccgggtag cggtaatacc     660
agctataatg aaaaatttct tggcaaagca accctgaccg cagataaaag cagcagcacc     720
gcatatatgc agctgtctag cctgaccagc gaagatagcg cagtttactt ttgtgcacgt     780
ggcaccctgg attataccat ggattattgg ggacagggca ccagcgttac cgttagcagc     840
ggatcctaataagcttgagc tc                                             862
    
```

10 <210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer RP-CAD01
<400> 6
agtagatctc tgggtccgcg tgggtct 27
<210> 7
5 <211> 18
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> primer RP-CAD02
10 <400> 7
ctcaagctta ttaggatc 18
<210> 8
<211> 131
<212> PRT
15 <213> Artificial
<220>
<223> Sc-RP-CH1-G-P
<220>
<221> DOMAIN
20 <222> (37)..(131)
<223> IgG-CH1 domain
<400> 8

50

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Ser Gly Ser Gly Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 35 40 45

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 50 55 60

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 65 70 75 80

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 85 90 95

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 100 105 110

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 115 120 125

Lys Val Glu
 130

<210> 9

<211> 427

<212> DNA

5 <213> Artificial

<220>

<223> Sc-RP-CH1-G-N

<400> 9

| | | |
|----|--|-----|
| | gagctcggat ccggcagtgg tggaggtggc tcaggcggag gtggaagcgg tggaggcggg | 60 |
| | tcttcaggtg gcggtggaag tggcgggtgga ggtagtggtg gcggaggctc tggatcaggt | 120 |
| | ggtccgagcg tttttccgct ggcaccgagc agcaaaagca ccagcgggtg cacagcagca | 180 |
| | ctgggctgtc tggtgaaaga ttattttccg gaaccgggta ccgtagctg gaatagcggg | 240 |
| | gcactgacca gcggtgttca tacctttccg gcagttctgc agagcagcgg tctgtatagc | 300 |
| | ctgagcagcg ttgttaccgt tccgtctagc agcctgggca cccagacctt tatttgcaat | 360 |
| | gtgaatcata aaccgagcaa tacgaaagtg gataaaaaag tgggaaggatc ctgataagct | 420 |
| | tgggtacc | 427 |
| | <210> 10 | |
| | <211> 138 | |
| | <212> PRT | |
| 5 | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Sc-RP-CH2-G-P | |
| | <220> | |
| | <221> DOMAIN | |
| 10 | <222> (37)..(138) | |
| | <223> IgG-CH2 domain | |
| | <400> 10 | |

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Ser Gly Ser Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 35 40 45

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 50 55 60

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 65 70 75 80

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 85 90 95

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

100

105

110

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 115 120 125

Pro Leu Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 130 135

<210> 11

5 <211> 448

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sc-RP-CH2-G-N

10 <400> 11

```

gagctcggat ccggttctgg tgggggaggg tctggcggag gtggctctgg cggaggcggg      60
tcaagcggtg gcggaggtag tggcggtggt ggtagtggag gcggaggctc tggttcaggt      120
ggtccggatg tttttctggt tccgcctaaa ccgaaagata ccctgatgat tagccgtaca      180
ccggaagtta cctgtgttgt tgttgatgtg agccatgaag atccggaagt gaaatttaat      240
tggtatgtgg atgggtgtgga agttcataat gccaaaacca aaccgcgtga agaacagtat      300
aatagcacct atcgtgttgt ttctgttctg accgttctgc atcaggattg gctgaatggc      360
aaagaatata aatgcaaagt gtctaataaa gcactgccgc tgccggaaga aaaaaccatt      420
agcaaaggat cctaataagc ttggtacc                                          448

```

<210> 12

<211> 135

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Sc-RP-CH3-G-P

<220>

<221> DOMAIN

10 <222> (37)..(135)

<223> IgG-CH3 domain

<400> 12

```

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1           5           10           15

```

```

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
          20           25           30

```

```

Ser Gly Ser Gly Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
          35           40           45

```

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 50 55 60

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 85 90 95

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 100 105 110

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 115 120 125

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 130 135

<210> 13

<211> 439

<212> DNA

5 <213> Artificial

<220>

<223> Sc-RP-CH3-G-N

<400> 13

gagctcggat ccggtagcgg tggtagtggt tctggcgggtg gtggcagcgg aggtggcggg 60

agctcagggtg gcggaggtag tggcgggtgga ggcagtggtg gcggtggctc tggatctggt 120

gaaccgcagg tttataacct gcctccgagc cgtgaagaaa tgaccaaaaa tcaggtttagc 180

ctgacctgtc tggtgaaag ttttatccg agcgatattg cagttgaatg ggaaagcaat 240

ggtcagccgg aaaataatta taaaaccaca cctccgggttc tggattctga tggtagcttt 300

tttctgtata gcaaaactgac cgttgataaa agccgttggc agcagggtaa tgttttttagc 360

tgtagcgta tgcataagc cctgcataat cattataccc agaaaagcct gagcctggga 420

10 tcctaataag cttggtacc 439

<210> 14

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial

<220>
 <223> Sc-RP-CH2-A-P
 <220>
 <221> DOMAIN
 5 <222> (37)..(133)
 <223> IgA-CH2 domain
 <400> 14
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 20 25 30
 Ser Gly Ser Gly Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu
 35 40 45
 Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg
 50 55 60
 Asp Ala Ser Gly Val Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser
 65 70 75 80
 Ala Val Gln Gly Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly Ser Tyr Ser Val
 85 90 95
 Ser Ser Val Leu Pro Gly Ser Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr
 100 105 110
 Phe Thr Cys Thr Ala Ala Tyr Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala
 115 120 125
 Thr Leu Ser Lys Ser
 130
 <210> 15
 10 <211> 433
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sc-RP-CH2-A-N

<400> 15
 gagctcggat ccggaagtgg cggaggcggg tcaggtggag gtggcagcgg aggtggcggg 60
 agctctgggtg gcggtggtag tggcgggtgga ggtagtggtg gcggaggctc tggttctggt 120
 cgtctgagcc tgcacgtcc ggcaactgaa gatctgctgc tgggtagcga agcaaatctg 180
 acctgtaccg tgaccggtct gcgtgatgca agcgggtgta catttacctg gaccccgagc 240
 agcggtaaaa gcgcagttca ggggccgcct gaacgtgatc tgtgtggtag ctatagcgtt 300
 agcagcgttc tgcctggtag cgcagaaccg tggaaatcatg gtaaaacctt tacctgtacc 360
 gcagcatatc cggaaagcaa aacaccgctg accgcaaccg tgagcaaaag cggatcctaa 420
 taagcttggg acc 433

<210> 16
 <211> 141

5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> sc-RP-CH3-A-P
 <220>

10 <221> DOMAIN
 <222> (37)..(141)
 <223> IgA-CH3 domain
 <400> 16

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Ser Gly Ser Gly Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu
 35 40 45

Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg Gly
 50 55 60

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

Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro Ser
 85 90 95

Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala Ala
 100 105 110

Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His Glu
 115 120 125

Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg
 130 135 140

<210> 17

<211> 457

<212> DNA

5 <213> Artificial

<220>

<223> sc-RP-CH3-A-N

<400> 17

| | | |
|----|--|-----|
| | gagctcggat ccggtagcgg aggtggcggg agcggagggtg gaggcagtgg tggaggcggg | 60 |
| | agctcagggtg gcggtggaag tggaggaggt ggctcagggg gtggaggttc tggttctggt | 120 |
| | cgtccggaag ttcactctgct gcctccgcct agcgaagaac tggcactgaa tgaactggtt | 180 |
| | accctgacct gtctggcacg tggttttagc ccgaaagatg ttctggttcg ttggctgcag | 240 |
| | ggtagccagg aactgcctcg cgaaaaatat ctgacctggg catctcgcca ggaaccgagc | 300 |
| | cagggcacca ccacctttgc agttaccagc attctgcgtg ttgcagcaga agattggaaa | 360 |
| | aaagcgata cctttagctg tatggttggg catgaagcac tgccgctggc atttaccag | 420 |
| | aaaaccatcg atcgcggatc ctaataagct tggtagc | 457 |
| | <210> 18 | |
| | <211> 148 | |
| 5 | <212> PRT | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Sc-RP-CH2-M-P | |
| | <220> | |
| 10 | <221> DOMAIN | |
| | <222> (37)..(148) | |
| | <223> IgM-CH2 domain | |
| | <400> 18 | |

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Ser Gly Ser Gly Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val
 35 40 45

Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile
 50 55 60

Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu
 65 70 75 80

Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln
 85 90 95

Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr
 100 105 110

Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Gly Gln Ser Met Phe Thr Cys
 115 120 125

Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Ser Ala Ser Ser Met
 130 135 140

Ser Val Pro Asp
 145

<210> 19

<211> 478

5 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sc-RP-CH2-M-N

<400> 19

gagctcggat ccggttcagg tgggtggtggt tctggtggtg gaggcagtgg aggtggcggg 60
 tctagcggtg gcggtggaag tggcggaggt ggcagtgggtg gcggtggctc tggttctggt 120
 attgcagaac tgcctccgaa agttagcgtt tttgttcctc cgcgtgatgg tttttttggt 180
 aatccgcgta aaagcaaact gatttgtcag gcaaccgggtt tttctccgcg tcagattcag 240
 gttagctggc tgcgtgaagg taaacaggtt ggtagcgggtg ttaccaccga tcaggttcag 300
 gcagaagcaa aagaaagcgg tccgaccacc tataaagtta ccagcacctt gaccattaaa 360
 gaaagcgatt ggctgggtca gagcatgttt acctgtcgtg ttgatcatcg tggctctgacc 420
 tttcagcaga gcgcaagcag catgagcgtt ccggatggat cctaataagc ttggtacc 478

<210> 20

<211> 142

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Sc-RP-CH3-M-P

<220>

<221> DOMAIN

10 <222> (37)..(142)

<223> IgM-CH3 domain

<400> 20

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro
 35 40 45

Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu
 50 55 60

Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg
 65 70 75 80

Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Ser Ile Ser Glu Ser His

85

90

95

Pro Ser Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Ser Glu Asp
 100 105 110

Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp
 115 120 125

Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly
 130 135 140

<210> 21

<211> 460

<212> DNA

5 <213> Artificial

<220>

<223> Sc-RP-CH3-M-N

<400> 21

gagctcggat ccggaagtgg tggaggtggc agcgggtggtg gtggctctgg tggagggcgg 60

agctcaggtg gcgggtgtag tggcgggtgga ggtagtgggtg gcggaggttc tggatctggt 120

caggataccg caattcgtgt ttttgcaatt cctccgagct ttgcaagcat ttttctgacc 180

aaaagcacca aactgacctg tctggttacc gatctgacca cctatgatag cgttaccatt 240

agctggaccc gtcagaatgg tgaagcagtt aaaaccata ccagcattag cgaaagccat 300

ccgagcgcaa cctttagcgc agttggtgaa gcaagcattt ctgaagatga ttggaatagc 360

ggtgaacggt ttacctgtac cgttacccat accgatctgc cgtcaccgct gaaacagacc 420

10 attagccgtc cgaaaggtgg atcctaataa gcttgggtacc 460

<210> 22

<211> 165

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Sc-RP-CH4-M-P

<220>

<221> DOMAIN

<222> (37)..(165)

<223> IgM-CH4 domain

<400> 22

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Ser Gly Ser Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro
35 40 45

Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys
50 55 60

Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln
65 70 75 80

Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met
85 90 95

Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr
100 105 110

Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Ala
115 120 125

His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser
130 135 140

Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Ser Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr
145 150 155 160

Ala Gly Thr Ser Tyr
165

5 <210> 23

<211> 529

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

10 <223> Sc-RP-CH4-M-N

<400> 23

gagctcggat ccggatctgg tggaggcgga tctggcggtg gaggcagcgg aggtggcgga 60
 agctcaggtg gcggtggaag tggcgggtgt ggtagtggtg gcggtggctc tggttctggt 120
 gttgcaactgc atcgtccgga tgtttatctg ctgcctccgg cacgtgaaca gctgaatctg 180
 cgtgaaagcg caaccattac ctgtctggtt accggttttt ctccggcaga tgtttttggt 240
 cagtggatgc agcgtggtca gccgctgtct ccggaaaaat atggtaccag cgcaccgatg 300
 ccggaaccgc aggcaccggg tcgttatattt gcacatagca ttctgaccgt tagcgaagaa 360
 gaatggaata caggcgaaac ctatacctgt gttgcacatg aagcactgcc gaatcgtggt 420
 accgaacgta ccggtgataa aagcaccggt aaaccgaccc tgtatagcgt tagcctggtt 480
 atgagcgata cagcaggcac aagctatgga tcctaataag cttggtacc 529
 <210> 24
 <211> 29
 <212> DNA
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> primer CH05
 <400> 24
 agttgatcag gtagcgggtg tgggtggtc 29
 10 <210> 25
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> primer CH04
 <400> 25
 taccaagctt attaggatc 19
 <210> 26
 <211> 1284
 20 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> CAD-IgG-CH3
 <400> 26

atgagaggat cgcacacacca tcacccatcac ggatctctgg ttccgcgtgg ttctgatggt 60
 ctgatgacct agacaccgct gtctctgccg gttagcctgg gtgatcaggc aagcattagc 120
 tgtcgtagca gccagagcat tgttcatagc aatggcaata cctatctgga atggtatctg 180
 cagaaaccgg gtcagagccc gaaactgctg atttataaag tgagcaatcg ctttagcggg 240
 gttccggatc gtttagcggg ttcagggttct ggcaccgatt ttaccctgaa aattagccgt 300
 gttgaagcag aagatctggg cgtttattat tgttttcagg gtagccatgt tccgtatacc 360
 tttgggtggg gcaccaaact ggaaattaaa cgtaccggtg gcggtagtg aggtggtgga 420
 agcgggtggg gcggttctgg cgggtggagg tcttctggg gcggtggatc aggtggagg 480
 ggctcaggcg gtggcggtag cggcagcggg gaagttcagc tgcagcagag cggccggaa 540
 ctggttaaac cgggtgcaag cgtaaaatt agctgtaaag ccagcggcta tacctttacc 600
 gattattata tgcattgggt tcgtcagcgt cccgggtcagg gtctggaatg gattggtgaa 660
 atttatccgg gtagcggtaa taccagctat aatgaaaaat ttcgtggcaa agcaaccctg 720
 accgcagata aaagcagcag caccgcata atgcagctgt ctagcctgac cagcgaagat 780
 agcgcagttt acttttgtgc acgtggcacc ctggattata ccatggatta ttggggacag 840
 ggcaccagcg ttaccgttag cagcggatca ggtagcggtg gtggtggttc tggcgggtgg 900
 ggcagcggag gtggcggtag ctccaggtggc ggaggtagtg gcggtggagg cagtgggtggc 960
 ggtggtctct gatctggtga accgcaggtt tataccctgc ctccgagccg tgaagaaatg 1020
 accaaaaatc aggttagcct gacctgtctg gtgaaagggt tttatccgag cgatattgca 1080
 gttgaatggg aaagcaatgg tcagccggaa aataattata aaaccacacc tccggttctg 1140
 gattctgatg gtagcttttt tctgtatagc aaactgaccg ttgataaaag ccgttggcag 1200
 cagggtaatg ttttagctg tagcgttatg catgaagccc tgcataatca ttatacccag 1260
 aaaagcctga gcctgggatc ctaa 1284

<210> 27

<211> 1293

5 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> CAD-IgG-CH2

<400> 27

atgagaggat cgcacacacca tcaccatcac ggatctctgg ttccgcgtgg ttctgatgtt 60
 ctgatgacct agacaccgct gtctctgccg gttagcctgg gtgatcaggc aagcattagc 120
 tgtcgtagca gccagagcat tgttcatagc aatggcaata cctatctgga atggtatctg 180
 cagaaaccgg gtcagagccc gaaactgctg atttataaag tgagcaatcg ctttagcggg 240
 gttccggatc gttttagcgg ttcaggttct ggcaccgatt ttaccctgaa aattagccgt 300
 gttgaagcag aagatctggg cgtttattat tgttttcagg gtagccatgt tccgtatacc 360
 tttggtggtg gcaccaaact ggaaattaaa cgtaccggtg gcggtagtg aggtggtgga 420
 agcgggtggtg gcggttctgg cgggtggaggt tcttctggtg gcggtggatc aggtggaggt 480
 ggctcaggcg gtggcggtag cggcagcggg gaagttcagc tgcagcagag cgggccggaa 540
 ctggttaaac cgggtgcaag cgtaaaatt agctgtaaag ccagcggcta tacctttacc 600
 gattattata tgcattgggt tcgtcagcgt cccgggtcagg gtctggaatg gattggtgaa 660
 atttatccgg gtagcggtaa taccagctat aatgaaaaat ttcgtggcaa agcaaccctg 720
 accgcagata aaagcagcag caccgcatat atgcagctgt ctagcctgac cagcgaagat 780
 agcgcagttt acttttgtgc acgtggcacc ctggattata ccatggatta ttggggacag 840
 ggcaccagcg ttaccgttag cagcggatca ggttctggtg ggggagggtc tggcggaggt 900
 ggctctggcg gaggcggttc aagcgggtgc ggaggtagtg gcggtggtgg tagtggaggc 960
 ggaggctctg gttcaggtgg tccggatggt tttctgtttc cgcctaaacc gaaagatacc 1020
 ctgatgatta gccgtacacc ggaagttacc tgtgttggtg ttgatgtgag ccatgaagat 1080
 ccggaagtga aatttaattg gtatgtggat ggtgtggaag ttcataatgc caaaacccaaa 1140
 ccgcgtgaag aacagtataa tagcacctat cgtgttggtt ctgttctgac cgttctgcat 1200
 caggattggc tgaatggcaa agaataaaa tgcaaagtgt ctaataaagc actgccgctg 1260
 ccggaagaaa aaaccattag caaaggatcc taa 1293

<210> 28

<211> 30

<212> DNA

5 <213> Artificial

<220>

<223> primer CH03

<400> 28

agttgatcag gttctggtgg gggagggct 30

10 <210> 29

<211> 2145

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> CAD-IgM-IgA-IgG

5 <400> 29

| | |
|---|------|
| atgagaggat cgcatcacca tcacatcac ggatctctgg ttccgcgtgg ttctgatggt | 60 |
| ctgatgacct agacaccgct gtctctgccc gttagcctgg gtgatcaggc aagcattagc | 120 |
| tgtcgtagca gccagagcat tgttcatagc aatggcaata cctatctgga atggtatctg | 180 |
| cagaaaccgg gtcagagccc gaaactgctg atttataaag tgagcaatcg ctttagcggg | 240 |
| gttccggatc gttttagcgg ttcagggttct ggcaccgatt ttaccctgaa aattagccgt | 300 |
| gttgaagcag aagatctggg cgtttattat tgttttcagg gtagccatgt tccgtatacc | 360 |
| tttgggtggtg gcaccaaact ggaaattaa cgtaccggtg gcggtagtgg aggtggtgga | 420 |
| agcgggtggtg gcggttctgg cgggtggaggt tcttctggtg gcggtggatc aggtggaggt | 480 |
| ggctcaggcg gtggcggtag cggcagcggg gaagttcagc tgcagcagag cgggccggaa | 540 |
| ctggttaaac cgggtgcaag cgttaaaatt agctgtaaag ccagcgggcta tacctttacc | 600 |
| gattattata tgcattgggt tcgtcagcgt ccgggtcagg gtctggaatg gattggtgaa | 660 |
| atztatccgg gtagcggtaa taccagctat aatgaaaaat ttcgtggcaa agcaaccctg | 720 |
| accgcagata aaagcagcag caccgcatat atgcagctgt ctagcctgac cagcgaagat | 780 |
| agcgcagttt acttttgtgc acgtggcacc ctggattata ccatggatta ttggggacag | 840 |
| ggcaccagcg ttaccgtag cagcggatca ggaagtgggt gaggtggcag cgggtggtggt | 900 |
| ggctctggtg gaggcggtag ctcaggtggc ggtggtagtg gcggtggagg tagtgggtggc | 960 |
| ggaggttctg gatctggtca ggataccgca attcgtgttt ttgcaattcc tccgagcttt | 1020 |
| gcaagcattt ttctgaccaa aagcaccaaa ctgacctgtc tggttaccga tctgaccacc | 1080 |
| tatgatagcg ttaccattag ctggaccctg cagaatgggt aagcagttaa aaccataacc | 1140 |
| agcattagcg aaagccatcc gagcgaacc tttagcgcag ttggtgaagc aagcatttct | 1200 |
| gaagatgatt ggaatagcgg tgaacgtttt acctgtaccg ttaccatac cgatctgccg | 1260 |
| tcaccgctga aacagacat tagccgtccg aaaggtggat caggtagcgg aggtggcggg | 1320 |

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------|
| agcggaggtg | gaggcagtgg | tggaggcggg | agctcaggtg | gcggtggaag | tggtggaggt | 1380 |
| ggctcagggg | gtggaggttc | tggttctggt | cgtccggaag | ttcatctgct | gcctccgcct | 1440 |
| agcgaagaac | tggcactgaa | tgaactggtt | accctgacct | gtctggcacg | tggttttagc | 1500 |
| ccgaaagatg | ttctggttcg | ttggctgcag | ggtagccagg | aactgcctcg | cgaaaaatat | 1560 |
| ctgacctggg | catctcgcca | ggaaccgagc | cagggcacca | ccacctttgc | agttaccagc | 1620 |
| attctgcgtg | ttgcagcaga | agattggaaa | aaaggcgata | cctttagctg | tatggttggt | 1680 |
| catgaagcac | tgccgctggc | atttaccag | aaaaccatcg | atcgcggatc | aggtagcggg | 1740 |
| ggtggtgggt | ctggcgggtg | tggcagcggg | ggtggcggta | gctcaggtgg | cggaggtagt | 1800 |
| ggcgggtggg | gcagtgggtg | cggtggctct | ggatctggtg | aaccgcaggt | ttataccctg | 1860 |
| cctccgagcc | gtgaagaaat | gaccaaaaat | caggttagcc | tgacctgtct | ggtgaaaggt | 1920 |
| ttttatccga | gcgatattgc | agttgaatgg | gaaagcaatg | gtcagccgga | aaataattat | 1980 |
| aaaaccacac | ctccggttct | ggattctgat | ggtagctttt | ttctgtatag | caaactgacc | 2040 |
| gttgataaaa | gccgttggca | gcagggtaat | gttttttagct | gtagcggtat | gcatgaagcc | 2100 |
| ctgcataatc | attataccca | gaaaagcctg | agcctgggat | cctaa | | 2145 |

<210> 30

<211> 28

5 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer CH09

<400> 30

10 agttgatcag gaagtgggtg aggtggca 28

<210> 31

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

15 <220>

<223> primer CH07

<400> 31

agttgatcag gtagcggagg tggcggaa 28

<210> 32

20 <211> 135

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sc-RP-CH3-Knob02-P
 5 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (37)..(135)
 <223> IgG-CH3-Knob02 domain
 <400> 32
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 20 25 30
 Ser Gly Ser Gly Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 35 40 45
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Tyr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 50 55 60
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 65 70 75 80
 Asn Asn Tyr Lys Thr Tyr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 85 90 95
 Tyr Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 100 105 110
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 115 120 125
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 10 130 135
 <210> 33
 <211> 423
 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sc-RP-CH3-Knob02-N

<400> 33

| | | |
|---|---|-----|
| | ggatccggta gcggtggtgg tggtagtggg gccggtggtt caggtggtgg tggcagcagt | 60 |
| | ggtggtggcg gttctggcgg tggcggttca ggtggcggag gtagcggtag cggggaaccg | 120 |
| | caggtttata ccctgcctcc gagccgtgaa gaaatgacca aaaatcaggt tagcctgtat | 180 |
| | tgcctggtga aaggttttta tccgagcgat attgcagttg aatgggaaag caatggtcag | 240 |
| | ccgaaaaata actataaaac ctatccgcct gtgctggata gtgatggtag cttttatctg | 300 |
| | tatagcaaac tgaccgtgga taaaagccgt tggcagcagg gtaatgtttt tagctgtagc | 360 |
| | gttatgcatg aagccctgca taatcactac acccagaaaa gcctgagcct gtaataaaag | 420 |
| 5 | ctt | 423 |

<210> 34

<211> 1281

<212> DNA

10 <213> Artificial

<220>

<223> CAD-IgG-CH3-Knob02

<400> 34

| | | | | | | |
|-------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
| atgagaggat | cgcatcacca | tcacccatcac | ggatctctgg | ttccgcgtgg | ttctgatggt | 60 |
| ctgatgacct | agacaccgct | gtctctgccg | gtagcctgg | gtgatcaggc | aagcattagc | 120 |
| tgtcgtagca | gccagagcat | tgttcatagc | aatggcaata | cctatctgga | atggtagctg | 180 |
| cagaaaccgg | gtcagagccc | gaaactgctg | atztataaag | tgagcaatcg | ctttagcggg | 240 |
| gttccggatc | gttttagcgg | ttcaggttct | ggcaccgatt | ttaccctgaa | aattagccgt | 300 |
| gttgaagcag | aagatctggg | cgtttattat | tgttttcagg | gtagccatgt | tccgtatacc | 360 |
| tttgggtggtg | gcaccaaact | ggaaattaaa | cgtaccggtg | gcggtagtg | aggtggtgga | 420 |
| agcgggtggtg | gcggttctgg | cgggtggaggt | tcttctggtg | gcggtggatc | aggtggaggt | 480 |
| ggctcaggcg | gtggcggtag | cggcagcggg | gaagttcagc | tgacagcagag | cgggtccggaa | 540 |
| ctggttaaac | cgggtgcaag | cgtaaaaatt | agctgtaaag | ccagcgggcta | tacctttacc | 600 |
| gattattata | tgattgggt | tcgtcagcgt | ccgggtcagg | gtctggaatg | gattggtgaa | 660 |
| atztatccgg | gtagcggtaa | taccagctat | aatgaaaaat | ttcgtggcaa | agcaaccctg | 720 |
| accgcagata | aaagcagcag | caccgcataat | atgcagctgt | ctagcctgac | cagcgaagat | 780 |
| agcgcagttt | acttttgtgc | acgtggcacc | ctggattata | ccatggatta | ttggggacag | 840 |
| ggcaccagcg | ttaccgttag | cagcggatcc | gtagcgggtg | gtggtggtag | tggtggcggg | 900 |
| ggttcagggtg | gtggtggcag | cagtgggtgt | ggcggttctg | gcggtggcgg | ttcaggtggc | 960 |
| ggaggtagcg | gtagcggtag | accgcaggtt | tataccctgc | ctccgagccg | tgaagaaatg | 1020 |
| acaaaaaatc | aggttagcct | gtattgcctg | gtgaaaggtt | tttatccgag | cgatattgca | 1080 |
| gttgaatggg | aaagcaatgg | tcagccggaa | aataactata | aaacctatcc | gcctgtgctg | 1140 |
| gatagtgatg | gtagctttta | tctgtatagc | aaactgaccg | tgataaaaag | ccgttggcag | 1200 |
| cagggtaatg | tttttagctg | tagcgttatg | catgaagccc | tgataaatca | ctacaccag | 1260 |
| aaaagcctga | gcctgtaata | a | | | | 1281 |

Patentkrav

1. Monovalent fusionspolypeptid, der foreligger som monomer, omfattende
 - (i) et første domæne, der omfatter den variable tungkædereion af et antistof
 - 5 (VH) eller i det mindste et afsnit heraf, der formidler antigenbindingen,
 - (ii) et andet domæne, der omfatter den variable letkædereion af et antistof (VL) eller i det mindste et afsnit heraf, der formidler antigenbindingen, og
 - (iii) et tredje domæne, der omfatter et afsnit af en konstant tungkædereion af et antistof (CHX),
- 10 hvor domænet (iii) har en længde på 80-130 aminosyrerester, og aminosyrepositioner, hvis sidekæder har interaktioner i henhold til konceptet for „knobs-into-holes“-anordningen, er modificeret, hvor domænerne (i), (ii) og (iii) er forbundet med hinanden via peptidlinkere (L),
- 15 hvor peptidlinkerne (L) uafhængigt af hinanden har en længde på 25-45 aminosyrerester og udelukkende består af glycin- og/eller serinrester, og hvor fusionspolypeptidet ikke danner intermolekylære disulfidbroer og ikke indeholder hinge-regioner af antistoffer.
- 20 2. Fusionspolypeptid ifølge krav 1, omfattende strukturen
VH - L - VL - L - CHX eller
VL-L-VH-L-CHX.
3. Fusionspolypeptid ifølge et af kravene 1 til 2, ved hvilket domænerne (i), (ii)
- 25 og (iii) hver især har en længde på 80-130 aminosyrerester.
4. 4. Fusionspolypeptid ifølge et af kravene 1 til 3, ved hvilket domænet (iii) er udvalgt fra afsnittene CH1, CH2, CH3 og CH4 af antistoffer, fortrinsvis af humane antistoffer fra klasserne IgG, IgM, IgE og IgA eller kombinationer af disse afsnit.
- 30 5. Fusionspolypeptid ifølge et af kravene 1 bis 4, ved hvilket peptidlinkerne uafhængigt af hinanden har en længde på 30-40 aminosyrerester.

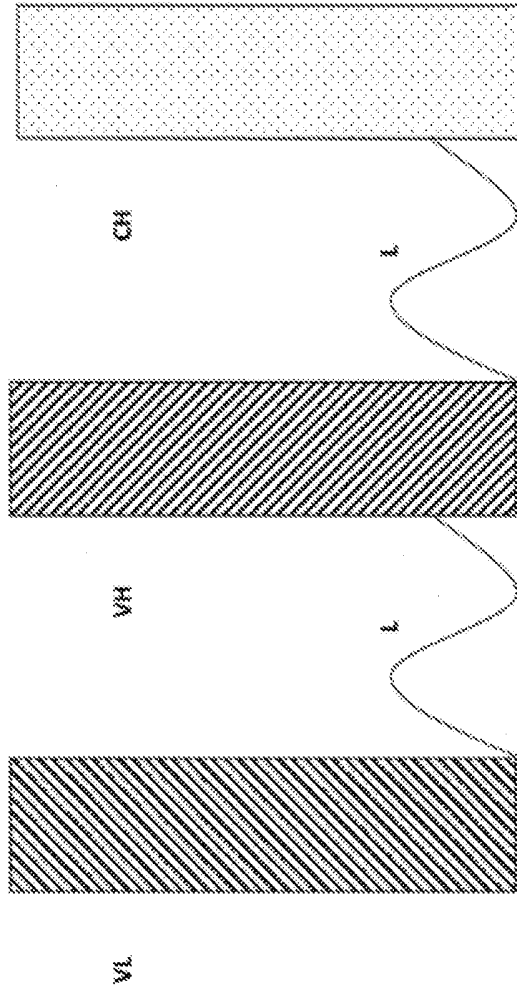
6. Fusionspolypeptid ifølge et af kravene 1 til 5, der indeholder i det mindste et yderligere domæne, f.eks. en signalpeptid og/eller en peptid-tag.
7. Fusionspolypeptid ifølge et af kravene 1 til 6, der indeholder et eller flere domæner VH, VL og/eller CHX, der har en identitet på aminosyreniveau på mindst 90 %, fortrinsvis på mindst 95 % i forhold til de tilsvarende domæner i henhold til SEQ ID NO: 1 (VL), SEQ ID NO: 2 (VH), SEQ ID NO: 4 (VH, VL), SEQ ID NO: 8 (IgG-CH1), SEQ ID NO: 10 (IgG-CH2), SEQ ID NO: 12 (IgG-CH3), SEQ ID NO: 14 (IgA-CH2), SEQ ID NO: 16 (IgA-CH3), SEQ ID NO: 18 (IgM-CH2), SEQ ID NO: 20 (IgM-CH3) eller SEQ ID NO: 22 (IgM-CH4).
8. Fusionspolypeptid ifølge et af kravene 1 til 7, ved hvilket i det mindste en asparaginrest fra en glykosileringsposition er erstattet af en anden aminosyrerest, fortrinsvis serin, alanin eller glycin, og/eller ved hvilket i det mindste en cysteinrest er erstattet af en anden aminosyrerest, fortrinsvis serin, alanin eller glycin.
9. Nukleinsyre, kodende for et fusionspolypeptid ifølge et af kravene 1 til 8, eventuelt i en operativ forbindelse med en ekspressionskontrolsekvens.
10. Nukleinsyre ifølge krav 9, der er codonoptimeret i forhold til en ekspression i en udvalgt værtscelle, f.eks. en bakterie som eksempelvis *E. coli*.
11. Værtscelle, der indeholder en nukleinsyre ifølge et af kravene 9 til 10.
12. Fremgangsmåde til fremstilling af et fusionspolypeptid ifølge et af kravene 1 til 8, omfattende kultivering af en værtscelle ifølge krav 11 og udvinding af fusionspolypeptidet fra cellen eller kultursupernataten.
13. Anvendelse af et fusionspolypeptid ifølge et af kravene 1 til 8 som reagens i en diagnostisk eller biokemisk test, fortrinsvis
- (i) som kontrol- eller kalibratorreagens eller
 - (ii) som testreagens til bestemmelse af en analyt.

14. Fusionspolypeptid ifølge et af kravene 1 til 8, nukleinsyre ifølge krav 9 eller 10 eller værtscelle ifølge krav 11 til anvendelse inden for medicin, f.eks. inden for human- eller veterinærmedicin.

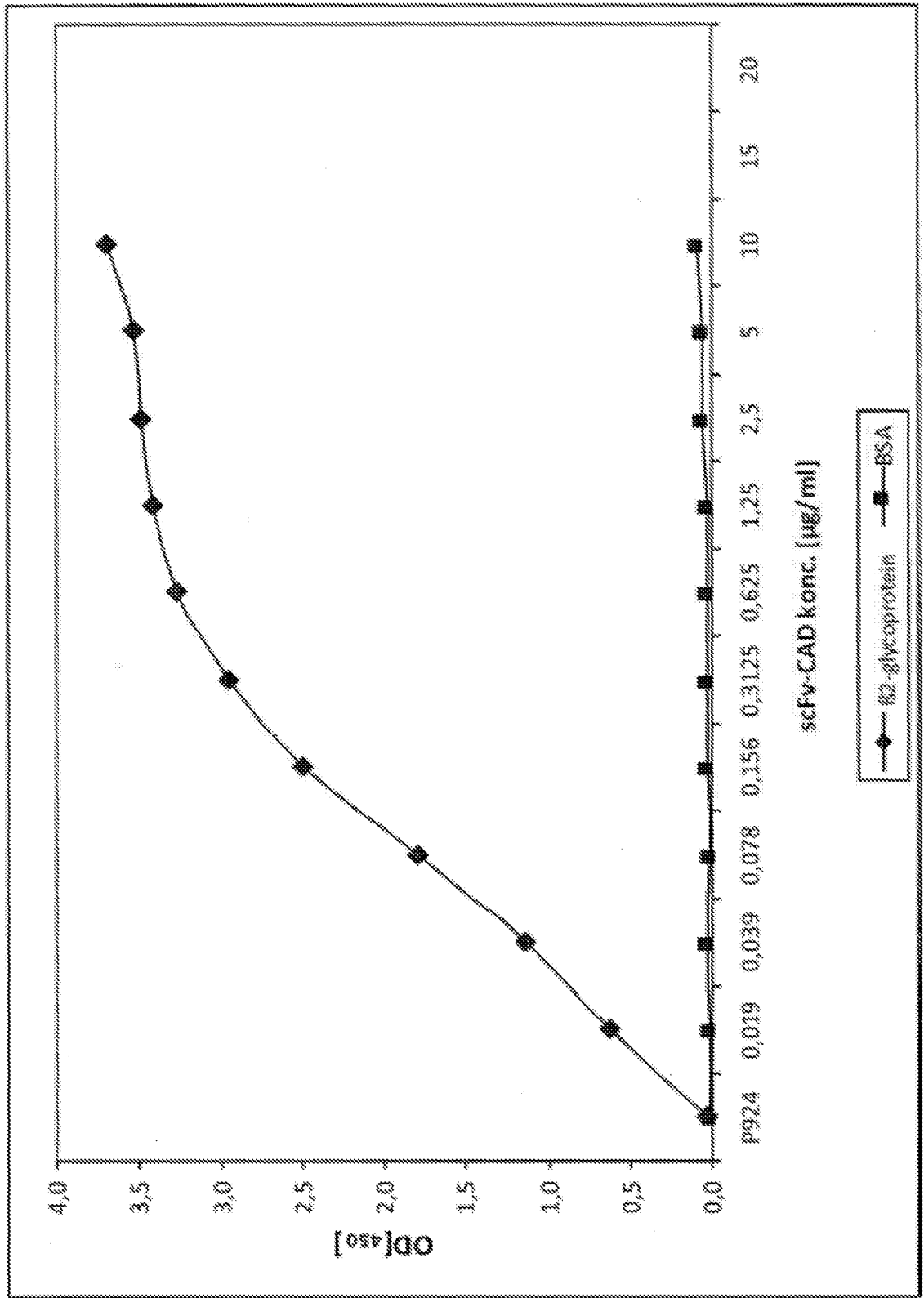
5

15. Farmaceutisk sammensætning, der indeholder et fusionspolypeptid ifølge et af kravene 1 til 8, en nukleinsyre ifølge krav 9 eller 10 eller en værtscelle ifølge krav 11 sammen med farmaceutisk egnede bærestoffer.

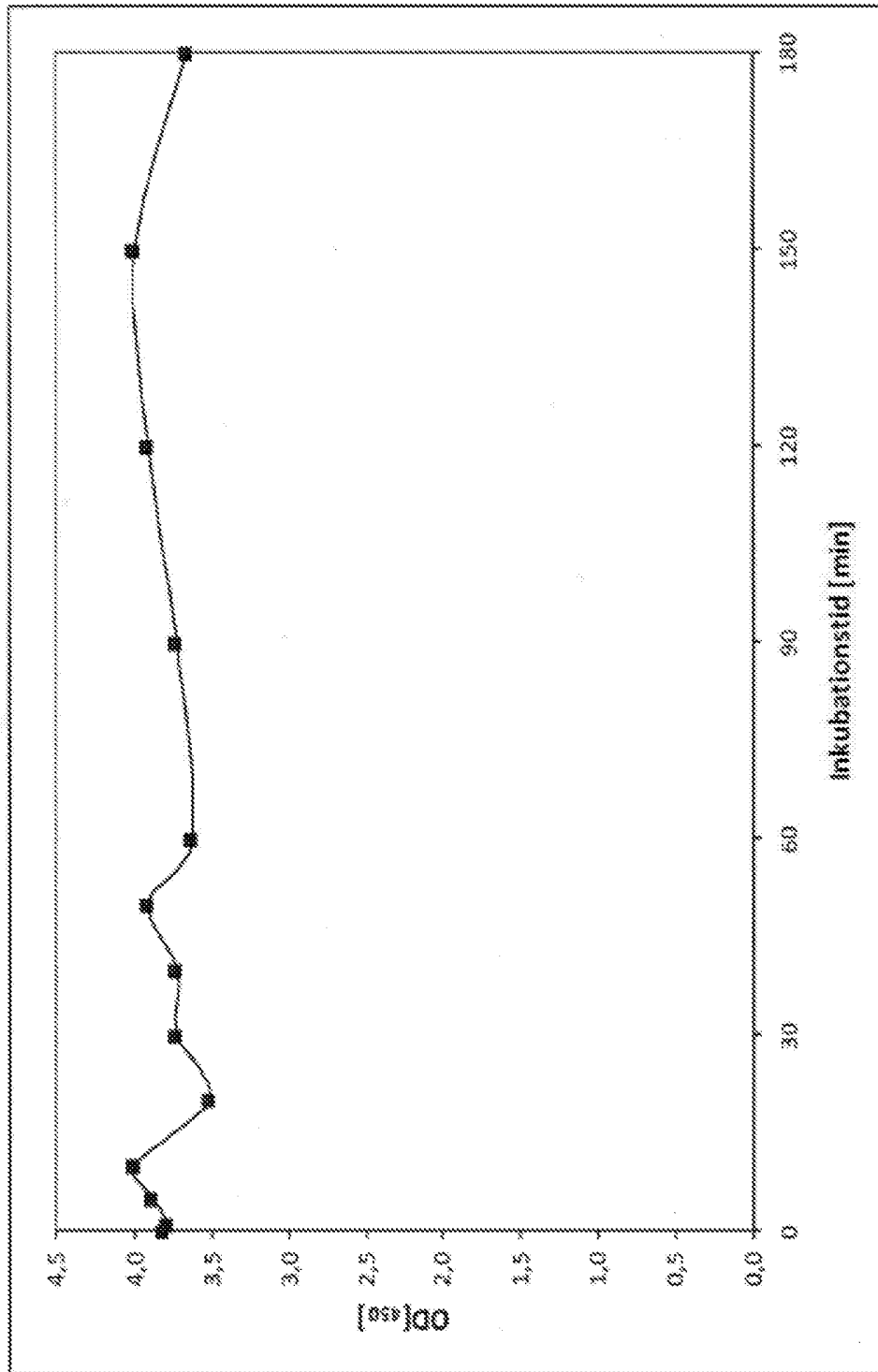
Figur 1



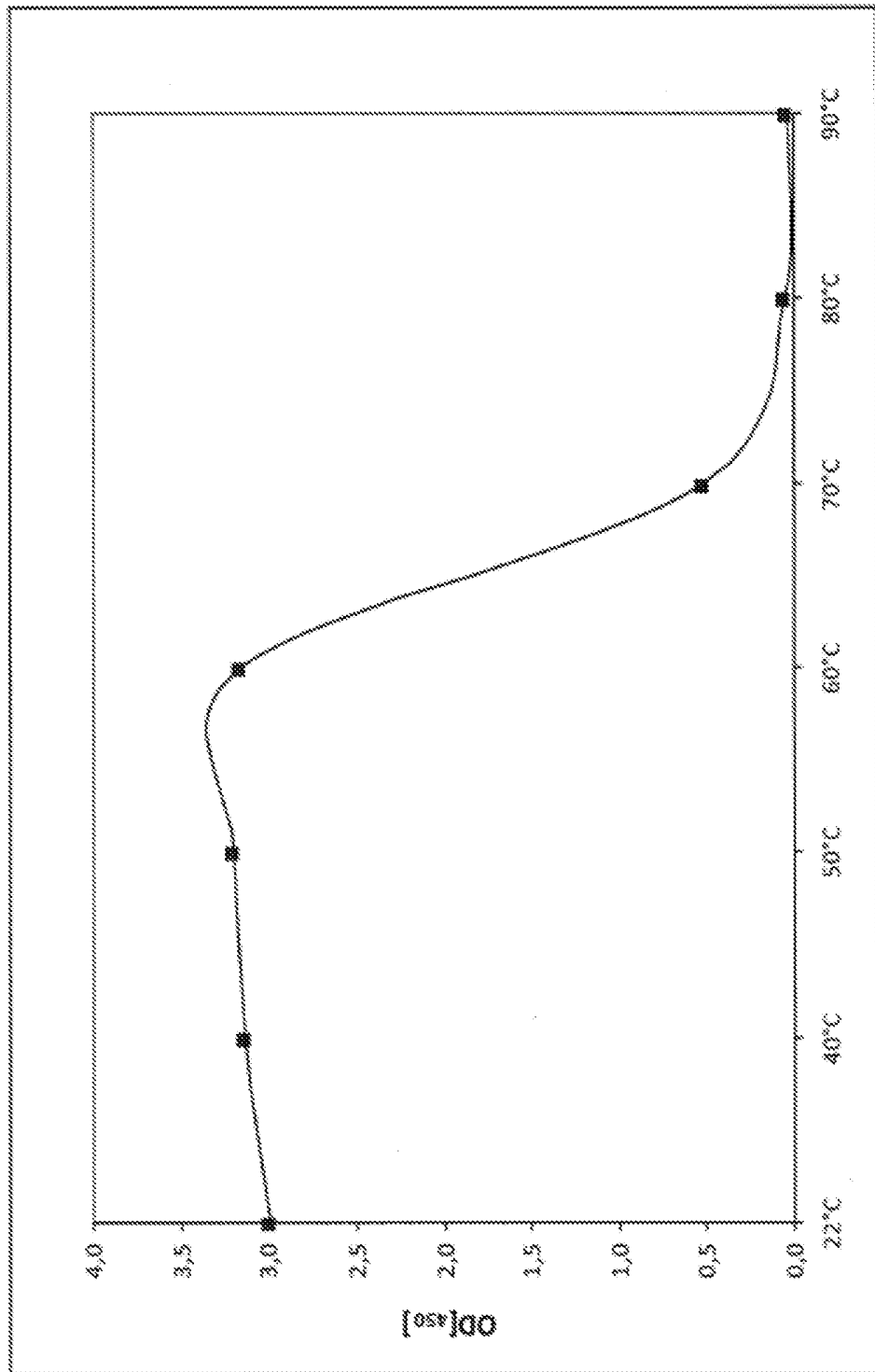
Figur 2



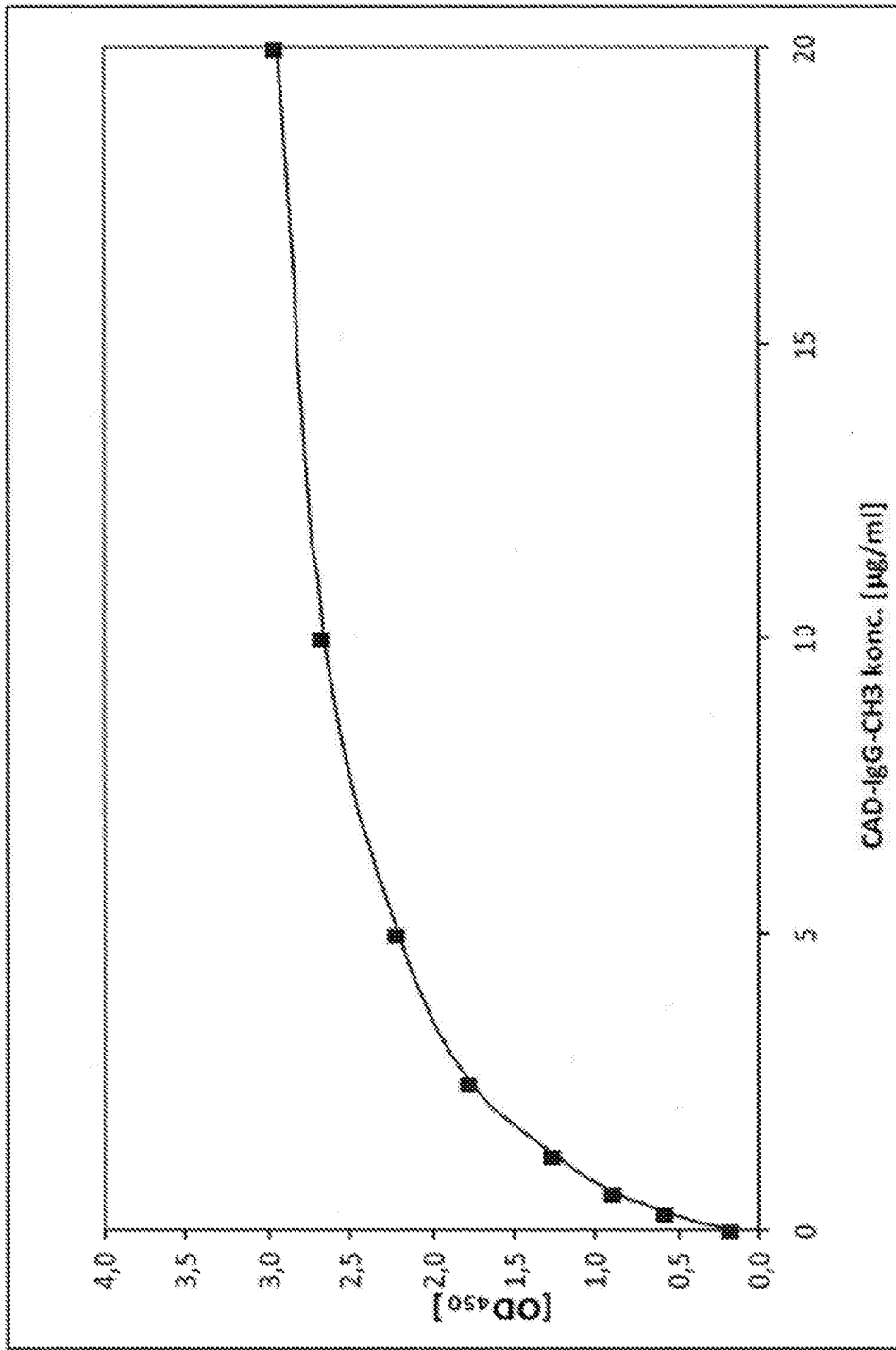
Figur 3A

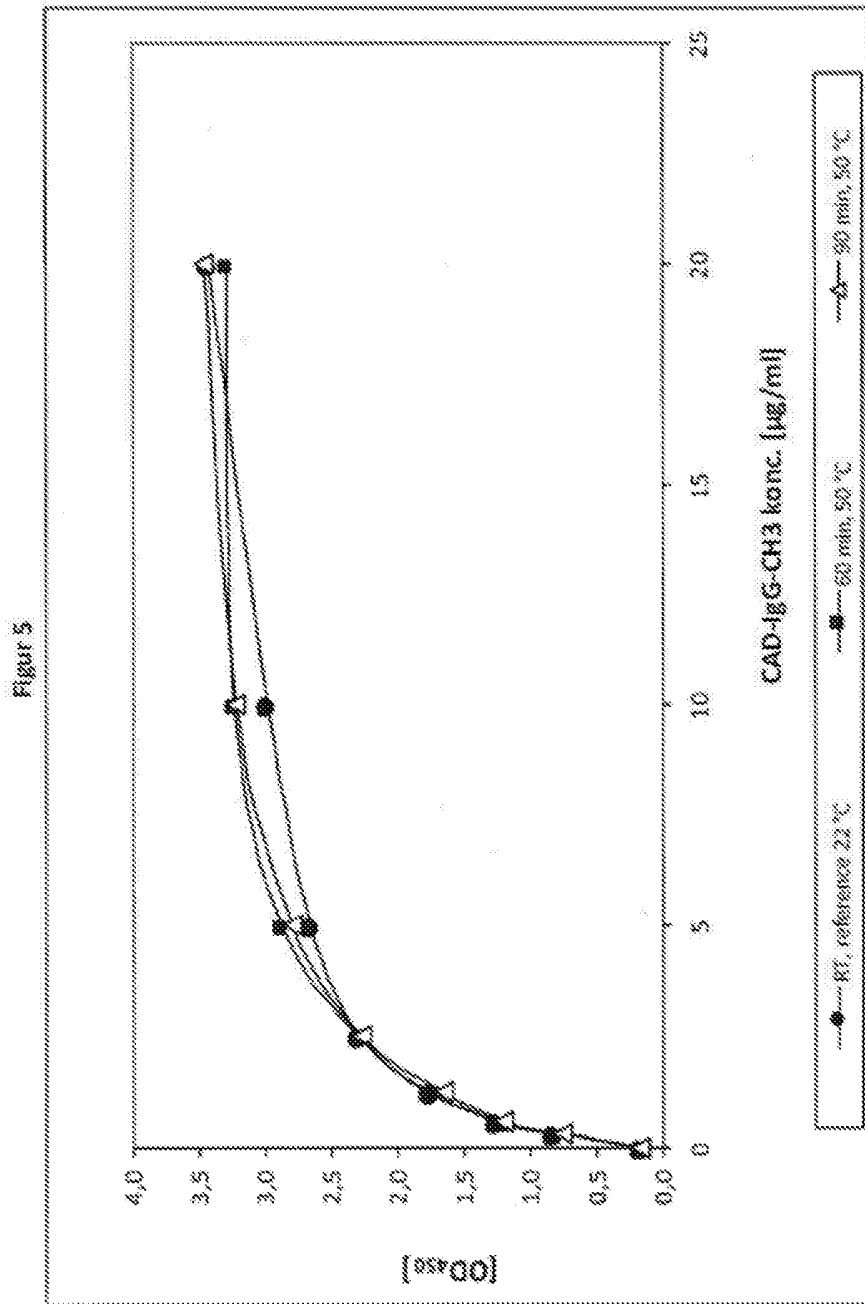


Figur 3B

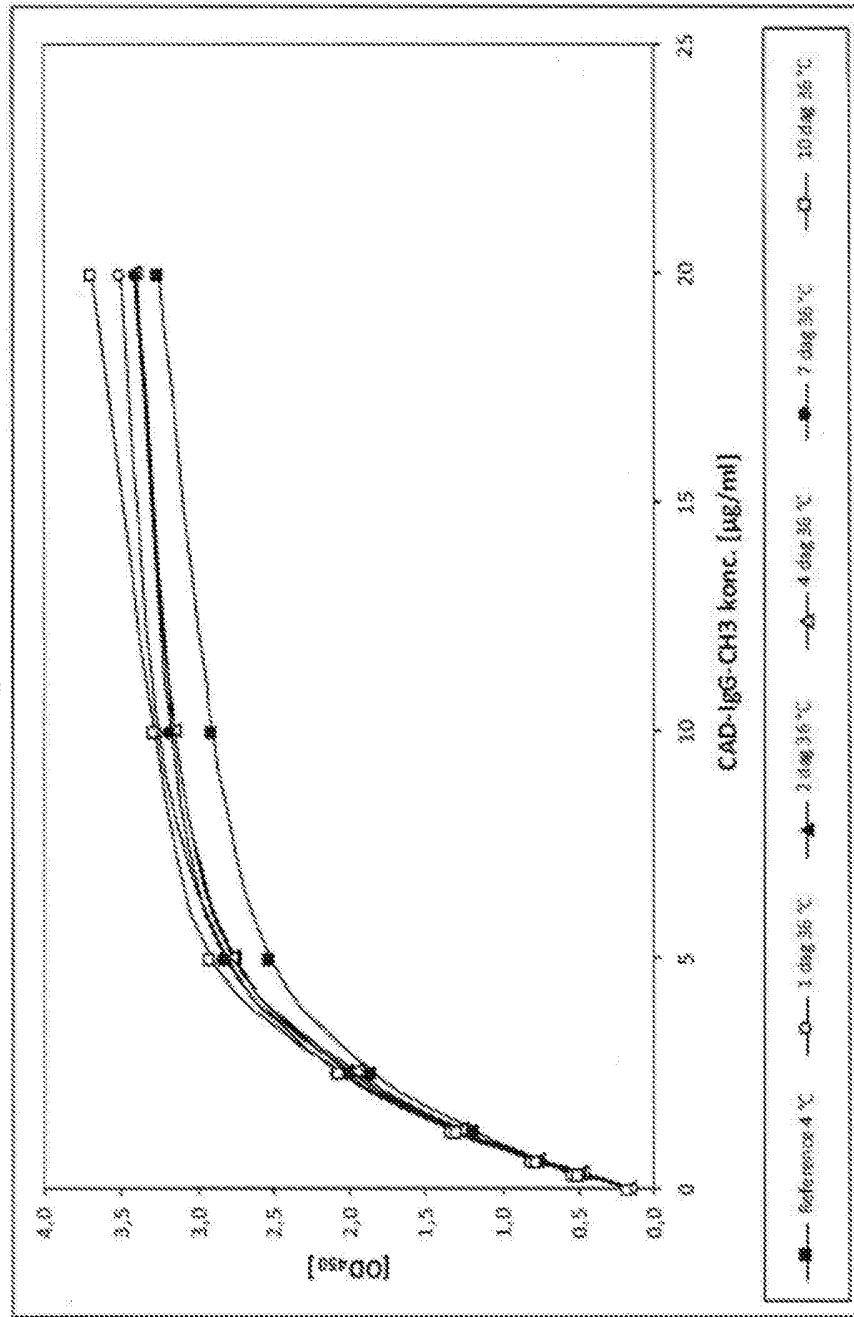


Figur 4

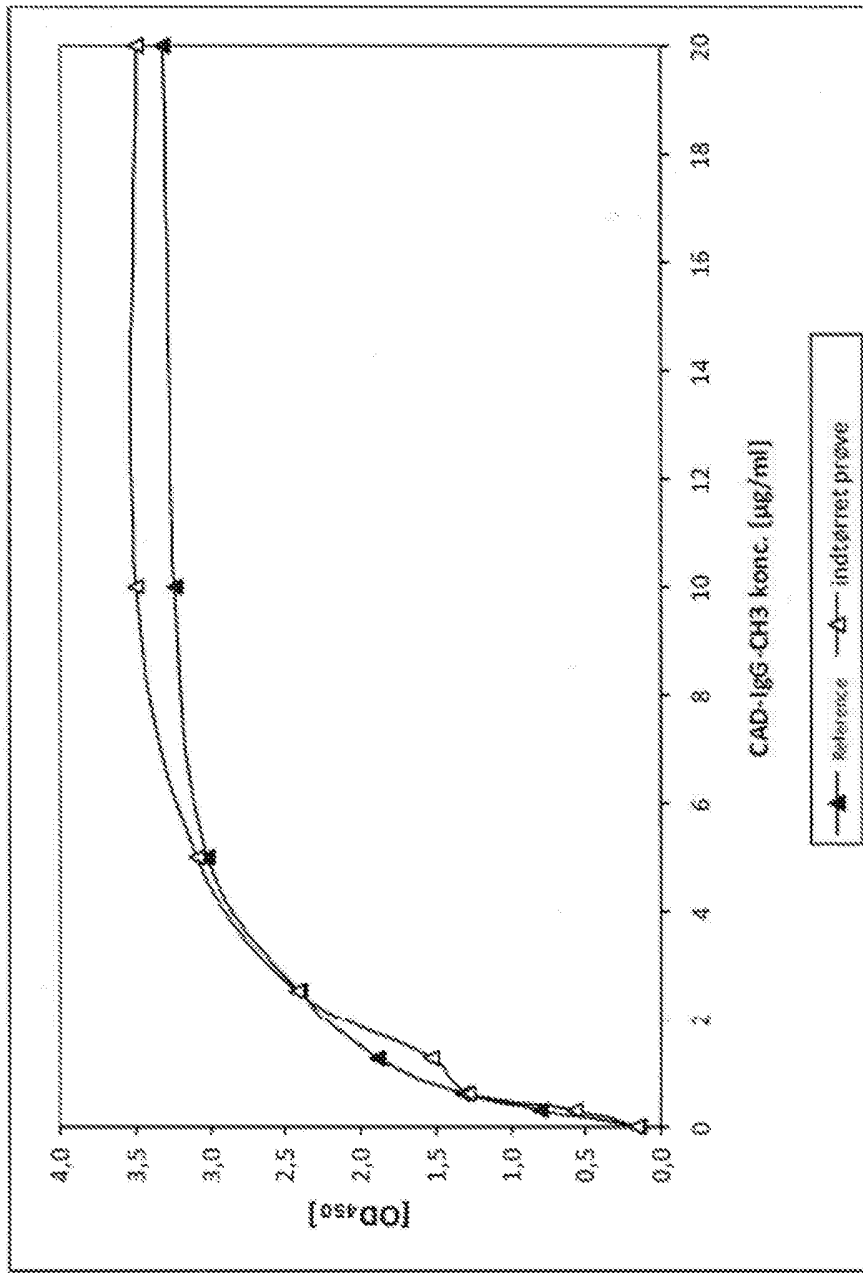




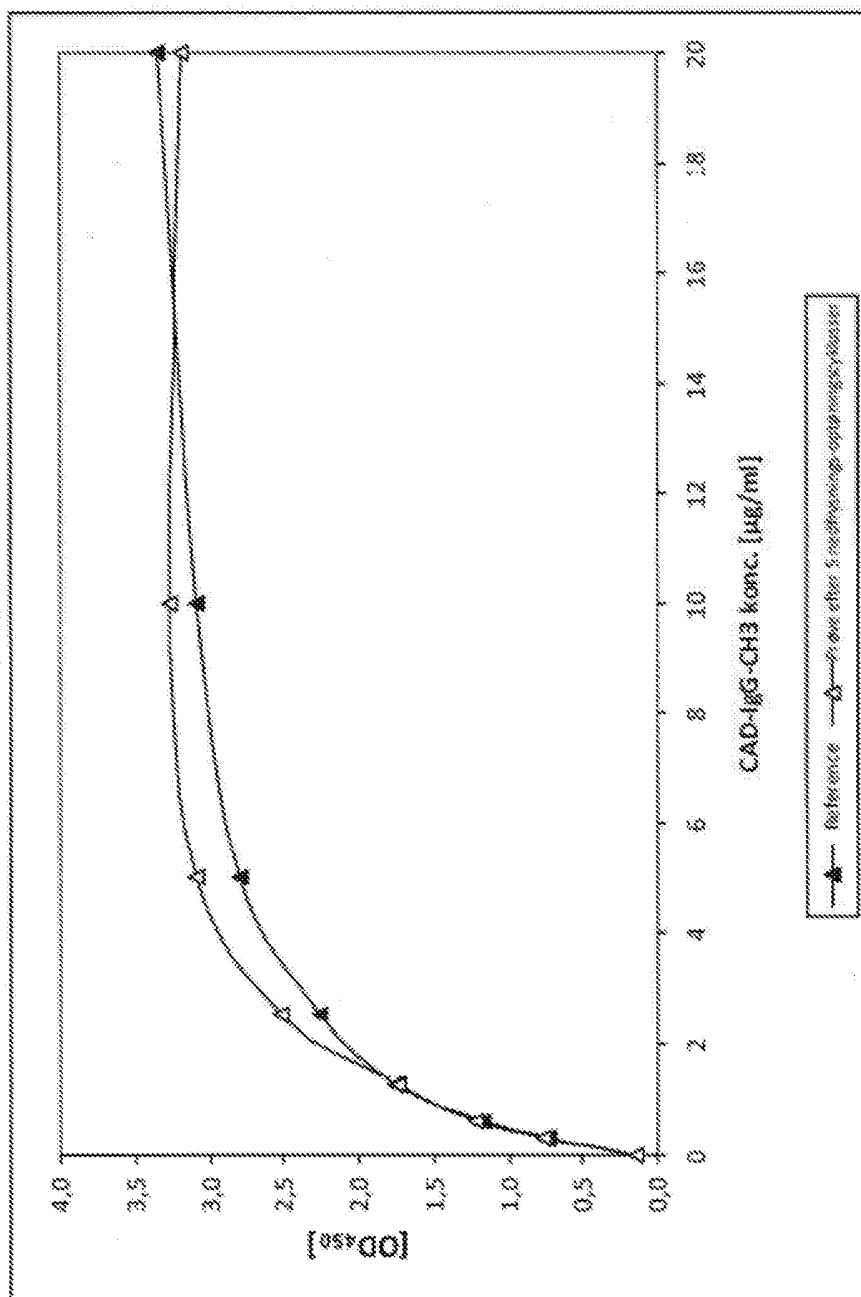
Figur 6



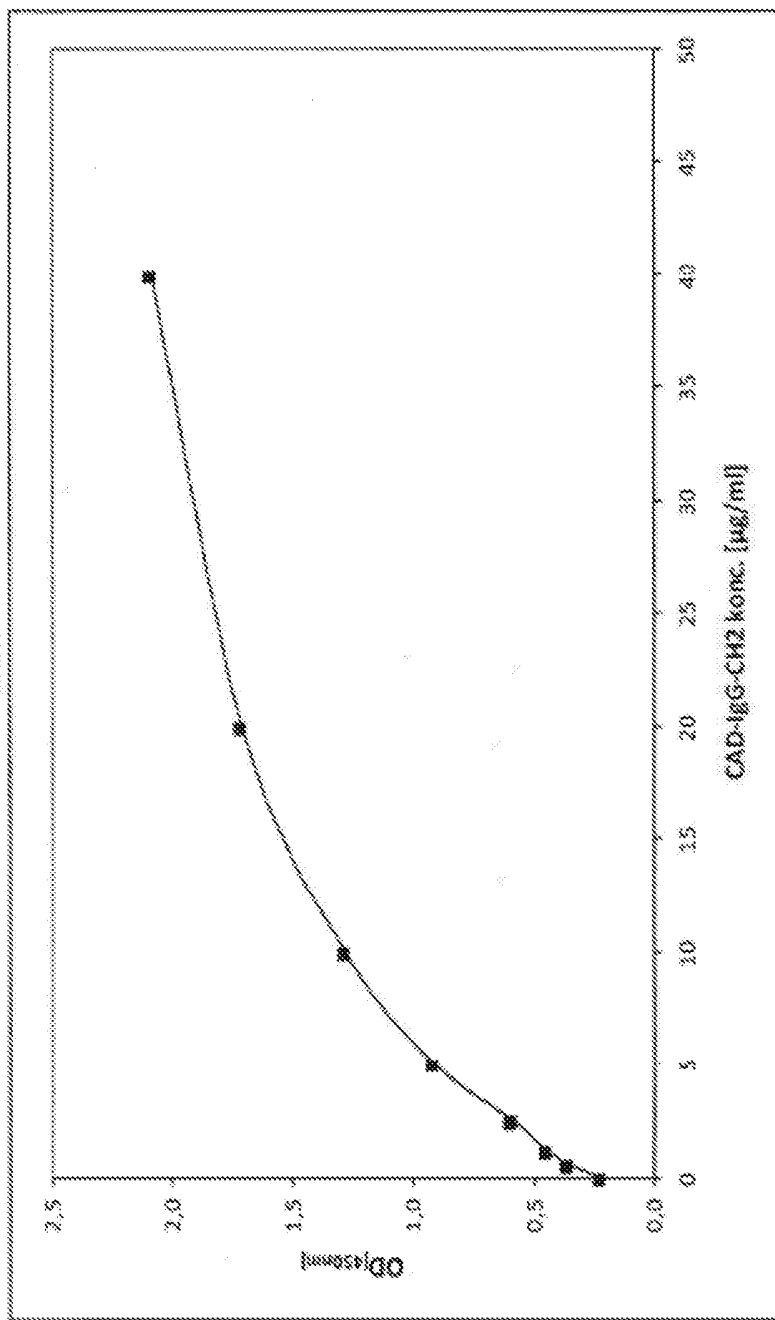
Figur 7



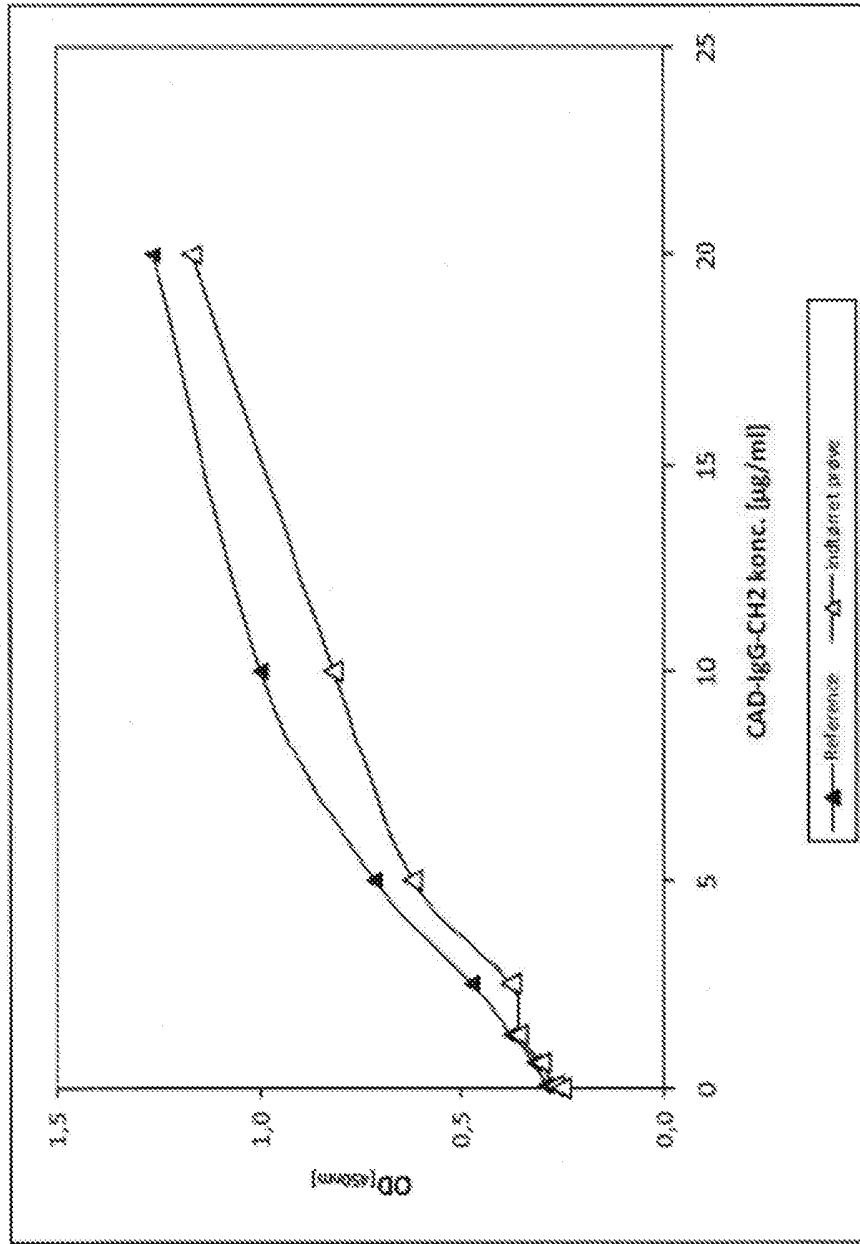
Figur 8



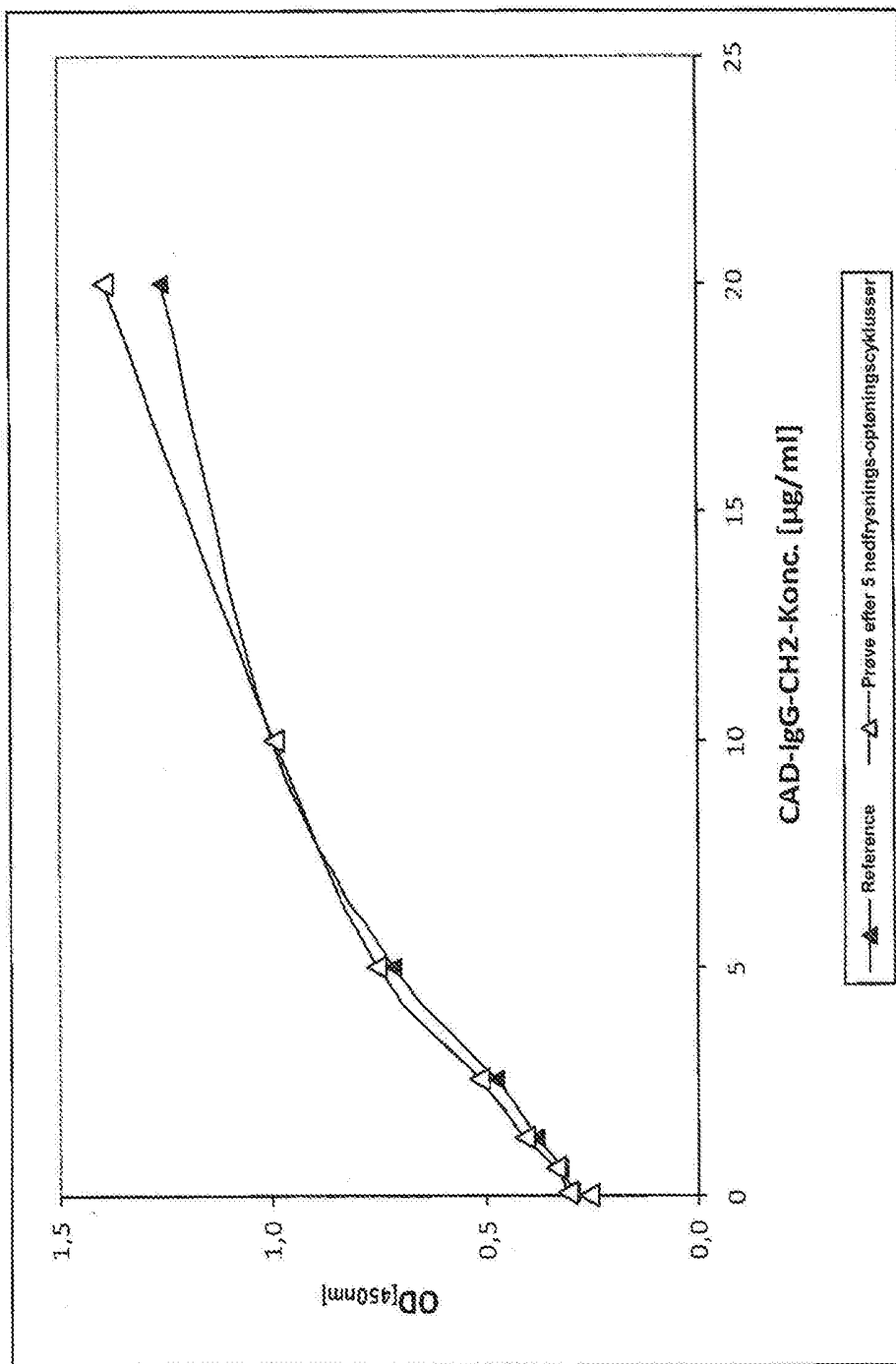
Figur 9



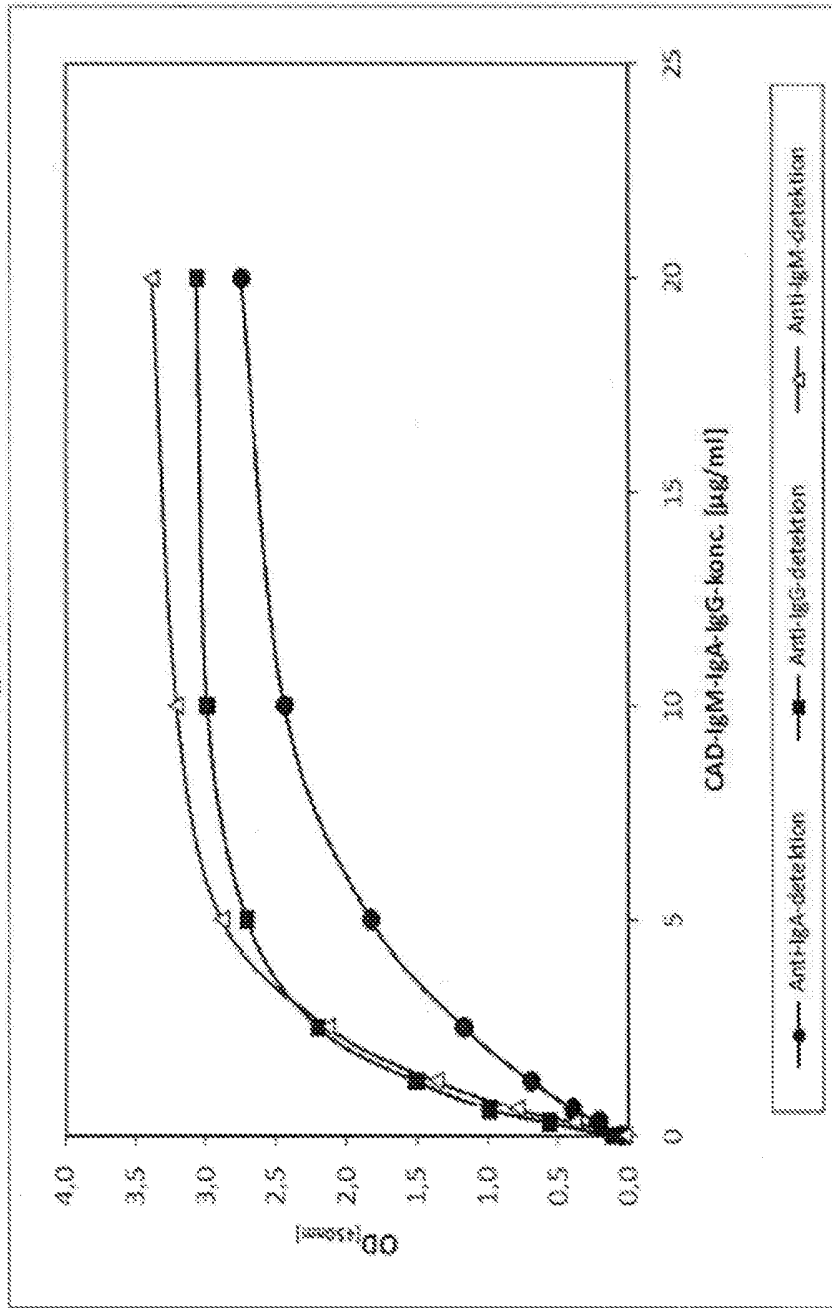
Figur 10



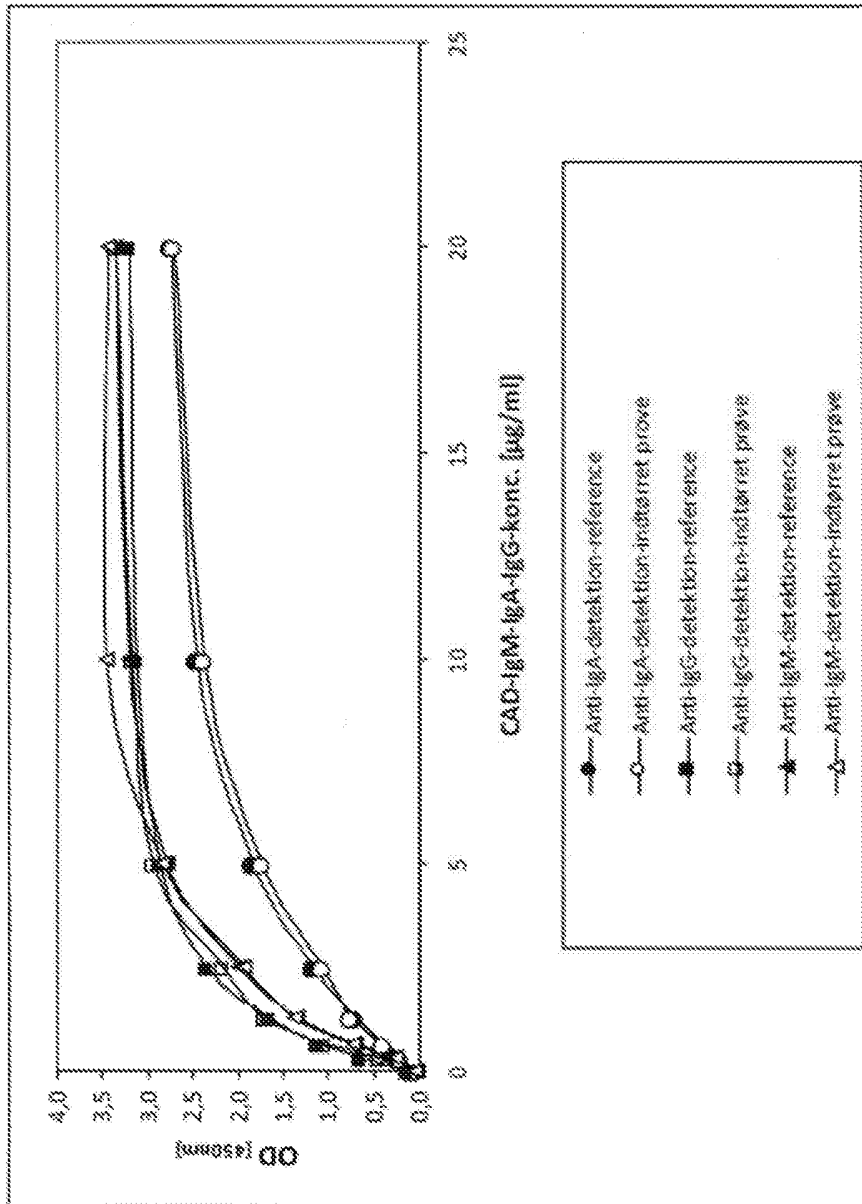
Figur 11



Figur 12



Figur 13



Figur 15

