

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(19) **BG**

ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

(11) **66072 B1**

(51) Int.Cl.

C12N 15/13 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

(21) Заявителски № 106278

(22) Заявено на 04.01.2002

(24) Начало на действие
на патента от: 05.06.2001

Приоритетни данни

(31) 0013810 (32) 06.06.2000 (33) GB

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 12 на 29.12.2002

(45) Отпечатано на 31.01.2011

(46) Публикувано в бюлетин № 1
на 31.01.2011

(56) Информационни източници:
WO1990/007861; US 5919452;
GB 2246570; GB 2297145

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентоприетел(и):

UCB S. A., B-1070 BRUSSELS, 60,
ALLEE DE LA RECHERCHE (BE)

(72) Изобретател(и):

Diljeet Singh Athwal
Derek Thomas Brown
Andrew Neil Charles Weir
Andrew George Popplewell
Andrew Paul Chapman
SL1 3WE Berkshire
David John King
94002 Belmont (GB)

(74) Представител по индустриална
собственост:

Юлиян Иванов Върбанов, 1000 София,
ул. "Позитано" 3, ет. 2

(86) № и дата на РСТ заявка:
РСТ/ GB01/02477, 05.06.2001

(87) № и дата на РСТ публикация:
01/94585, 13.12.2001

(54) СПЕЦИФИЧНИ МОЛЕКУЛИ НА АНТИТЕЛА ЗА ЧОВЕШКИ ТУМОРЕН НЕКРОЗЕН ФАКТОР АЛФА, И ТЯХНОТО ИЗПОЛЗВАНЕ

(57) Изобретението се отнася до молекули на антитела, съдържащи най-малко една CDR производна или мише моноклонално антитяло, имащи специфичност към човешки TNFалфа, до CDR присадено антитяло, където най-м алко една от CDRs е хибридна CDR. Изобретението се отнася и до ДНК последователности, кодиращи веригите на молекулите на антитела, до вектори, до трансформирани клетки гостоприемници, до използването на молекулите на антитела при лечението на заболявания, медиирани чрез TNFалфа.

12 претенции, 24 фигури

BG 66072 B1

(54) СПЕЦИФИЧНИ МОЛЕКУЛИ НА АНТИТЕЛА ЗА ЧОВЕШКИ ТУМОРЕН НЕКРОЗЕН ФАКТОР АЛФА, И ТЯХНОТО ИЗПОЛЗВАНЕ

Област на техниката

Настоящото изобретение се отнася до молекули на антитела, имащи специфичност към антигенни детерминанти на човешки туморен некрозис фактор алфа (TNFалфа). Настоящото изобретение се отнася, също така, до терапевтичното използване на молекулите на антитела, и методи за получаване на молекулите на антитела.

Предшестващо състояние на техниката

Изобретението се отнася до молекули на антитела. В молекулата на антитяло, има две тежки вериги, и две леки вериги. Всяка тежка верига и всяка лека верига има на нейния N-терминален край променлив домен. Всеки променлив домен се състои от четири рамкирани области (FRs), редуващи се с три комплементарно детерминантни области (CDRs). Остатъците в променливите домени се номерират конвенционално съгласно системата, създадена от Kabat et al., 1987 г., в *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (тук по-надолу наричан "Kabat et al. (supra)"). Тази система за номериране се използва в настоящото описание, освен в случаите, когато се посочва друго.

Означенията на остатъка на Kabat не винаги съответстват директно на линейното номериране на аминокиселинните остатъци. Действителната линейна аминокиселинна последователност може да съдържа по-малко, или повече аминокиселини, отколкото в стриктното номериране на Kabat, отговаряйки на скъсяването на, или вмъкването в основната структура на променливия домен, на структурни компоненти, било рамки, било CDR. Точното номериране на Kabat на остатъците за дадено антитяло може да се определи чрез хомоложен ред на остатъци в последователност на анти-тялото със "стандартна" последователност, номерирана по Kabat.

CDRs на тежката верига на променлива област са локализиращи при остатъци 31 - 35

(CDRH1), остатъци 50 - 65 (CDRH2), и остатъци 95 - 102 (CDRH3), съгласно номерирането по Kabat.

CDRs на леката верига на променлива област са локализиращи при остатъци 24 - 34 (CDRL1), остатъци 50 - 56 (CDRL2), и остатъци 89 - 97 (CDRL3), съгласно номерирането по Kabat.

Конструкцията на CDR-присадени антитела се описва в EP-A-0239400, който описва метод, по който CDRs на мише моноклонално антитяло се присажда върху рамкираните области на променливите домени на човешки имуноглобулин, посредством сайт насочена мутагенеза, използвайки дълги олигонуклеотиди. CDRs определят антиген свързващата специфичност на антителата, и са относително къси пептидни последователности, носени от рамковите области на променливите домени.

Последната работа върху хуманизиращи моноклонални антитела чрез CDR-присаждане е осъществена върху моноклонални антитела, разпознаващи синтетични антигени, такива като NP. Обаче, примери, в които мише моноклонално антитяло, разпознаващо лизозим и моноклонално антитяло от плъх, разпознаващо антиген на човешки Т-клетки, са хуманизиращи чрез CDR-присаждане, са описани от Verhoeven et al. (*Science*, 239, 1534 - 1536, 1988), и Riechmann et al. (*Nature*, 332, 323-324, 1988), съответно.

Riechmann et al. смятат, че трансфера на CDRs единствено (както е дефинирано от Kabat (Kabat et al. (supra) и Wu et al., *J. Exp. Med.*, 132, 211-250, 1970)) не е достатъчен, за да осигури задоволителна антиген свързваща активност в CDR-присадения продукт. Установено е, че голям брой от рамкирани остатъци трябва да са били изменени, така че те съответстват на тези от рамковата област на донора. Предложените критерии за това, как да се избере кои от рамкираните остатъци имат нужда да бъдат променени, са описани в WO 1990/007861.

Доста статии, дискутиращи CDR-присадени антитела бяха публикувани, включително Vaughan et al. (*Nature Biotechnology*, 16, 535-539, 1998).

TNFалфа е провъзпалителен цитокин, който се освобождава от, и взаимодейства с клетки от имунната система. Така, TNFалфа се освобождава от макрофаги, които са били

активирани посредством липополизахариди (LPS) на грам отрицателни бактерии. Като такъв, TNFалфа изглежда, че се явява като ендегенен медиатор от централна величина, включен в развитието и патогенезиса на ендотоксичен шок, свързан с бактериален сепсис. TNFалфа също така е показан, че е up-регулиран в много от заболяванията на човека, включително хронични заболявания, такива като ревматоиден артрит, болестта на Крон, язвеноподобни колити и мултипла склероза. Мишки, трансгенни за човешки TNFалфа, продуцират високи нива на TNFалфа в основни линии, и развиват спонтанни, деструктивни полиартрити, наподобяващи ревматоиден артрит (Kaffer et al., *EMBP J.*, 10, 4025-4031, 1991). Поради това TNFалфа се смята за провъзпалителен цитокин.

Моноклонални антители срещу TNFалфа бяха описани в предшестващото състояние на техниката. Medgar et al., (*Hybridoma*, 6, 305-311, 1987) описва миши моноклонални антители срещу рекомбинантен TNFалфа. Fendly et al., (*Hybridoma*, 6, 359-370, 1987), описва използването на миши моноклонални антители срещу рекомбинантен TNFалфа при дефиниране на неутрализиращи епитопи на TNFалфа. Shimamoto et al., (*Immunology Letters*, 17, 311-318, 1988) описва използването на миши моноклонални антители срещу рекомбинантен TNFгама, и тяхното използване за предотвратяване на ендотоксичен шок при мишки. Освен това, в *International Patent Application WO 1992/011383*, са описани антители, включително CDR-присадени антители, специфични за TNFалфа. Rankin et al., (*British J. Rheumatology*, 34, 334-342, 1995), описват използването на такива CDR-присадени антители при лечението на ревматоиден артрит. US-A-5 919 452 описва анти-TNF химерни антители и тяхното използване при лечение на патологични случаи, свързани с наличието на TNF.

Антители на TNFалфа са предложени за профилактика и лечение на ендотоксичен шок (Beulter et al., *Science*, 234, 470-474, 1985). Bodmer et al., (*Critical Care Medicine*, 21, S446-, 1993) и Wherry et al., (*Critical Care Medicine*, 21, S436-S440, 1993) описват лечебната сила на анти-TNFалфа антители при лечението на септичен шок. Използването на анти-TNFалфа

антитела при лечението на септичен шок също така е описано от Krischenbaum et al., (*Critical Care Medicine*, 26, 1625-1626, 1998). Артрит, индуциран от колаген, може да се лекува ефикасно, използвайки анти-TNFалфа моноклонално анти тяло (Williams et al. (*PNAS-USA*, 89, 9784-9788, 1992)).

Повишени нива на TNFалфа са намерени и в синувиалната течност, и в периферната кръв на пациенти, страдащи от ревматоиден артрит. Когато TNFалфа блокиращи средства се прилагат на пациенти, страдащи от ревматоиден артрит, те намаляват възпалението, подобряват симптоматиката, и забавят уврежданията на ставата (*Arthritis Rheum.*, 42, 1204-1208, 1999).

Използването на анти-TNFалфа антители при лечението на ревматоиден артрит и болестта на Крон е описано във Feldman et al., (*Transplantation Proceedings*, 30, 4126-4127, 1998), Adorini et al., (*Trends in Immunology Today*, 18, 209-211, 1997), и във Feldman et al., (*Advances in Immunology*, 64, 283-350, 1997). Антителата за TNFалфа, използвани при такива лечения обикновено са химерни антители, такива като тези, описани в US-A-5 919 452.

Два продукта, блокиращи TNFалфа, са лицензирани понастоящем за лечение на ревматоиден артрит. Първият, наречен етанерсепт (etanercept), се продава от Immunex Corporation като Enbrel™. Той е рекомбинантен слят протеин, съдържащ две р75 разтворими области на TNF-рецептора, свързани към Fc протона на човешки имуноглобулин. Вторият, наречен инфликсимаб (infliximab), се продава от Centocor Corporation като Ремикад™ (Remicade™). Той е химерно анти тяло, имащо миши анти-TNFалфа променливи области, и човешки IgG1 константни области.

В предшестващото състояние на техниката рекомбинантните анти-TNFалфа молекули на антители обикновено имат намален афинитет към TNFалфа, в сравнение с антителата, от които произлизат променливите области, или CDRs, обикновено се продуцират в клетки на бозайник, и са скъпи за производство. Анти-TNFалфа на антители в предшестващото състояние на техниката са описани в Stephens et al., (*Immunology*, 85, 668-674, 1995), GB-A-2 246 570 и GB-A-2-297 145.

Техническа същност на изобретението

Има необходимост от молекула на антитяло за лечение на хронични възпалителни заболявания, която може да се използва с повторяемост, и да се получава лесно и резултатно. Има необходимост, също така, от молекула на антитяло, която има голям афинитет към TNF α , и ниска имуногеничност при човека.

По първия аспект, настоящото изобретение предоставя молекула на антитяло, която има специфичност към TNF α , съдържайки тежка верига, в която променливата област съдържа CDR (съгласно дефинирането по Kabat et al. (supra)), имаща последователността, дадена като H1 на фигура 3 (SEQ ID NO: 1) за CDRH1, като H2' на фигура 3 (SEQ ID NO: 2), или като H2 на фигура 3 (SEQ ID NO: 7) за CDRH2, или като H3 на фигура 3 (SEQ ID NO: 3) за CDRH3.

Молекулата на антитяло по първия аспект на настоящото изобретение съдържа най-малко една CDR, избрана от групата, състояща се от H1, H2', или H2 и H3 (SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 3), за променливата област на тежката верига. За предпочитане, молекулата на антитяло съдържа най-малко две, или повече, за предпочитане всичките три CDRs в тежката верига на променливата област.

Във втория аспект на настоящото изобретение, се предоставя молекула на антитяло, която има специфичност към човешки TNF α , съдържайки лека верига, в която променливата област съдържа CDR (съгласно дефинирането по Kabat et al. (supra)), имаща последователността, дадена като L1 на фигура 3 (SEQ ID NO: 4) за CDRL1, като L2 на фигура 3 (SEQ ID NO: 5) за CDRL2, или като L3 на фигура 3 (SEQ ID NO: 6) за CDRB3.

Молекулата на антитяло във втория аспект на настоящото изобретение съдържа най-малко една CDR, избрана от групата, състояща се от L1, L2 и L3 (SEQ ID NO: 4 до SEQ ID NO: 6) за леката верига на променливата област. За предпочитане, молекулата на антитялото съдържа най-малко две, или повече, за предпочитане всичките три CDRs в променливия домен на леката верига.

Молекулите на антитяло в първия и във

втория аспект на настоящото изобретение за предпочитане имат комплементарна лека верига, или комплементарна тежка верига, съответно.

За предпочитане, молекулата на антитяло в първия и във втория аспект на настоящото изобретение съдържа тежка верига, в която променливата област съдържа CDR (съгласно дефинирането по Kabat et al. (supra)), имаща последователността, дадена като H1 на фигура 3 (SEQ ID NO: 1) за CDRH1, като H2' или като H2 на фигура 3 (SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 7) за CDRH2, или като H3 на фигура 3 (SEQ ID NO: 3) за CDRH3, и лека верига, в която променливата област съдържа CDR (съгласно дефинирането по Kabat et al. (supra)), имаща последователността, дадена като L1 на фигура 3 (SEQ ID NO: 4) за CDRL1, като L2 на фигура 3 (SEQ ID NO: 5) за CDRL2, или като L3 на фигура 3 (SEQ ID NO: 6) за CDRB3.

CDRs, дадени в SEQ IDS NOS: 1 и 3 до 7, и на фигура 3, отнасящи се до горното, са производни на моноклонално антитяло hTNF40 на мишка. Обаче, SEQ ID NO: 2 се състои от хибридна CDR. Хибридната CDR съдържа част от тежката верига CDR2 на мише моноклонално антитяло hTNF40 (SEQ ID NO: 7) и част от тежката верига от CDR2 на човешка група 3 зародишна линия последователност на V област.

Пълните последователности на променливите области на мише hTNF40 антитяло са показани на фигура 6 (лека верига) (SEQ ID NO: 99) и на фигура 7 (тежка верига) (SEQ ID NO: 100). Това мише антитяло по-долу се приема като "донорното антитяло".

Първи алтернативно предпочитан вариант на първия, или на втория аспект на настоящото изобретение е моноклонално мише антитяло hTNF40, имащо последователности на променливия домен на леката и на тежката верига, показани на фигура 6 (SEQ ID NO: 99), и на фигура 7 (SEQ ID NO: 100), съответно. Константната област на леката верига на hTNF40 е капа, а константната област на тежката верига е IgG2a.

Във втория алтернативно предпочитан вариант, антитялото съгласно, било първия, било втория аспект на настоящото изобретение, е химерна молекула на мише/човешко антитяло, приемано тук като химерна молекула на hTNF40 антитяло. Химерната молекула на антитяло

съдържа променливи области на мише моноклонално антитяло hTNF40 (SEQ ID NO: 99 и 100), и човешки константни области. За предпочитане, химерната молекула на антитяло hTNF40 съдържа човешка С капа област (Hieter et al., Cell., 22, 197-207, 1980; Genebank accession number J00241) в леката верига, и човешките гама 4 области (Flanagan et al., Nature, 300, 709-713, 1982), в тежката верига.

В трети алтернативно предпочитан вариант за изпълнение на настоящото изобретение, антитялото, било съгласно първия, било съгласно втория аспект на настоящото изобретение, е CDR-присадена молекула на антитяло. Терминът "CDR-присадена молекула на антитяло", така, както се използва тук, се отнася до молекула на антитяло, където тежката и/или леката верига съдържа една, или повече CDRs (включително, при избор, хибридна CDR) от антитялото донор (например, мише моноклонално антитяло) присадено в рамката на променливата област на тежката и/или леката верига (например човешко антитяло).

За предпочитане, такова CDR-присадено антитяло има променлива област, съдържаща рамкови области на човешки приемник, така както и една, или повече от CDRs на донора, посочени по-горе.

Когато CDRs са присадени, която и да е приемлива рамкирана последователност на променлива област на приемника може да се използва, имаща отношение към класа/вида на антитялото на донора, от който произлизат CDRs, включително миши рамкирани области, рамкирани области на примат, или на човек. Примери за рамки на човек, които могат да се използват в настоящото изобретение, са KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY и POM Kabat et al. (supra)). Например, KOL и NEWM могат да се използват за тежката верига, REI може да се използва за леката верига, а EU, LAY и POM могат да се използват за двете, и за тежката верига, и за леката верига. Предпочитаните рамкирани области за леката верига са рамкираните области на човешка група 1, показани на фигура 1 (SEQ ID NO: 83, 85, 87 и 89). Предпочитаните рамкирани области за тежката верига са рамкираните области на човешка група 1 и група 3, показани на фигура 2 (SEQ ID NO: 91, 93, 95 и 97, и SEQ ID NO:

106, 107, 108 и 109), съответно.

В CDR-присадено антитяло на настоящото изобретение, за предпочитане е като антитяло приемник да се използва такова, имащо вериги, които са хомолози на веригите на антитялото на донора. Не е необходимо тежката и леката верига на приемника да бъдат непременно производни на същото антитяло, и могат, при желание, да съдържат вериги, имащи рамкирани области, производни на различни вериги.

Също така, в CDR-присадено антитяло на настоящото изобретение, рамкираните области не се нуждаят точно от същата последователност както тази на антитялото на приемника. Например, необичайните остатъци могат да бъдат променени до много по-често срещаните остатъци за този клас, или вид верига на приемника. Алтернативно, избрани остатъци в рамковите области могат да бъдат променени, така че те да съответстват на остатъка, намиращ се на същата позиция в антитялото на донора. Такива промени би трябвало да се поддържат до минималната необходимост да възстановят афинитета на антитялото на донора. Протокол за избор на остатъци в рамковите области на приемника, които може да е необходимо да бъдат променени е описан във WO 1991/009967.

За предпочитане, в молекула на CDR-присадено антитяло на настоящото изобретение, ако тежката верига на приемника има човешка група 1 на рамковите области (показано е на фигура 2) (SEQ ID NOS: 91, 93, 95 и 97), тогава рамковите области на тежката верига на приемника съдържат, допълнително към една, или повече CDRs на донора, остатъци от донора на позиции 28, 69 и 71 (съгласно Kabat et al. (supra)).

Алтернативно, ако тежката верига на приемника има рамкови области група 1, тогава рамковите области на тежката верига на приемника съдържат, допълнително към една, или повече CDRs на донора, остатъци от донора на позиции 28, 38, 46, 67, 69 и 71 (съгласно Kabat et al. (supra)).

За предпочитане, в молекула на CDR-присадено антитяло на настоящото изобретение, ако тежката верига на приемника има рамкови области човешка група 3 (показано е на фигура 2) (SEQ ID NOS: 106, 107, 108 и 109), тогава рамковите области на тежката верига на

приемника съдържат, допълнително към една, или повече CDRs на донора, остатъци от донора на позиции 27, 18, 30, 48, 49, 69, 71, 73, 76 и 78 (съгласно Kabat et al. (supra)).

За предпочитане, в молекула на CDR-присадено антитяло на настоящото изобретение, ако леката верига на приемника има рамкови области човешка група 1 (показано е на фигура 1) (SEQ ID NOS: 83, 85, 87 и 89), тогава рамковите области на леката верига на приемника съдържат, остатъци от донора на позиции 46 и 60 (съгласно Kabat et al. (supra)).

Остатъци от донора са остатъци от антитяло на донора, тоест, антитяло, от което произлизат оригиналните CDRs.

Молекулата на антитяло на настоящото изобретение може да съдържа завършена молекула на антитяло, имаща цяла дължина тежка и лека верига; нейна част, такава, като например Fab, модифициран Fab, Fab', F(ab')₂, или Fv фрагмент; мономер, или димер на лека верига, или мономер или димер на тежка верига; една верига на антитяло, например, една верига Fv, в която променливите области на тежката верига и на леката верига са свързани посредством пептиден линкер. По подобен начин, променливите области на тежката верига и на леката верига могат да са комбинирани с други области на антитяло като подходящи.

За предпочитане, молекулата на антитяло съгласно настоящото изобретение е фрагмент Fab. За предпочитане, фрагментът Fab има тежка верига, имаща последователността, дадена като SEQ ID NO: 111, и лека верига, имаща последователността, дадена като SEQ ID NO: 113. Аmino киселинните последователности, дадени в SEQ ID NO: 111 и SEQ ID NO: 113 за предпочитане са кодирани посредством нуклеотидните последователности, дадени в SEQ ID NO: 110 и SEQ ID NO: 112, съответно.

Алтернативно, за предпочитане, молекулата на антитяло съгласно настоящото изобретение е фрагмент Fab, в който модифицирането е присъединяването към C-терминалния край на неговата тежка верига на една, или повече amino киселини, за да дадат възможност за прикрепянето на молекула ефектор, или молекула репортер. За предпочитане, присъединените amino киселини образуват модифицирана стърчаща (hinge) област, съдържаща един, или

два цистеинови остатъка, към които може да е прикрепена молекулата ефектор, или репортер. Такъв модифициран фрагмент Fab за предпочитане има тежка верига, имаща последователността, дадена като SEQ ID NO: 115, и лека верига, имаща последователността, дадена като SEQ ID NO: 113. Аmino киселинната последователност, дадена в SEQ ID NO: 115 за предпочитане е кодирана посредством нуклеотидната последователност в SEQ ID NO: 114.

Предпочитана група ефектор е полимерна молекула, която може да бъде прикрепена към модифициран фрагмент Fab, за да повиши неговия полуживот in vivo.

Полимерната молекула може, обикновено, да бъде синтетичен, или природен полимер, например, по избор заместен полиалкилен, полиалкиленов, или полиоксиалкиленов полимер с права или разклонена верига, или полизахарид с разклонена, или с неразклонена верига, например, хомо- или хетерополизахарид.

По-специални заместители по избор, които могат да присъстват в по-горе посочените синтетични полимери включват една, или повече хидрокси, метилови, или метокси групи. По-специални примери на синтетични полимери включват по избор заместен поли(етиленгликол), поли(винилалкохол) поли-(етиленгликол), или техни производни, с права, или с разклонена верига, по-специално, по избор заместен поли(етиленгликол), такъв като метоксиполи(етиленгликол), или негови производни. По-специални природни полимери включват лактоза, амилоза, декстран, гликоген, или техни производни. "Производни", така, както се използва тук, означава, че включва реактивни производни, например, тиол-селективни реактивни групи, такива като малеимида, и други подобни. Реактивната група може да бъде свързана директно, или чрез свързващ сегмент към полимера. Трябва да се отбележи, че остатъкът на такава група понякога образува част от продукта, като свързваща група между фрагмента на антитялото и полимера.

Големината на полимера може да бъде различна, според желанието, но обикновено трябва да е със средно молекулно тегло в границите от 500 до 50000 Da, за предпочитане,

от 5000 до 40000 Da, а по-за предпочитане от 25000 до 40000 Da. Големината на полимера може по-специално да се избере на базата на използването, за което е предназначен продукта. Така, например, когато продуктът е предназначен да напусне кръвообръщението и да проникне в тъканта, например, за използване при лечение на тумор, може да е благоприятно да се използва полимер с малко молекулно тегло, например, с молекулно тегло от порядъка на приблизително 5000 Da. При приложение, когато продуктът остава в кръвообръщението, може да е благоприятно да се използва полимер с по-голямо молекулно тегло, например, имащ молекулно тегло в границите от 25000 до 40000 Da.

Особено предпочитаните полимери включват полиалкиленов полимер, такъв като например, поли(етиленгликол), или, по-специално, метоксиполи(етиленгликол), или техни производни, и по-специално с молекулно тегло в границите от 25000 до около 40000 Da.

Всяка полимерна молекула, прикрепена към модифициран фрагмент на антитяло може да бъде прикрепена ковалентно към серния атом на цистеиновия остатък, намиращ се във фрагмента. Ковалентната връзка обикновено е дисулфидна връзка, или, по-специално, връзка сяра-въглерод.

При желание, фрагментът на антитяло може да има една, или повече молекули ефектори, или репортери, прикачени към него. Молекулите ефектори, или репортери, могат да бъдат прикачени към фрагмента посредством която и да е подходяща аминокиселинна странична верига, или терминал на аминокиселинна функционална група във фрагмента, например, която и да е свободна аминокиселина, или карбоксилна група.

Активиран полимер може да се използва като изходен продукт при получаването на полимер-модифицирани фрагменти на антитела, съгласно горното описание. Активираният полимер може да бъде който и да е полимер, съдържащ тиолова реактивна група, такъв като алфа-халогенокарбоксилна киселина, или естер, например, йодацетамид, имид, например, винил сулфон, или дисулфид. Такива изходни продукти могат да се доставят от търговската мрежа (например, от Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA), или могат да се получат от

достъпни чрез търговската мрежа изходни продукти, използвайки конвенционални химични методи.

По отношение на прикрепването на поли(етиленгликол)-ови (PEG) остатъци, направена е литературна справка с "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris and S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC and "Bioconjugation Protein Coupling Technics for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam and A. Dent, Grove Publishers, New York.

Когато желанието е да се получи фрагмент на антитяло, свързан с молекула ефектор, или репортер, това може да се осъществи чрез стандартни химични методи, или стандартни методи за рекомбинантна ДНК, при които фрагмент на антитяло се свързва или директно, или посредством присъединяващо средство, към молекулата ефектор, или репортер, било преди, било след взаимодействие с активирания полимер, който е подходящ. По-специалните химични методи включват, например, тези, описани във WO 1993/006231, WO 1992/022583, WO 1989/000195 и WO 1989/001476. Алтернативно, когато молекулата ефектор, или репортер е протеин, или полипептид, свързването може да се осъществи, като се използват методи за рекомбинантна ДНК, например, съгласно описаното във WO 1986/001533 и EP-A-0392745.

За предпочитане, модифицираният Fab фрагмент съгласно настоящото изобретение е PEG-илиран (тоест, има PRG (поли(етиленгликол)) ковалентно прикрепен към него) съгласно метода, описан в EP-A-0948544. За предпочитане, молекулата на антитяло съгласно настоящото изобретение е PEG-илиран модифициран Fab фрагмент, както е показано на фигура 13. Както е показано на фигура 13, модифицираният Fab фрагмент има малеимидна група, ковалентно свързана към единична тиолова група в модифицираната висяща област. Лизинов остатък е свързан ковалентно към малеимидната група. Към всяка една от аминокиселините на лизиновия остатък е прикрепен метоксиполи(етиленгликол)ов полимер, имащ молекулно тегло от порядъка на приблизително 20,000 Da. Общото

молекулно тегло на цялата молекула ефектор е приблизително 40,000 Da.

За предпочитане, в съединенията, показани на фигура 13, тежката верига на частта от антитялото има последователността, дадена като SEQ ID NO: 115, а леката верига има последователността, дадена като SEQ ID NO: 113. Това съединение тук се обозначава като CDP870.

Домените от константната област на молекулата на антитяло съгласно настоящото изобретение, ако присъства, може да се избере, като се има предвид предложената функция на молекулата на антитялото, и по-специално, функциите на ефектор, които могат да се изискват. Например, домените на константните области могат да са човешки IgA, IgD, IgE, IgG или IgM области. По-специално, човешки IgG домени на константни области могат да се използват, особено от изовидовете IgG1 и IgG3, когато молекулата на антитяло е предназначена да се използва за терапевтични цели, и се изисква антитялото да има ефекторни функции. Алтернативно, изо-видовете IgG2 и IgG4 могат да се използват, когато молекулата на антитялото е предназначена да се използва за терапевтични цели, и не се изисква антитялото да има ефекторни функции, например, само за блокиране на активността на TNF α .

Също така, молекулата на антитяло съгласно настоящото изобретение може да има молекула ефектор, или репортер, прикрепена към нея. Например, тя може да има макроцикъл, за превръщане на атом на тежък метал, или токсин, в хелатно съединение, такъв като рицин, прикрепен към нея, посредством ковалентна мостова структура. Алтернативно, технологии на методи за рекомбинантна ДНК могат да се използват за получаването на молекула на антитяло, в която Fc фрагментът (CH2, CH3 и висящи области), областите CH2 и CH3, или областта CH3 на завършена молекула имуноглобулин е (са) заместена (заместени) от, или е прикрепена към него посредством пептидна връзка, функционално неимуноглобулинов протеин, такъв като ензим, или молекула токсин.

Молекулата на антитяло съгласно настоящото изобретение за предпочитане има свързващ афинитет най-малко $0,85 \times 10^{-10}$ M, по-предпочитано най-малко $0,75 \times 10^{-10}$ M, а най-предпочитано най-малко $0,5 \times 10^{-10}$ M. (Това не

пречи, да се отбележи, че предпочитаната хуманизирана молекула на антитяло съгласно настоящото изобретение, както е описано по-долу, има афинитет от порядъка на приблизително $0,5 \times 10^{-10}$ M, който е по-добър отколкото афинитета на мишето моноклонално антитяло, от което произлиза. Мишето антитяло има афинитет от порядъка на приблизително $0,85 \times 10^{-10}$ M).

За предпочитане, молекулата на антитяло съгласно настоящото изобретение, съдържа променлива област hTNF40-gL1 (SEQ ID NO: 8) на леката верига, и променлива област gh3hTNF40.4 (SEQ ID NO: 11) на тежката верига. Последователностите на променливите области на тези лека и тежка верига са показани на фигури 8 и 11, съответно.

Настоящото изобретение се отнася, също така, до варианти на молекулата на антитяло съгласно настоящото изобретение, които имат подобрен афинитет за TNF α . Такива варианти могат да се получат посредством многобройни протоколи за афинитетно узряване, включително мутиране на CDRs (Yang et al., *J. Mol. Biol.*, 254, 392-403, 1995), размесване на верига (Marks et al., *Bio/Technology*, 10, 779-783, 1992), използване на мутаторни щамове от *E. coli* (Low et al., *J. Mol. Biol.*, 250, 359-368, 1996), ДНК размесване (Pattern et al., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 724-733, 1997), phage display (Thomson et al., *J. Mol. Biol.*, 256, 77-88, 1996), и сексуална PCR (Cramer et al., *Nature*, 391, 288-291, 1998). Vaughan et al. (*supra*) дискутира тези методи за афинитетно узряване.

Настоящото изобретение също така предоставя ДНК последователност, кодираща тежка(и) и/или лека(и) верига(и) на молекулата на антитяло съгласно настоящото изобретение.

За предпочитане, ДНК последователността, кодираща тежка, или лека верига на молекулата на антитяло съгласно настоящото изобретение.

Съгласно един предпочитан вариант за изпълнение на настоящото изобретение, ДНК последователността кодираща лека верига, и съдържа последователността, показана в SEQ ID NO: 8 (hTNF40-gL1), или SEQ ID NO: 9 (h-TNF40-gL2, или негов еквивалентен разпад на генетичния код.

Съгласно един алтернативен предпочитан

вариант за изпълнение на настоящото изобретение, ДНК последователността кодира тежка верига, и съдържа последователността, показана в SEQ ID NO: 10 (gh1hTNF40.4), или SEQ ID NO: 11 (gh3hTNF40.4, или техен еквивалентен дегенерат.

ДНК последователността съгласно настоящото изобретение може да съдържа синтетична ДНК, например, получена посредством химичен процес, сДНК, геномна ДНК, или каквато и да е комбинация от тях.

Настоящото изобретение се отнася, също така, до вектор за клониране, или за експресиране, съдържащ една, или повече ДНК последователности съгласно настоящото изобретение. За предпочитане, клониращият, или експресиращият вектор, съдържа леката верига, и тежката верига на молекулата на анти тяло съгласно настоящото изобретение, съответно.

Съгласно един предпочитан вариант за изпълнение, настоящото изобретение предоставя експресиращ вектор на *E. coli*, съдържащ ДНК последователност съгласно настоящото изобретение. За предпочитане, експресиращият вектор е рТТ0(CDP870), както е показано схематично на фигура 22.

Настоящото изобретение също така съдържа вектор рDNAEng-G1, както е показано на фигура 19.

Общи методи, чрез които могат да се конструират векторите, методи на трансфектиране, и методи за култивиране, са добре известни на специалистите в областта на техниката. В това отношение, е направена справка с "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wley Interscience, New York и the Maniatis Manual produced by Cold Spring Harbor Publishing.

ДНК последователности, които кодират молекулата на анти тяло съгласно настоящото изобретение могат да бъдат получени посредством методи, добре познати на специалистите в областта на техниката. Например, ДНК последователности, кодиращи за част, или за цялата тежка, и лека верига, могат да бъдат синтезирани от определени ДНК последователности, или на базата на съответстващите аминокиселинни последователности.

ДНК кодираща за последователности на рамката за разчитане на приемника се прилага

широко от специалистите в областта на техниката, и може лесно да се синтезира, на базата на нейните известни аминокиселинни последователности.

Стандартни техники на молекулярната биология могат да се използват за получаване на ДНК последователности, кодиращи за молекулата на анти тяло съгласно настоящото изобретение. Желаните ДНК последователности могат да се синтезират изцяло, или част от тях, използвайки олигонуклеотидни синтетични техники. Техники на сайт-насочена мутагенеза и на полимеразна верижна реакция (PCR), могат успешно да се използват.

Която и да е подходяща система клетка гостоприемник/вектор, може да се използва за експресиране на ДНК последователности, кодиращи молекулата на анти тяло съгласно настоящото изобретение. Бактериална, например *E. coli*, и други микробни системи могат да се използват, отчасти, за експресиране на фрагменти на анти тяло, такива като Fab и F(ab')₂ фрагменти, и по-специално Fv фрагменти и единични фрагменти от веригата на анти тяло, например, единични Fvs. Еукариотни, например, системи за експресиране на клетки гостоприемници от бозайници, могат да се използват за получаването на по-големи молекули на анти тяло, включително завършени молекули на анти тяло. Подходящи клетъчни системи гостоприемници на бозайници включват клетки СНО, клетки миелома, или хибридома.

Настоящото изобретение предоставя също така метод за получаването на молекулата на анти тяло съгласно настоящото изобретение, който се състои в култивиране на клетка гостоприемник, съдържаща вектор съгласно настоящото изобретение, в условия, подходящи за провеждане на експресиране на протеин от ДНК кодираща молекулата на анти тяло съгласно настоящото изобретение, и изолиране на молекулата на анти тяло.

За предпочитане, методът за получаване на молекулата на анти тяло съгласно настоящото изобретение се състои в култивиране на *E. coli*, съдържащ *E. coli* експресиращ вектор, съдържащ ДНК последователността съгласно настоящото изобретение, в условия, подходящи за провеждане на експресиране на протеин от ДНК последователността, и изолиране на молекулата на

антитяло. Молекулата на антитяло може да се отдели от клетката, или да се насочи към периплазмата чрез подходящи единични последователности. Алтернативно, молекулите на антитяло могат да се натрупват вътре в клетъчната цитоплазма. За предпочитане, молекулата на антитяло се насочва в периплазмата. В зависимост от молекулата на антитяло, която е получена, и от метода, който е използван, желателно е да се предостави възможност на молекулите на антитяло да обхванат и да възприемат функционално устройство. Методи за предоставяне на възможност на молекулите на антитяло да обхванат са добре познати на специалистите в областта на техниката.

Молекулата на антитялото може да съдържа полипептид само с тежка, или с лека верига, като в такъв случай е необходимо да се използва последователност, кодираща полипептид само с тежка, или с лека верига, за трансфектиране на клетки гостоприемници. За получаването на продукти, съдържащи и двете вериги, и тежка, и лека вериги, клетъчната линия може да се трансфектира с два вектора, първият вектор кодиращ полипептид с лека верига, а вторият вектор кодиращ полипептид с тежка верига. Алтернативно, може да се използва единичен вектор, като векторът включва последователности, кодиращи полипептиди с лека верига, и полипептиди с тежка верига.

Настоящото изобретение също така осигурява терапевтичен, или диагностичен състав, съдържащ молекула на антитяло съгласно настоящото изобретение в комбинация с фармацевтично приемлив инертен пълнител, разредител, или носител.

Настоящото изобретение също така осигурява метод за получаване на терапевтичен, или диагностичен състав, съдържащ смес от молекула на антитяло съгласно настоящото изобретение, заедно с фармацевтично приемлив инертен пълнител, разредител, или носител.

Молекулата на антитяло може да е единствената активна съставна част в терапевтичния, или диагностичния състав, или може да се придружава от други активни съставни части, включително други съставни части на антитела, например, анти-T клетка, анти-IFN γ ама, или анти-LPS антитела, или съставни части, които не са на антитела, такива като ксантин.

Фармацевтичният състав за предпочитане

трябва да съдържа терапевтично ефективно количество от антитялото съгласно изобретението. Терминът "терапевтично ефективно количество", така както се използва тук, се отнася до количество от терапевтично средство, необходимо, за да лекува, подобрява, или да предотвратява набелязана болест, или състояние, или да показва откриваем терапевтичен, или превантивен ефект. За което и да е антитяло, терапевтично ефективната доза за еднократно приложение може да се прецени първоначално било при изследване на клетъчна култура, било в животински модели, обикновено в гризачи, зайци, кучета, прасета, или примати. Животинският модел може също така да се използва, за да се определи границата на подходящата концентрация, и начина на приложение. Тази информация след това може да се използва, за да се определят полезните дози за еднократно приложение, и начина на приложение при човека.

Точното ефективно количество за човешки субект зависи от това, колко тежко е болестното състояние, от общото здравословно състояние на субекта, от възрастта, от теллото, и от пола на субекта, от хранителния режим, от времето и от честотата на приложение, от лекарствена(и) комбинация(и), от реакциите на чувствителност, и от толеранс/отговор към лечението. Това количество може да се определи, като се направи рутинно експериментиране и се преценява от клиницистите. Обикновено, ефективна доза за еднократно приложение е от 0,01 mg/kg до 50 mg/kg, за предпочитане 0,1 до 20 mg/kg, по-предпочитано приблизително 15 mg/kg. Както е показано в примерите по-долу, дози за еднократно приложение от 1, 5 и 20 mg/kg се използват за лечение на пациенти, страдащи от ревматоиден артрит.

Съставите могат да се прилагат индивидуално върху пациент, или могат да се прилагат в комбинация с други средства, лекарствени средства, или хормони.

Дозата за еднократно приложение, при която се прилага молекулата на антитяло съгласно настоящото изобретение, зависи от характера на състоянието, което трябва да се лекува, степента, до която трябва да се неутрализира, нивото на TNF α , или да се експресира, повишаване на желано ниво, и дали молекулата на антитяло е била използвана профилактично, или

за лечение на съществуващо болестно състояние.

Така, например, когато продуктът е за лечение, или за профилактика на хронично възпалително заболяване, такова като ревматоиден артрит, подходящите дози за еднократно приложение на молекулата на анти тяло съгласно настоящото изобретение са в границите от 0,5 и 50 mg/kg, по-предпочитано между 1 и 20 mg/kg, а най-предпочитано приблизително 15 mg/kg. Честотата на приложение на дозата за еднократно приложение зависи от полуживота на молекулата на анти тялото, и от продължителността на нейния ефект.

Ако молекулата на анти тялото има кратък полуживот (например 2 до 10 h), може да е необходимо да се приемат една, или повече дози за еднократно приложение на ден. Алтернативно, ако молекулата на анти тялото има дълъг полуживот (например 2 до 15 дена), може да е необходимо да се приеме дозата за еднократно приложение само веднъж на ден, на седмица, или даже веднъж на всеки 1, или 2 месеца.

Фармацевтичният състав може също така да съдържа фармацевтично приемлив носител за приложение на анти тялото. Самият носител не трябва да индуцира получаването на анти тела, вредни за индивида, получаващ състава, и не трябва да бъде токсичен. Подходящи носители могат да бъдат големи, слабо метаболизирани макромолекули, такива като протеини, полипептиди, липозоми, полизахариди, полимлечни киселини, полигликолови киселини, полимерни аминокиселини, съполимери на аминокиселини, и инактивирани части от вируси.

Могат да се използват фармацевтично приемливи соли, например, соли на минерални киселини, такива като хидрохлориди, хидробромиди, фосфати и сулфати, или соли на органични киселини, такива като ацетати, пропионати, малонати и бензоати.

Фармацевтично приемливите носители в лекарствените състави могат допълнително да съдържат течности, такива като вода, физиологичен разтвор, глицерол и етанол. Освен това, в такива състави могат да присъствуват помощни вещества, такива като овлажнители, или емулгиращи средства, или рН буферизиращи

вещества. Такива носители дават възможност от фармацевтичните състави да бъдат изготвени лекарствени форми като таблетки, пилули, дражета, капсули, течности, гелове, сиропи, емулсии и суспензии, за приемане от пациента.

Предпочитаните форми за приложение включват форми, подходящи за парентерално приложение, например, чрез инжектиране, или чрез инфузия, например, чрез голяма инжекция, или продължителна инфузия. Когато продуктът е за инжектиране, или за инфузия, той може да е под формата на суспензия, разтвор, или емулсия в маслен, или воден вехикулум, и може да съдържа средства, подпомагащи образуването на лекарствената форма, такива като суспендиращи средства, консервиращи средства, стабилизиращи средства и/или диспергиращи средства. Алтернативно, молекулата на анти тяло може да е под формата на сух продукт, за възстановяване преди използването с подходяща стерилна течност.

След като вече са получени под формата на лекарствени форми, съставите съгласно изобретението могат да се прилагат директно върху субекта. Субектът, който ще се лекува може да е животно. Обаче, за предпочитане е съставите да са пригодени за приложение върху субекти хора.

Фармацевтичните състави съгласно това изобретение могат да се прилагат посредством който и да е от многобройните начини, включително, но без да се ограничават от, орално, венозно, мускулно, интратерриално, интрамедуларно, в гръбначно мозъчния канал, интравентрикуларно, трансдермално, през кожата (например, виж WO 1998/020734), подкожно, интраперитонеално, в носа, чревно, локално, под езика, във вагината, или ректума. Хипоспрейове могат също така да се използват за приложение на фармацевтичните състави на изобретението. Характерно, лекарствените състави могат да се приготвят като инжектируеми, било като течни разтвори, било като суспензии. Могат да се получават твърди форми, подходящи за разтваряне в течни вехикулуми, или за суспендиране в течни вехикулуми, преди инжектирането.

Директното доставяне на съставите обикновено се осъществява чрез инжектиране, подкожно, интраперитонеално, интравенозно,

или интрамускулно, или доставяни в промеждутъчните цепнатини на тъканта (интерстициално). Съставите могат също така да се прилагат в лезия. Лечението с дози за еднократно приложение може да е съгласно разписание с единична доза за еднократно приложение, или съгласно разписание с повече дози за еднократно приложение.

Трябва да се отбележи, че активната съставна част в състава е молекула на антицяло. И като такъв, той трябва да е чувствителен към разграждане в гастроинтестиналния тракт. Така, например, ако съставът е за приложение по начин, използващ гастроинтестиналния тракт, съставът трябва да съдържа средства, които защитават антицялото от разграждане, но които освобождават антицялото, след като вече е бил абсорбиран от гастроинтестиналния тракт.

Пълна дискусия за фармацевтично приемливи носители е предоставена от Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N. J. 1991).

Предвижда се, също така, антицялото съгласно настоящото изобретение да се прилага за целите на генната терапия. С цел да се постигне това, ДНК последователности, кодиращи тежка верига и лека верига на молекулата на антицяло при контролиране на подходящи съставни части на ДНК, се внасят в пациент по такъв начин, че веригите на антицялото се експресират от ДНК последователностите, и се натрупват *in situ*.

Настоящото изобретение също така предоставя молекулата на антицялото съгласно настоящото изобретение за използване при лечението на заболяване, медирано от TNF α .

Настоящото изобретение също така предоставя използването на молекулата на антицялото съгласно настоящото изобретение при получаването на лекарство средство за лечението на заболяване, медирано от TNF α .

Молекулата на антицялото съгласно настоящото изобретение може да се използва при каквото и да е лечение, където е желателно да се редуцира нивото на биологично активен TNF α , присъстващ в тялото на човек, или в тялото на животно. TNF α може да циркулира в тялото, или да присъства в нежелателно високо ниво, локализиран в специален сайт в тялото.

Например, повишени нива на TNF α са замесени при остри и хронични имунни и

имунорегулаторни заболявания, инфекции, включващи сепсис, ендотоксичен шок и шок на сърдечносъдовата система, възпалителни заболявания, нервно-дегенеративни заболявания, злокачествени заболявания и индуциран от алкохол хепатит. Подробности за многобройните заболявания, свързани с повишени нива на TNF α са изложени в US-A-5 919 452. Молекулата на антицяло съгласно настоящото изобретение може да се използва при лечението на заболявания, медирано от TNF α . Особено важни заболявания, които могат да се лекуват посредством молекулата на антицяло съгласно настоящото изобретение включват сепсис, конгестивна сърдечна недостатъчност, септичен, или ендотоксичен шок, кахексия, синдром на дихателно страдание при възрастни, СПИН, алергии, псориазис, туберкулоза, възпалителни заболявания на костите, заболявания свързани със съсирването на кръвта, изгаряния, епизодите на отхвърляне след трансплантиране на органи и тъкани, болестта на Крон, и автоимунни заболявания, такива като тироидит и ревматоиден- и остеоартрити.

Освен това, молекулата на антицяло, или състава могат да се използват за намаляване на странични ефекти, свързани с генериране на TNF α по време на неопластично лечение; за отстраняване, или за намаляване на шокови симптоми, свързани с лечението, или с предотвратяването на отхвърлянето на присаждания чрез използване на антилимфоцитно антицяло; или за лечение на увреждане на много органи.

Молекулата на антицялото съгласно настоящото изобретение за предпочитане се използва за лечение на ревматоиден- и остеоартрит.

Настоящото изобретение също така предоставя метод за лечение на субекти хора, или животни, страдащи от, или при риск от увреждания, медирано от TNF α , като методът се състои в приложение върху субекта на ефективно количество от молекулата на антицяло съгласно настоящото изобретение.

Молекулата на антицялото съгласно настоящото изобретение може също така да се използва при поставяне на диагнози, например при поставяне на диагнози *in vitro*, и образно представяне на болестни състояния, включващи

повишени нива на TNF α .

Настоящото изобретение също така предоставя молекула на антитяло, съдържаща хибриден CDR, съдържащ съкратена последователност от CDR на донор, където липсващата част от съкратената CDR на донор е заместена от различна последователност, и образува функционална CDR. Терминът "хибридна CDR", така, както се използва тук, означава CDR, съдържаща CDR от донор, който е бил изрязан в една, или друга позиция, например, в единия, или и в двата му края. Липсващата част от изрязаната CDR на донор е заместена от различна последователност, и образува цяла и функционална CDR. Хибридната CDR има най-малко една промяна на аминокиселина, сравнен с цялата CDR от донора. Последователността, заместваща изрязаната част на CDR може да е която и да е последователност. За предпочитане, не-донорната част на CDR последователността е от антитялото, от което произлизат рамкираните области на молекулата на антитялото, такава като последователност на антитяло на зародишна линия.

Установено е, че молекулата на антитяло, съдържаща хибридна CDR запазва по същество същия афинитет на свързване, както молекула на антитяло, съдържаща цели CDRs на донор. Терминът "по същество същия афинитет", така, както се използва тук, означава най-малко 70 %, по-предпочитано най-малко 85 %, а най-предпочитано най-малко 95 %, от афинитета на свързване на съответната молекула на антитяло, съдържаща цели CDRs на донор. Както се посочва по-горе, в някои случаи, афинитетът на антитялото съгласно изобретението може да бъде по-голям, отколкото този на антитялото на донора. Използването на хибридна CDR предоставя предимството за намаляване количеството на чуждата (тоест, от донора) последователност, присъстваща в молекулата на антитялото, и може да повиши афинитета на свързване на молекулата на антитялото, в сравнение със съответната молекула на антитялото, съдържаща цели CDRs на донор.

Които и да са от CDRs на молекулата на антитялото могат да са хибриди. За предпочитане, CDR2 от тежката верига е хибридна в молекулата на антитялото.

За предпочитане, изрязването на CDR на

донора е от 1 до 8 аминокиселини, по-предпочитано от 4 до 6 аминокиселини. Предпочитано е, също така, изрязването да се прави при C-терминуса на CDR.

В зависимост от последователността на изрязаната част на CDR, и от последователността на различната последователност, заместваща липсващата част, могат да се направят множество промени на аминокиселини. За предпочитане, правят се промени най-малко на 2 аминокиселини, по-предпочитано, правят се промени най-малко на 3 аминокиселини, а най-предпочитано, правят се промени най-малко на 4 аминокиселини.

По-специален вариант за изпълнение в този аспект на изобретението е антитяло, съгласно първия аспект на изобретението, в който втората CDR в тежката верига има последователността, дадена като SEQ ID NO: 2. Тя има по-добър афинитет към неговия антиген, отколкото има антитялото на донора, от който произлиза част от CDR.

Настоящото изобретение също така предоставя последователност на нуклеинова киселина, която кодира молекулата на антитяло, съдържаща хибридна CDR съгласно настоящото изобретение.

Настоящото изобретение също така предоставя вектор за експресиране, съдържащ последователността на нуклеинова киселина, кодираща молекулата на антитяло, съдържаща хибридна CDR съгласно настоящото изобретение.

Настоящото изобретение също така предоставя клетка гостоприемник, трансформирана с вектора съгласно настоящото изобретение.

Настоящото изобретение също така предоставя метод за получаване на молекула на антитяло, съдържаща хибридна CDR, който се състои в култивиране на клетка гостоприемник съгласно настоящото изобретение, и изолиране на молекулата на антитялото.

Настоящото изобретение също така описва само по илюстративен начин в следващите примери, които се отнасят до придружаващите фигури, в които:

фигура 1 показва рамкирани области на лека верига на човешка подгрупа 1, сравнени с рамкирани области на лека верига на hTNF40 (SEQ ID NOS: 83 до 90);

фигура 2 показва рамкирани области на тежка верига на човешка подгрупа 1 и подгрупа 3, сравнена с рамкирани области на лека верига на hTNF40 (SEQ ID NOS: 98 и 106 до 109);

фигура 3 показва аминокиселинна последователност на CDRs на hTNF40 (SEQ ID NOS: 1 до 7), където CDR H2' е хибридна CDR, където шестте аминокиселини на C-терминала са от H2 CDR последователността на антитяло на зародишна линия на човешка подгрупа 3, и аминокиселинните промени в последователността, получени в резултат на това хибридиране са подчертани;

фигура 4 показва вектор pMR15.1;

фигура 5 показва вектор pMR14;

фигура 6 показва нуклеотида и предварително зададената аминокиселинна последователност на миши hTNF40VI (SEQ ID NO: 99);

фигура 7 показва нуклеотида и предварително зададената аминокиселинна последователност на миши hTNF40Vh (SEQ ID NO: 100);

фигура 8 показва нуклеотида и предварително зададената аминокиселинна последователност на hTNF40-gL1 (SEQ ID NO: 8);

фигура 9 показва нуклеотида и предварително зададената аминокиселинна последователност на hTNF40-gL2 (SEQ ID NO: 9);

фигура 10 показва нуклеотида и предварително зададената аминокиселинна последователност на gh1hTNF40.4 (SEQ ID NO: 10);

фигура 11 показва нуклеотида и предварително зададената аминокиселинна последователност на gh3hTNF40.4 (SEQ ID NO: 11);

фигура 12 показва вектор CTIL-gL6;

фигура 13 показва структурата на съединение наречено CDP870, съдържащо модифициран Fab фрагмент, произведен на антитяло hTNF40, ковалентно свързан посредством цистеинов остатък към лизил-малеимиден линкер, където всяка аминокиселинна група на лизиловия остатък има ковалентно прикрепен към нея метокси PEG остатък, където n е приблизително 420;

фигура 14 показва вектор pTTQ9;

фигура 15 показва последователността на OmpA олигонуклеотидния адаптер, (SEQ ID NO: 101);

фигура 16 показва вектор pACYC184;

фигура 17 показва вектор pTTO-1;

фигура 18 показва вектор pTTO-2;

фигура 19 показва вектор pDNAEng-G1;

фигура 20 показва олигонуклеотидните касети, кодиращи различни междугенни последователности за експресиране на модифициран Fab в E. coli (SEQ ID NOS: 102 до 105);

фигура 21 показва акумулиране на периплазматичен модифициран Fab на IGS варианти;

фигура 22 показва вектор pTTO (CDP870);

фигура 23 показва резултата за активността на заболяването (DAS) при пациенти, лекувани с различни дози от CDP870 и с плацебо. Средните и IQ граници са представени за популация на протокол, с последното проведено наблюдение преди това. Малките карета показват плацебо, карото показват 1 mg/kg, триъгълниците показват 5 mg/kg, а големите карета показват 20 mg/kg;

фигура 24 показва броя на меките стави, броя на подутите стави, резултата за болка, общата оценка на експерта за активността на заболяването, въпросника за оценка на модифицираното здравословно състояние (HAQ), С реактивен протеин (CRP) и скоростта на утаяване на еритроцитите (ESR) при пациенти, лекувани с различни дози от CDP870 и с плацебо. Средните и IQ граници са представени за популация на протокол, с последното проведено наблюдение преди това. Малките карета показват плацебо, карото показват 1 mg/kg, триъгълниците показват 5 mg/kg, а големите карета показват 20 mg/kg.

Примери за изпълнение на изобретението

Генно клониране и експресиране на химерна молекула на антитяло hTNF40

Получаване на РНК от hTNF40 хибридома клетки

Обща РНК се получава от 3×10^7 hTNF40 хибридома клетки, както е описано по-долу. Клетките се промиват с физиологичен разтвор, и се разтварят в РНК-зол (0,2 ml на 10^6 клетки). Прибавя се хлороформ (0,2 ml на 2 ml хомогенат), сместа се разклаща енергично в продължение на 15 s, и след това се оставя в лед в продължение на 15 min. Получените водна и органична фаза се разделят чрез центрофугиране в продължение на 15 min в центрофуга Eppendorf, и РНК се утаява из водната фаза чрез прибавяне на равен обем изопропанол. След 15 min в лед, РНК се гранулира чрез центрофугиране,

промира се със 70 % етанол, суши се, и се разтваря в стерилна вода, несъдържаща РНК-за. Добивът на РНК е 400 μg .

PCR клониране на hTNF40Vh и VI

Последователности сДНК, клониращи за различни области на тежка и лека верига на hTNF40, се синтезират, използвайки обратна транскриптаза, за да се получат копия единична верижна сДНК от иРНК, присъстващи в общата РНК, последвано от верижна полимеразна реакция (PCR) в сДНК-тата, със специфични олигонуклеотидни праймери.

а) Синтезиране на сДНК

сДНК се синтезира в 20 μg реакционен обем, съдържащ следните реактиви: 50 mM трис-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 10 mM дитиотрейтол, 3 mM MgCl₂, 0,5 mM от всеки един дезоксирибонуклеозиден трифосфат, 20 единици РНК-sin, 75 ng случаен хексануклеотиден праймер, 2 μg hTNF40 РНК и 200 единици Moloney Murine Leukemia Virus обратна транскриптаза. След инкубиране при 42°C в продължение на 60 min, реакцията се спира, посредством нагряване при 95°C в продължение на 5 min.

б) PCR

Аликвотни части от сДНК се подлагат на PCR, използвайки комбинации от праймери, специфични за тежка и лека верига. Нуклеотидните последователности на 5' праймерите за тежката и за леката верига са показани в таблици 1 и 2, съответно. Всички тези последователности съдържат, по реда на начални 7 нуклеотиди на рестрикционен сайт откъм неговите 5' краища, последователността GCCGCCACC (SEQ ID NO: 12), за да предостави оптимална трансляция на получената иРНК, кодон за инициране и 20 - 30 нуклеотиди, базиращи се на лидерните пептидни последователности на известни миши антитела (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Edition, 1991, U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health).

Праймерите 3' са показани на таблица 3. Праймерът на леката верига обхваща J-C връзката на антитялото, и съдържа рестрикционен сайт за ензима SpII, за да се улесни клонирането на фрагмента V1 PCR. Праймерите на тежките вериги 3' са смес, предназначена да обхване -С връзката на антитялото. Праймерът 3' включва ApaI рестрикционен сайт, за да се улесни

клонирането. Регионът 3' на праймерите съдържа смесена последователност, на базата на тази, намерена в познати миши антитела (Kabat et al., 1991, supra).

Описаните по-горе комбинации от праймери дава възможност на продуктите PCR за Vh и VI, да бъдат клонирани директно в подходящ експресиращ вектор (виж по-долу), за получаване на химерни (миши - човешки) тежка и лека верига, и затова да бъдат експресирани гени в клетки на бозайник, за получаване на химерни антитела от желанния изотип.

Осъществява се инкубиране (100 μg) за PCR, както следва. Всяка реакция се състои от 10 mM трис-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,01 % w/v желатин, 0,25 mM всеки дезоксирибонуклеозид трифосфат, 10 pmoles 5' праймер смес (таблица 4), 10 pmoles 3' праймер (CL12 (лека верига), или R2155 (тежка верига) (таблица 3)), 1 μg сДНК, и 1 единица Taq полимеразата. Реакциите се инкубират при 95°C в продължение на 5 min, и след това се пускат в цикъл при 94°C в продължение на 1 min, при 55°C в продължение на 1 min, и при 72°C в продължение на 1 min. След 30 цикъла, аликвотни части от всяка реакция се анализират чрез електрофореза върху агарозен гел. Реакциите с лека верига, съдържащи смеси 5' праймер от обединения 1, 2 и 7 на лека верига продуцират ивици с размери в съгласие с фрагменти VI в цяла дължина, докато реакцията от реакционно обединение 3 на тежка верига продуцира фрагмент с размер очакван за Vh ген. Ивицата, продуцирана от праймери на обединение 1 на лека верига не се следва, като предишните резултати показват, че тази ивица съответства на псевдоген на лека верига, продуциран от клетка хибридома. Ивицата, продуцирана от праймери на обединение 7 от лека верига е по-тънка от ивицата на праймерите на обединение 2, и поради това не се следва. Само ивицата от реакционно обединение 2 на лека верига, която е най-здравата ивица, се следва.

в) Молекулярно клониране на фрагменти PCR

ДНК фрагментите, продуцирани в реакционния състав 2 на лека верига, разграден с ензимите BstBI и SpII, концентриран чрез утаяване с етанол, подложен на електрофореза

в 1,4 % агарозен гел, и възстановени ДНК ивици в границите на 400 базови двойки. Те се клонират чрез лигиране във вектора pMR15.1 (фигура 4), който е обработен с рестрикционни ензими BstBI и Sp1I. След лигирането, смесите се трансформират в *E. coli* LM 1035, и плазмиди от получените бактериални колонии скринирани за инсерти чрез разграждане с BstBI и Sp1I. Представители с инсерти от всяко лигиране се анализират след това, чрез нуклеотидно секвениране.

По подобен начин, ДНК фрагменти, продуцирани в реакционното обединение 3 на тежка верига, се разграждат с HindIII и ApaI, и клонирани във вектор pMR14 (фигура 5), който се обработва с рестрикционни ензими HindIII и ApaI. Отново, представителни плазмиди, съдържащи инсерти, се анализират чрез нуклеотидно секвениране.

d) Изследване на нуклеотидна последователност

Плазмидна ДНК от голям брой изолати, съдържаща Vh инсерти се секвенира, използвайки праймерите R1053 (виж таблица 5) (който праймира 3' областта на HCMV промотора в pMR14) и R720 (виж таблица 5) (който праймира 5' областта на човешки C - гама 4 и дават възможност да се секвенира чрез ДНК инсерти върху pMR14). Установи се, че нуклеотидните последователности на Vh инсерта в голям брой клонове са идентични, с изключение за различията в сигналния пептид и J областите. Това посочва, че изследваните клонове са независими

изолати, произтичащи от използването на различни праймери от сместа на олигонуклеотиди в течение на CDR етапа. Определената нуклеотидна последователност и предварително зададената аминокиселинна последователност на променливия домен на тежката верига на анти тяло hTNF40 (hTNF40Vh) са дадени на фигура 7 (SEQ ID NO: 100).

За да се анализират клоновете на леката верига, изследва се последователността, произлизаща от праймирането с R1053 (виж таблица 5) и R684 (SEQ ID NO: 62) (който запълва 5' областта на човешки C - капа, и дава възможност да се проследи последователност чрез ДНК инсерти в pMR15.1). Нуклеотидната последователност и предварително зададената аминокиселинна последователност на гените VI, произтичащи от реакциите на обединение 2, са анализирани по еднакъв начин. Отново, се установи, че нуклеотидните последователности на Vh инсерти в голям брой клонове са идентични, с изключение за различията в сигналния пептид и J областите, което показва, че изследваните клонове са независими изолати, произтичащи от използването на различни праймери от сместа на олигонуклеотиди, използвана в течение на CDR етапа. Определената нуклеотидна последователност и предварително зададената аминокиселинна последователност на променливия домен на леката верига на анти тяло hTNF40 (hTNF40V1) са дадени на фигура 6 (SEQ ID NO: 99).

Таблица 1

Олигонуклеотидни праймери за областта 5' на миши
тежки вериги.

CH1 : 5'

ATGAAATGCAGCTGGGTCAT(G,C)TTCTT3'

(SEQ ID NO:13)

CH2 :

5'ATGGGATGGAGCT(A,G)TATCAT(C,G)(C,T)TCTT3'

(SEQ ID NO:14)

CH3 : 5'ATGAAG(A,T)TGTGGTTAAACTGGGTTTT3'

(SEQ ID NO:15)

CH4 :

5'ATG(G,A)ACTTTGGG(T,C)TCAGCTTG(G,A)T3'

(SEQ ID NO:16)

CH5 : 5'ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTT3'

(SEQ ID NO:17)

CH6 :

5'ATGGCTGTC(C,T)T(G,A)G(G,C)GCT(G,A)CTCTTCTG3'

(SEQ ID NO:18)

CH7 :

5'ATGG(G,A)ATGGAGC(G,T)GG(G,A)TCTTT(A,C)TCTT3'

(SEQ ID NO:19)

CH8 : 5'ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG3'

(SEQ ID NO:20)

CH9 :

5'ATGG(C,A)TTGGGTGTGGA(A,C)CTTGCTATT3'

(SEQ ID NO:21)

CH10: 5'ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCCCT3'

(SEQ ID NO:22)

CH11: 5'ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG3'
(SEQ ID NO:23)

CH12: 5'ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCT3'
(SEQ ID NO:24)

Всеки един от горните праймери има последователността 5'GCGCGCAAGCTTGCC GCCACC3'
(SEQ ID NO: 25), прибавена към неговия 5' край.

Таблица 2

Олигонуклеотидни праймери за областта 5' на миши леки
вериги.

CL1 : 5'ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT3'
(SEQ ID NO:26)

CL2 :
5'ATGGAG(T,A)CAGACACACTCCTG(T,C)TATGGGT3'
(SEQ ID NO:27)

CL3 : 5'ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCT3'
(SEQ ID NO:28)

CL4 :
5'ATGAGG(G,A)CCCCTGCTCAG(A,T)TT(C,T)TTGG3'
(SEQ ID NO:29)

CL5 :
5'ATGGATTT(T,A)CAGGTGCAGATT(T,A)TCAGCTT3'
(SEQ ID NO:30)

CL5A :
5'ATGGATTT(T,A)CA(A,G)GTGCAGATT(T,A)TCAGCTT3'
(SEQ ID NO:31)

CL6 :

5'ATGAGGT(T,G)C(T,C)(T,C)TG(T,C)T(G,C)AG(T,C)T(T,C)
CTG(A,G)G3' (SEQ ID NO:32)

CL7 : 5'ATGGGC(T,A)TCAAGATGGAGTCACA3'

(SEQ ID NO:33)

CL8:

5'ATGTGGGGA(T,C)CT(G,T)TTT(T,C)C(A,C)(A,C)TTTTCAAT3'
(SEQ ID NO:34)

CL9 :

5'ATGGT(G,A)TCC(T,A)CA(G,C)CTCAGTTCCTT3'

(SEQ ID NO:35)

CL10 : 5'ATGTATATATGTTTGTGTCTATTT3'

(SEQ ID NO:36)

CL11 : 5'ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTT3'

(SEQ ID NO:37)

CL12A:

5'ATG(A,G)AGT(T,C)(A,T)CAGACCCAGGTCTT(T,C)(A,G)T3'

(SEQ ID NO:38)

CL12B:

5'ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGT3' (SEQ ID NO:39)

CL13 :

5'ATGGATTCACAGGCCAGGTTCTTAT3' (SEQ ID NO:40)

CL14 :

5'ATGATGAGTCCTGCCAGTTCCTGTT3' (SEQ ID NO:41)

CL15 :

5'ATGAATTTGCCTGTTTCATCTCTTGGTGCT3'

(SEQ ID NO:42)

CL16 :

5'ATGGATTTTCAATTGGTCCTCATCTCCTT3'

(SEQ ID NO:43)

CL17A:

5'ATGAGGTGCCTA(A,G)CT(C,G)AGTTCCTG(A,G)G3'

(SEQ ID NO:44)

CL17B :

5'ATGAAGTACTCTGCTCAGTTTCTAGG3' (SEQ ID NO:45)

CL17C :

5'ATGAGGCATTCTCTTCAATTCTTGGG3' (SEQ ID NO:46)

Всеки един от горните праймери има последователността 5'GGACTGTTCGAAGCCGCCACC3' (SEQ ID NO: 47), прибавена към неговия 5' край.

Таблица 3

Олигонуклеотидни праймери за областта 3' на миши Vh и
VI гени

Лека верига (CL12):

5'GGATACAGTTGGTGCAGCATCCGTACGTTT3'

(SEQ ID NO : 48)

Тежка верига (R2155):

5'GCAGATGGGCCCTTCGTTGAGGCTG(A,C)(A,G)GAGAC

(G,T,A)GTGA3' (SEQ ID NO : 49)

Таблица 4**а) 5' смеси от праймери за PCR реакции на лека верига**

- обединение 1 : CL2.
- обединение 2 : CL7.
- обединение 3 : CL13.
- обединение 4 : CL6.
- обединение 5 : CL5A, CL9, CL17A.
- обединение 6 : CL8.
- обединение 7 : CL12A.
- обединение 8 : CL1, CL3, CL4, CL5, CL10, CL11, CL2B,
CL14, CL15, CL16, CL17B, CL17C

б) 5' смеси от праймери за PCR реакции на тежка верига

- обединение 1 : CH1, CH2, CH3, CH4.
- обединение 2 : CH5, CH6, CH7, CH8.
- обединение 3 : CH9, CH10, CH11, CH12.

Таблица 5**Праймери, използвани при изследване на нуклеотидна
последователност****R1053 : 5'GCTGACAGACTAACAGACTGTTCC3'
(SEQ ID NO : 50)****R720 : 5'GCTCTCGGAGGTGCTCCT3' (SEQ ID NO : 51)**

Оценяване на активностите на химерните гени

Активностите на химерните гени се оценява чрез тяхното експресиране в клетки на бозайник, и пречистване и количествено определяне на синтезираните нови антитела. Методиката за това е описана по-долу, след което следва описание на изследванията на биохимична и клетъчна основа, използвани за биохимичната характеристика на антителата.

а) Получаване на молекула на химерно hTNF40 антитяло.

Химерно антитяло за биологична оценка се получава чрез временно експресиране на подходящи двойки тежка и лека верига след сътрансфектиране в клетки от яйчник на китайски хамстер (CHO), използвайки утайка от калциев фосфат.

В деня преди трансфектирането, получавани се колби с клетки CHO-L761 се обработват с трипсин, клетките се преброяват, и всяка колба T75 се зарежда с 10^7 клетки.

На следващия ден, културалната среда се сменя 3 h преди трансфектирането. За трансфектиране, утайката от калциев фосфат се получава чрез смесване на 1,25 ml 0,25 M CaCl_2 , съдържащ 50 μg от всеки един от векторите, експресиращи тежка и лека верига, с 1,25 ml от 2 x HBS (16,36 g NaCl, 11,0 g HEPES и 0,4 g Na_2HPO_4 в 1 l вода с pH доведено до 7,1 с NaOH), и веднага се прибавя в средата на клетките. След 3 h при 37°C в инкубатор с CO_2 , средата и утайката се отстраняват, и клетките шокират, като се прибавят 15 ml 15 % глицерол във физиологичен разтвор, буфериран с фосфатен буфер (PBS) в продължение на 1 min. Глицеролът се отстранява, клетките се промиват веднъж с PBS, и се инкубират в продължение на 48 - 96 h в 25 ml среда, съдържаща 10 mM натриев бутират. Антитялото трябва да се пречисти от културалната среда, чрез прикрепяне към, и елиуиране с протеин А-сефароза.

б) ELISA

За ELISA, Nunc ELISA блюда се покриват в продължение на една нощ при 40°C с фрагмент F(ab)₂ на поликлонално козе античовешко антитяло специфично за фрагмент Fc (Jackson Immunoresearch, code 109-006-098) при 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ в покриващ буфер (15 mM натриев карбонат, 35 mM кисел натриев карбонат, pH

6,9). Непокритото антитяло се отстранява, като се промива 5 пъти с дестилирана вода. Проби и пречистени стандартни образци за количествено определение се разреждат до приблизително 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ в буфер (0,1 M трис-HCl, pH 7,0, 0,1 M NaCl, 0,2 % обем/обем Tween 20, 0,2 % тегло/обем казеин Hammersten). Пробите се титруват в ямки за микротитруване в 2-кратни разреждания, до получаването на краен обем от 0,1 ml във всяка ямка, и блюдата се инкубират при стайна температура в продължение на 1 h, на клатачен апарат. След първия етап на инкубиране блюдата се промиват 10 пъти с дестилирана вода, и след това се инкубират в продължение на 1 h както преди това, с 0,1 ml от мише моноклонално античовешко капа антитяло (клон GD12), конюгирано с пероксидаза, (The binding Site, code MP135) при разреждане 1 към 700 в конюгиран буфер. Блюдото се промива отново, и във всяка ямка се прибавя субстратен разтвор (0,1 ml). Субстратният разтвор съдържа 150 μl N,N,N,N-тетра-метилбензидин (10 mg/ml в DMSO), 150 μl водороден пероксид (30 % разтвор) в 10 ml 0,1 M натриев ацетат / натриев цитрат, pH 6,0. Блюдото се развива за 5-10 min, докато абсорбцията при 630 nm е приблизително 1,0 за най-големия стандартен образец. Абсорбцията при 630 nm се измерва, използвайки брояч за блюдо, и концентрацията на пробата се определя чрез сравняване на кривите на титруване с тези на стандартния образец.

в) Определяне на константи на афинитет по метода на анализ ViaCore

Взаимодействието на свързване между hTNF40 и човешки TNF се изследва, използвайки технология BIA. Пречистено козе поликлонално антитяло, насочено срещу константната област на hTNF40, се фиксира върху сензорната повърхност на стружка от декстранов полимер, използвайки стандартна NHS/EDC химия. Относително ниски нива (200 - 5 - RU) от hTNF40 се улавят, за да се осигури, че се свеждат до минимум ефектите на мас транспорта. Човешки TNF с различни концентрации се пропускат над уловените hTNF40, което дава възможност за оценяването на асоциираните кинетики. След инжектирането на лиганда, се пропуска буфер върху повърхността, така че

дисоциирането да може да се измери. Скоростните константи на асоциирането и на дисоциирането за взаимодействието между твърдата фаза на hTNF40 и човешки TNF се изчисляват, и се извежда K_D стойност.

Пример 1

CDR-присаждане на hTNF40

Молекулярното клониране на гени за вариабилните области на тежки и леки вериги на антитялото hTNF40 и използването му за получаване на химерни (миши-човешки) антитела hTNF40 е описано по-горе. Нуклеотидната и аминокиселинната последователност на миши hTNF40 VI и Vh са показани на фигури 6 и 7 (SEQ ID NOs: 99 и 100), съответно. Този опит описва CDR-присаждането на антитялото hTNF40.

CDR-присаждане на hTNF40 лека верига

Подреждането на рамковите области на hTNF40 лека верига с тези на четирите човешки подгрупи леки вериги (Kabat et al., 1991, *supra*) разкриват, че hTNF40 е най-хомоложен към антитела в човешка подгрупа лека верига 1. Следователно, за конструирането на CDR-присадена лека верига, избраните рамкирани области съответстват на тези на човешката група 1 консенсус последователност.

Сравнение на аминокиселинните последо-

вателности на рамковите области на мише hTNF40 и на консенсус леки вериги на човешка група 1 е дадено на фигура 1, и показва, че има 22 различия (подчертани) между двете последователности. Анализирването на приноса, който което и да е от тези рамкови различия би могло да има върху антигенното свързване идентифицира 2 остатъка за изследване; те са на позиции 46 и 60. На базата на този анализ, са създадени две версии на CDR-присадени леки вериги. Съгласно първата от тях, hTNF40-gL1 (SEQ ID NO: 8), остатъци 46 и 60 произлизат от леката верига на hTNF40, докато съгласно втората, hTNF40-gL1 (SEQ ID NO: 9), всичките остатъци са човешки консенсус, с изключение на остатък номер 60, който е от леката верига на hTNF40.

Конструиране на CDR-присадена лека верига на hTNF40-gL1.

Конструиране на hTNF40-gL1 е дадено по-долу в подробности. Следващото препокриване с олигонуклеотиди (P7982 - P7986) се използва при верижните реакции на полимераза (PCR), за да се събере накъсаната присадена лека верига. Събраните фрагменти имат нужда от лидерна последователност на антитялото, и от първите 17 аминокиселини на рамка 1.

Олиго 1 P7982:

5'GAATTCAGGGTCACCATCACTTGTAAGCCAGTCAGA
ACGTAGGTAACGCTAGCCTGGTATCAGCAA3'
(SEQ ID NO:52)

Олиго 2 P7983:

5'ATAGAGGAAAGAGGCACTGTAGATGAGGGCTTTTGGG
GCTTTACCTGGTTTTTGCTGATACCAGGCTACGT3'
(SEQ ID NO:55)

Олиго 3 P7984:

5'TACAGTGCCTCTTTCCTCTATAGTGGTGTACCATACAG
GTTACAGCGGATCCGGTAGTGGTACTGATTTTAC3'
(SEQ ID NO:54)

Олиго 4 P7985:

5'GACAGTAATAAGTGGCGAAATCTTCTGGCTGGAGGCT
ACTGATCGTGAGGGTGAAATCAGTACCACTACCG3'
(SEQ ID NO:55)

Олиго 5 P7986:

5'ATTTCCGCCACTTATTAAGTGTCAACAGTATAACATCTAC
 CCACTCACATTCGGTCAGGGTACTAAAGTAGAAATCAAACGT
 ACGGAATTC3' (SEQ ID NO:56)

Fwd P7981:

5'GAATTCAGGGTCACCATCACTTGTAAGCC3'
 (SEQ ID NO:57)

Bwd P7980:

5'GAATTCGGTACGTTTGATTTCTACTTTAGT3'
 (SEQ ID NO:58)

Реакция PCR, 100 microl, се прави да съдържа 10 mM трис-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,01 % тегло/обем желатин, 0,25 mM на всеки дезоксирибонуклеозиден трифосфат, 2 pmoles от P7982, P7983, P7984, P7985, P7986, 10 pmoles от P7980, P7981 и 1 единица Taq полимераза. Реакциите протичат в цикъл при 94°C в продължение на 1 min, при 55°C в продължение на 1 min, и при 72°C в продължение на 1 min. След 30 цикъла, всяка една реакция се анализира чрез електрофореза върху агарозен гел и фрагмента PCR се изрязва от гела и се възстановява, използвайки Mermaid Kit. Възстановеният фрагмент се обработва с рестрикционните ензими BstEII и SpII в подходящ буфер. Полученият продукт накрая се подлага на електрофореза върху агарозен гел и ДНК фрагментът от 270 базови двойки се възстановява от гелния срез и се лигира във

вектора CTIL5-gL6 (фигура 12), който предварително се разгражда със същите ензими. Горният вектор предоставя липсващата лидерна последователност на антиялото, и първите 17 аминокиселини на рамката 1.

Сместа за лигиране се използва за трансформиране на щам E. Coli щам LM1053, и получените колонии се анализират чрез PCR, разграждания с рестрикционен ензим, и нуклеотидно секвениране. Нуклеотидната и аминокиселинната последователност на областта VI на hTNF40-gL1 е показана на фигура 8 (SEQ ID NO: 8).

Конструиране на CDR-присадена лека верига на hTNF40-gL2.

hTNF40-gL2 (SEQ ID NO: 9) се конструира, използвайки PCR. Използват се следните олигонуклеотиди, за да се въведат промените на аминокиселини:

R1053: 5'GCTGACAGACTAACAGACTGTTCC3'

(SEQ ID NO:59)

R5350:

5'TCTAGATGGCACACCATCTGCTAAGTTTGATGCAGCAT
 AGATCAGGAGCTTAGGAGC3' (SEQ ID NO:60)

R5349:

5'GCAGATGGTGTGCCATCTAGATTCAGTGGCAGTGGAT
 CAGGCACAGACTTTACCCTAAC3' (SEQ ID NO:61)

R684: 5'TTCAACTGCTCATCAGAT3' (SEQ ID NO:62)

Две реакции, всяка по 20 microl, като се прави всяка една да съдържа 10 mM трис-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,01 % тегло/обем желатин, 0,25 mM на всеки дезоксирибонуклеозиден трифосфат, 0,1 microg hTNF40-gL1, 6 pmoles от R1053/R5350, или R5349/R684, и 0,25 единици Taq полимераза. Реакциите протичат в цикъл при 94°C в продължение на 1 min, при 55°C в продължение на 1 min, и при 72°C в продължение на 1 min. След 30 цикъла, всяка една реакция се анализира чрез електрофореза върху агарозен гел и фрагмента PCR се изрязва от гела и се възстановява, използвайки Mermaid Kit.

Аликвотни части от тях след това се подлагат на втори кръг от PCR. Реакцията, 100 microl, съдържаща 10 mM трис-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,01 % тегло/обем желатин, 1/5 от всеки от PCR фрагментите от първия комплект реакции, 30 pmoles от R1053 и R684, и 2,5 единици Taq полимераза. Температурите на реакциите са както по-горе. След PCR, сместа се екстрахира с фенол/хлороформ, и след това с хлороформ, и се утаява с етанол. Етаноловата утайка се възстановява чрез центрофугиране, разтваря се в подходящ буфер, и се обработват с рестрикционните ензими BstEII и Sp1I. Полученият продукт накрая се подлага на електрофореза върху агарозен гел и ДНК фрагмента от 270 основни двойки се възстановява от гелен срез и се лигира във вектора pMR15.1 (фигура 4), който предварително се разгражда със същите ензими.

Сместа за лигиране се използва за трансформиране на *E. Coli* щам LM1053, и получените колонии се анализират чрез PCR, разграждания с рестрикционен ензим, и нуклеотидно секвениране. Нуклеотидната и аминокиселинната последователност на областта VI на hTNF40-gL2 е показана на фигура 9 (SEQ ID NO: 9).

CDR-присаждане на тежка верига на hTNF40

CDR-присаждане на тежката верига на hTNF40 се осъществява, като се използва същата стратегия, както описаната за леката верига. Установено е, че тежката верига на hTNF40 е най-хомоложна към човешка тежка верига, принадлежаща на подгрупа 1, и поради това консенсус последователност на рамките на човешка подгрупа 1 се избират да приемат hTNF40 тежката верига на CDRs.

За да се изследва необходимостта хомоложна човешка рамка да действа като рамка приемник за CDR присаждане, избира се втора рамка, човешка група 3, да хуманизира тежка верига на hTNF40.

Сравнение на hTNF40 с двете различни рамкови области е показано на фигура 2, където може да се види, че hTNF40 се различава от консенсус човешка подгрупа 1 в 32 позиции (подчертано), и се различава от консенсус човешка подгрупа 3 в 40 позиции (подчертано). След анализирането на ползата, което всяко едно от тях би могло да даде за свързване на антиген, остатъци 28, 38, 46, 67, 69 и 71 се ангажират като донор в CDR-присадената тежка верига на hTNF40.1, използвайки рамката на група 1. Остатъци 27, 28, 30, 48, 49, 69, 71, 73, 76 и 78 се ангажират като донор в CDR-присадената тежка верига, gh3hTNF40.4, използвайки рамката на група 3. Остатъци 28, 69 и 71, се ангажират като донор в CDR-присадената тежка верига, gh3hTNF40.4, използвайки рамката на група 1.

Конструиране на CDR-присадена тежка верига на gh1hTNF40.4

Gh1hTNF40.4 (SEQ ID NO: 10) се събира, като се подложи на препокриване на олигонуклеотиди за PCR в присъствие на подходящи праймери. Следващите олигонуклеотиди се използват в PCR:

Группа 1 присадка

Олиго 1 P7989:

5'GAAGCACCCAGGCTTCTTAACCTCTGCTCCTGACTGGA
CCAGCTGCACCTGAGAGTGCACGAATTC3' (SEQ ID NO:63)

Олиго 2 P7990:

5'GGTTAAGAAGCCTGGTGCTTCCGTCAAAGTTTCGTGT
AAGGCCTCAGGCTACGTGTTACAGACTATGGTA3'
(SEQ ID NO:64)

Олиго 3 P7991:

5'ССААСССАТССАТТТСАГГССТТГТСССГГГГССТГС
ТТГАСССААТТСАТАССАТАГТСТГТГААССАГТ3'
(SEQ ID NO:65)

Олиго 4 P7995:

5'GGCCTGAAATGGATGGGTTGGATTAATACTTACATTG
GAGAGCCTATTTATGTTGACGACTTCAAGGGCAGATTCACGT
TC3' (SEQ ID NO:66)

Олиго 5 P7992:

5'ССАТГТАТГСАГТГСГТТГТГГАГГТГТСТАГАГТГА
АСГТГААТСТГСССТТГАА3' (SEQ ID NO:67)

Олиго 6 P7993:

5'ССАСААГСАСТГСАТАСАТГГАГСТГТСАТСТСТГАГ
АТССГАГГАСАССГСАГТГТАСТАТ3' (SEQ ID NO:68)

Олиго 7 P7994:

5'ГААТТССГТАСССТГГССССАГТАГТССАТГГСАТАА
ГАТСТГТАТССТСТАГСАСААТАГТАСАСТГССГТГТСССТС3'
(SEQ ID NO:69)

Fwd: P7988:

5'ГААТТССГТГСАСТСТСАГГТГСАГСТГГТС3'
(SEQ ID NO:70)

Bwd: P7987:

5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCAT3'

(SEQ ID NO:71)

Агрегатът от реакцията, 100 microl, съдържаща 10 mM трис-НСв рН 8,3, 1,5 mM MgСв₂, 50 mM КСв, 0,01 % тегло/обем желатин, 0,25 mM на всеки дезоксирибонуклеозиден трифосфат, 2 pmoles от p7989, p7990, p7991, p7995, p7992, p7993 и p7994, 10 pmoles от всеки един от p7988, и p7987 и 1 единица Taq полимеразата. Реакциите протичат в цикъл при 94°C в продължение на 1 min, при 55°C в продължение на 1 min, и при 72°C в продължение на 1 min. След 30 цикъла, реакцията се екстрахира с фенол/хлороформ (1/1), след това с хлороформ, и се утаява с етанол. След центрофугиране ДНК се разтваря в подходящия рестрикционен буфер, и се разгражда с AраLI и KpnI. Полученият фрагмент се изолира от агарозен гел и се лигира в pMR14 (фигура 5), който предварително се разгражда със същите ензими. pMR14 съдържа константната област на човешка гама 4 тежка верига, когато pMR14 се разцепва с AраLI и KpnI, отцепеният вектор е в състояние да получи

разградената ДНК, така че 3' краят на разградената ДНК съединява в рамка за разчитане на 5' края на последователността кодираща гама 4 константната област. Поради това, тежката верига, експресирана от този вектор ще бъде изотип на гама 4. Сместа за свързване се използва за трансформиране на E. Coli LM1053, и получените бактериални колонии, скринирани чрез рестрикционно разграждане и анализиране на нуклеотидна последователност. По този начин, се идентифицира плазмид, съдържащ коректната последователност за gh1hTNF40.4 (фигура 10) (SEQ ID NO: 10).

Конструиране на CDR-присадена тежка верига на gh3hTNF40.4

gh3hTNF40.4 (SEQ ID NO: 11) се събира, като се подложи на припокриване на олигонуклеотиди за PCR в присъствие на подходящи праймери. Следващите олигонуклеотиди се използват в PCR:

Група 3 присадка

Олиго 1 P7999:

5'GATCCGCCAGGCTGCACGAGACCGCCTCCTGACTCG
ACCAGCTGAACCTCAGAGTGCACGAATTC3' (SEQ ID NO:72)

Олиго 2 P8000:

5'TCTCGTGCAGCCTGGCGGATCGCTGAGATTGTCCTGT
GCTGCATCTGGTTACGTCTTCACAGACTATGGAA3'
(SEQ ID NO:73)

Олиго 3 P8001:

5'CCAACCCATCCATTTACGGCCCTTTCCCGGGGCCTGC
TTAACCCAAATTCATTCCATAGTCTGTGAAGACGT3'
(SEQ ID NO:74)

Олиго 4 P7995:

5'GGCCTGAAATGGATGGGTTGGATTAATACTTACATTG
GAGAGCCTATTTATGTTGACGACTTCAAGGGCAGATTACAGT
TC3' (SEQ ID NO:66)

Олиго 5 P7997:

5'GGAGGTATGCTGTTGACTTGGATGTGTCTAGAGAGAA
CGTGAATCTGCCCTTGAA3' (SEQ ID NO:75)

Олиго 6 P7998:

5'CCAAGTCAACAGCATACTCCAAATGAATAGCCTGAG
AGCAGAGGACACCGCAGTGTACTAT3' (SEQ ID NO:76)

Олиго 7 P7993:

5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCATGGCATAA
GATCTGTATCCTCTAGCACAAATAGTACACTGCGGTGTCCTC3'
(SEQ ID NO:77)

Fwd: P7996:

5'GAATTCGTGCACTCTGAGGTTTCAGCTGGTTC3'
(SEQ ID NO:78)

Bwd: P7987:

5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCAT3'
(SEQ ID NO:71)

Агрегатът от реакцията, 100 microl, съдържаща 10 mM трис-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,01 % тегло/обем желатин, 0,25 mM на всеки дезоксирибонуклеозиден трифосфат, 2 pmoles от p7999, p8000, p8001, p7995, p7997, p7998 и p7993, 10 pmoles от всеки един от p7996, и p7987 и 1 единица Taq полимераза. Реакциите протичат в цикъл при 94°C в продължение на 1 min, при 55°C в продължение на 1 min, и при 72°C в продължение на 1 min. След 30 цикъла, реакцията се екстрахира с фенол/хлороформ (1/1), след това с хлороформ, и се утаява с етанол. След центрофугиране ДНК се разтваря в подходящия рестрикционен буфер, и се разгражда с ApaI и KpnI. Полученият фрагмент се изолира от агарозен гел и се лигира в pMR14 (фигура 5), който предварително се разгражда със същите ензими. pMR14 съдържа константна област на тежка верига на човешки гама 4. Когато pMR14 се отцепва с ApaI и KpnI, присъединеният вектор е в състояние да получи разградената ДНК, така че 3' краят на разградената ДНК да съединява в рамка за разчитане на 5' края на последователността кодираща гама 4 константната област. Поради това, тежката верига, експресирана от този вектор ще бъде изотип на гама 4. Сместа за свързване се използва

ва за трансформиране на E. Coli LM1053, и получените бактериални колонии, скринирани чрез рестрикционно разграждане и анализиране на нуклеотидна последователност. По този начин, е идентифициран плазмид, съдържащ коректната последователност за gh3hTNF40.4 (SEQ ID NO: 11) (фигура 11).

Получаване на CDR-присаден модифициран Fab фрагмент.

CDR-присаден, модифициран Fab фрагмент, на базата на анти тяло hTNF40, се конструира, като се използва E. coli вектора pTTO-1. Вариабилните области на hTNF40 се субклонират в този вектор, и междугенната последователност се оптимизира, за да създаде pTTO(CDP870). Векторът, експресиращ pTTO е предназначен да даде повишаване на разтворимото, периплазматично акумулиране на рекомбинантни протеини в E. coli. Главните особености на този плазмид са:

(i) маркер за резистентност на тетрациклин - антибиотика не се инактивира от продукта на резистентен ген, от което следва, че се поддържа селекционирането на плазмид-съдържащи клетки]

(ii) малък брой копия - начало на репликация произхождаща от плазмид p15A, който е

сравним с плазмид, съдържащ *colE* произлизащи репликони;

(iii) силен, индуцируем *tac* промотор за транскриптиране на клониран(и) ген(и);

(iv) *LacI^q* ген - дава конститутивно експресиране на *lac* репресорния протеин, поддържащ *tac* промотора в репресирано състояние, до индуциране с IPTG/алолактоза;

(v) *OmpA* сигнална последователност - дава периплазматично секретирание на клониран(и) ген(и); и

(vi) транслационно свързване на *OmpA* сигнална последователност към към *lacZ* пептид, даващ резултатно инициране на транслиране.

Векторът е развит за експресиране на модифицирани Fab фрагменти от дицистронно съобщение от проектирането на метода да селектира емпирично оптимална интергенна последователност от серия от по четири целесъобразно създадени касети. Описано е апликирането им в конструкцията на рТТQ (CDP870).

Материали и методи

ДНК техники

Стандартни методики се използват за протоколи, включително ДНК обработване с рестрикционни ензими, електрофореза върху агарозен гел, лигиране и трансформиране. Рестрикционни ензими и ДНК модифициращи ензими се доставят от New England Biolab, или Boehringer Mannheim, и се използват съгласно приложените упътвания. ДНК фрагментите се пречистват от агароза, използвайки GeneClean protocol (BIO 101). Олигонуклеотиди се доставят от Oswel Oligonucleotide Service, и се синтезират по скалата 40 nm. Плазмид ДНК се изолира, използвайки Plasmid DMA Mini/Midi kits от Qiagen. PCR се осъществява, използвайки Perkin Elmer "Amplitaq", съгласно указаниято. ДНК секвенирането се осъществява, използвайки Applied Biosystems Tag cycl sequencing kit.

Индуциране в клатачна колба

Култура *E. coli* W3110 се посяват в L-бульон, в който се добавя тетрациклин (7,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). За индуцирания, свежа култура от една нощ (прораснала при 30°C) се долива до OD₆₀₀ на 0,1 в 200 ml L-бульон в 2 l разделителна колба, и прерастват при 30°C в орбитален инкубатор. При OD₆₀₀ от 0,5, се прибавя IPTG към 200 $\mu\text{g}/\text{M}$. Взимат се проби (калибрирани

за OD) на интервали.

Периплазматично екстрахиране

Проби от култура се замразяват на лед (5 min), след това се събират клетки чрез центрофугиране. След повторно суспендиране в екстракционен буфер (100 mM трис-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,4), пробите се инкубират в продължение на една нощ при 30°C, след това се избистрят (изчистват от примеси) чрез центрофугиране.

Количествен анализ на агрегата

Модифицирани Fab концентрати се определят чрез ELISA. Блюдата се покриват при 4°C с античовешки Fd 6045 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ в покриващ буфер, физиологичен разтвор, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ на ямка). След промиване, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ от проба се пълни в ямка; като стандарт се използва пречистен A5B7 гама-1 Fab', отначало при 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Пробите се разреждат на серии 2-кратно в блюдото в проба от конюгиращ буфер (на литър: 6,05 g трис-аминометан; 2,92 g NaCl; 0,1 ml Tween-20; 1 ml казеин (0,2 %)); блюдата се инкубират в продължение на 1 h при стайна температура, при разбъркване. Блюдата се промиват и се сушат, след това се прибавят 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ от античовешка C-капа (GD12)-пероксидаза (разредена в буфер съединен с проба). Инкубирането се извършва при стайна температура в продължение на 1 h, при разбъркване. Блюдата се промиват и се сушат, след това се прибавят 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ от субстратния разтвор (10 ml разтвор натриев ацетат/цитрат (0,1 M pH 6); 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ разтвор на H₂O₂; 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ тетраметилбензидинов разтвор (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ в диметилсулфоксид)). Абсорбция при 630 nm се отчита 4-6 min след прибавянето на субстрата.

Конструиране на плазмид рТТQ-1

(а) заместване на рТТQ9 полилинкер

Плазмид рТТQ9 се доставя от Amersham и е показан на фигура 14. Една аликвотна част (2 μg) се разгражда с рестрикционни ензими SalI и EcoRI, разграденият продукт се пуска на 1 % агарозен гел, и широк ДНК фрагмент (4520 bp) се пречиства. Синтезират се два олигонуклеотида, които, когато са хибридизирани заедно, кодират областта *OmpA* на полилинкера, показана на фигура 15. Тази последователност има кохезивни краища, които са сравними с краищата на SalI и EcoRI, генерирани от обработването с рестрикционни ензими на рТТQ9. Чрез

клонирание на тази олигонуклеотидна "касета" във вектора рТТQ9, Sall сайта не се регенерира, но EcoRI сайта се поддържа. Касетата кодира първите 13 аминокиселини на сигналната последователност на протеина на външната мембрана Omp-A на *E. coli*, предхождан от Shine Dalgarno рибозом свързващия сайт на гена OmpA. Освен това, присъстват рестрикционни сайтове за ензими XbaI, MunI, StyI и SplI. Сайтовете MunI и StyI са в кодиращата област на сигналната последователност OmpA, и са предназначени да са 5' клониращи сайтове за инсерирание на гени. Двата олигонуклеотида, които правят тази касета, се хибридизират заедно, чрез смесване при концентрация на 5 pmol/microl, и водна баня до 95°C в продължение на 30 min, след това бавно се охлаждат до стайна температура. Хибридизираната последователност след това се лигира в Sall/EcoRI срязан рТТQ9.

(b) Получаване и лигиране на фрагмент

Плазмид рТТQ-1 се конструира чрез лигиране на един ДНК фрагмент от плазмид рАСУС184 до два фрагмента генерирани от рТQOmp. Плазмид рАСУС184 се доставя от New England Biolabs, а рестрикционна карта е показана на фигура 16. Една аликвотна част (2 microg) се разгражда напълно с рестрикционен ензим StyI, след това ѝ се действа с Mung Bean Nucleasa; при това въздействие се създават тъпи краища, чрез срязване след 5' висящите бази. След екстрахиране с фенол и утаяване с етанол, ДНК се разгражда с ензими PvuII, генериращи фрагменти на 2348, 1081, 412 и 403 bp. Фрагментът 2348 bp се пречиства след електрофореза върху агарозен гел. Този фрагмент кодира маркер за резистентност на тетрациклин, и началото на репликирането на р15A. След това на фрагмента се действа с телешка интестинална

алкална фосфатаза, за да се отстранят 5' терминалните фосфати, като с това се предотвратява самолигирането на тези молекули.

Една аликвотна част (2 microg) от плазмид рТQOmp се разгражда с ензимите StyI и EcoRI, и фрагментът 2350 bp се пречиства от нежелани фрагменти 2040 bp и 170 bp, след електрофореза върху агарозен гел; този фрагмент кодира областта на транскрипционния терминатор и гена lacI^q. Друга аликвотна част (2 microg) от плазмид рТQOmp се разгражда с EcoRI и XmnI, генериращи фрагменти 2289, 1670, 350 и 250 bp. Фрагментът 350 bp, кодиращ тас промотора, OmpA сигналната последователност, и мултиклониращия сайт, се пречиства чрез гел.

След това трите фрагмента се лигират, използвайки приблизително еквимоларни количества от всеки фрагмент, за да се генерира плазмид рТТQ-1. Всички клониращи съединения се проверяват чрез ДНК секвениране. Рестрикционната карта на този плазмид е показана на фигура 17. След това се създава плазмид рТТQ-2, като се инсерира ДНК кодираща капа константен домен на лека верига на човешки Ig. Той се получава като рестрикционен фрагмент Spl I - EcoRI от плазмид рHC132, и инсерирани в съответните сайтове в рТТQ-1. Плазмид в рТТQ-2 е показан на фигура 18.

Инсерирание на хуманизиран hTNF40 вариабилни области в рТТQ-2

Вариабилната област на леката верига на hTNF40gL1 (SEQ ID NO: 8) се получава чрез PCR "освобождение" от съответния вектор за експресиране на клетка от бозайник рMR10.1. Лидерната последователност OmpA замества нативния Ig лидер. Последователността на PCR праймерите е показана по-долу:

Праймер 5':

**CGCGCGGCAATTGCAGTGGCCTTGGCTGGTTTCGCTAC
CGTAGCGCAAGCTGACATTCAAATGACCCAGAGCCC
(SEQ ID NO:79)**

Праймер 3':

TTCAAAGTGCATCAGATGG (SEQ ID NO:80)

След PCR при стандартни условия, продуктът се пречиства, разгражда се с ензими MunI и SpII, след това се пречиства с гел. След това пречистеният фрагмент се инсерира в сайтовете MunI/SpII на рТТ0-2, за да се създаде

междинната рТТ0(hTNF40L) лека верига.

Вариабилната област на тежката верига на gh3hTNF40.4 се получава по същия начин от вектора pGamma-4. Последователността на PCR праймерите е показана по-долу:

Праймер 5':

GCTATCGCAATTGCAGTGGCGCTAGCTGGTTTCGCCAC
CGTGGCGCAAGCTGAGGTTTCAGCTGGTTCGAGTCAGGAGGC
(SEQ ID NO:81)

Праймер 3':

GCCTGAGTTCCACGACAC (SEQ ID NO:82)

След PCR продуктът се пречиства, разгражда се с ензими NheI и ApaI, след това се субклонира във вектора рДНКbEng-G1 (фигура 19). След проверяване чрез ДНК секвениране, тежката верига се обработва с рестрикционен ензим EcoRI, и се субклонира в EcoRI сайта на рТТ0(hTNF40L), за да се създаде експресионна плазмид рТТ0(hTNF40L) на E. coli.

Оптимизиране на междугенна последователност за експресиране на модифициран фрагмент

Във вектора рТТ0, модифициран Fab фрагмент се появява от дицистронно съобщение, кодиращо първо лека верига, след това тежка верига. ДНК последователността между двата гена (междугенна последователност, IGS) може да оказва влияние върху нивото на експресиране на тежката верига, като засяга скоростта на транслационното инициране. Например, къса междугенна последователност може да доведе до транслационно присъединяване между леката и тежката верига, при което транслационният рибозом може да не се дисоциира напълно от иРНК след като синтезирането на леката верига завърши преди инициране на синтезирането на тежката верига. "Силата" на който и да е Shine Delgarno (SD) рибозомен присъединяващ сайт (хомолог на 16S rРНК) може също така да има ефект, както може да има и разстоянието и състава на последователността между SD и ATG стартовия кодон. Потенциалната вторична структура на иРНК около ATG, е друг важен

фактор; ATG ще бъде в "бримка" и няма да е скован в "стебло", докато обратното важи за SD. Така, чрез модифициране на състава и дължината на IGS, е възможно да се модифицира дължината на транслационното инициране, а оттук и нивото на получаването на тежка верига. Подходящо е, оптималната степен на транслационно инициране да изисква да се осъществи до максимално експресиране на тежката верига на даден модифициран Fab. Например, с един модифициран Fab, може да се толерира високо ниво на експресиране, но за различно модифициран Fab с различна аминокиселинна последователност, високо ниво на експресиране може да се окаже токсично, може би поради различните резултати от секретирание, или прегъване. Поради тази причина, създават се серии от четири междугенни последователности (фигура 20), позволяващи емпиричното определяне на оптимално IGS за hTNF40-базиран модифициран Fab. IGS1 и IGS2 имат много къси междугенни последователности (-1 и +1 съответно), и може да се очаква да дадат плътно свързана транслация; SD последователностите (подчертани) са незабележимо различни. Тези две последователности най-вероятно дават високо ниво на транслационно инициране. IGS3 и IGS4 имат по-дълго разстояние между стартовите и стоп кодоните (+13), и се различават по състава на тяхната последователност; IGS3 има "по-силна" SD последователност. Всички последователности се

изследват за вторична структура (използвайки програма m/гънка), и “се оптимизират” толкова, колкото е възможно; обаче, с недостатъчно съединяване на трансляцията на двете вериги, липсата на рибозомно дисоцииране означава, че иРНК може да не е “оголена”, предотвратяващо образуването на вторична структура.

Клонирание на IGS варианти

Касетите IGS, показани на фигура 20 имат граничещи SacI и MunI клониращи сайтове. Те са построени чрез хибридиране на комплементарни олигонуклеотидни двойки. Векторен фрагмент се получава чрез разграждане на рТТO(hTNF40) със SacI и NotI, а фрагмент на тежка верига се получава чрез разграждане на рДНКbEngG1(hTNF40H) с MunI и NotI. След това се осъществяват три начина на лигиране, използвайки еквимоларни количества от двата рестрикционни фрагмента, и приблизително 0,05 pmoles от всяка една от хибридираните олиго касети. Това създава четирите експресионни плаزمиди рТТO (hTNF40 IGS-1), рТТO (hTNF40 IGS-2), рТТO (hTNF40 IGS-3), рТТO (hTNF40 IGS-4).

Експресионен анализ в клатъчна колба

Четирите плаزمиди се трансформират в *E. coli* щам W3110, заедно с оригиналната експресионна конструкция, и след това се анализират за експресиране в клатъчни колби, съгласно описанието. Резултатите от характерния експеримент са посочени на фигура 21. Различните междугенни последователности дават различни експресионни профили. IGS-1 и IGS-2 акумулират периплазматичен модифициран Fab бързо, с пик на 1 h след индуциране, след което възстановеното ниво спада. Пикът е по-голям, и спадът е по-остър за IGS1. Тези резултати съответстват с високо ниво на синтезиране, както се очаква за плътно трансляционно свързване на тези конструкции. IGS1 очевидно води до по-високо ниво на експресиране на тежка верига, отколкото IGS2. В този случай, изглежда че това високо ниво на експресиране е по-слабо толерирано, тъй като нивата на периплазматично експресиране спадат след пика на 1 h. Това се вижда на профила на растеж на културата IGS1 (не е показано), чийто пик на 1 h след индуциране преди спадане, предполага умиране на клетките и лизис. IGS3 акумулира модифициран Fab по-бавно, но се издига най-високо на 2 h след индуцирането,

с най-висока стойност на пика (325 ng/ml/OD), преди спадането на нивата. Растежа на тази култура продължава до 3 h след индуцирането, и достига до по-висок пик на биомаса (не е показано).

Това е в съгласие с по-ниското ниво на синтезиране на тежка верига. IGS4 акумулира материал при по-малка скорост все още, и не успява да достигне високия пик на продуктивност на другите 3 конструкции. Всички IGS варианти превъзхождат оригиналния вектор значително. Хипотезата, че различните IGS последователности дават различни скорости на трансляционно инициране се поддържа от тези експериментални резултати. За модифициран Fab на базата на hTNF40, изглежда че висока скорост на трансляционно инициране на тежка верига е слабо толерирана, и поради това не е оптимална. По-малка скорост, както е за IGS3, води до по-добри растежни характеристики, и, следователно, натрупване на по-добър добив с времето.

След сравняване на продуктивността във ферментатора, конструкцията IGS3 се избира като даваща най-висок добив, и е наречена рТТO(CDP870) - виж фигура 22.

Тежката верига, кодирана от плазмиди рТТO(CDP870) има последователността, дадена в SEQ ID NO: 115, а леката верига има последователността, дадена в SEQ ID NO: 113.

PEG-илиране на CDR-присаден, hTNF40-базиран модифициран Fab

Пречистеният модифициран Fab е специфично сайт конюгиран с разклонена молекула на PEG. Това се осъществява чрез активиране на единичен цистеинов остатък в отрязана стърчаща област на модифицирания Fab, последвано от реакция с (PEG)-лизил малеимид, както е описано предварително (A. P. Chapman et al., Nature Biotechnology 17, 780-783, 1999). PEG-илираната молекула е показана на фигура 13, и се нарича съединение CDP870.

Ефикасност на PEG-илиран CDR-присаден, hTNF40-базиран модифициран Fab (CDP870) при лечение на ревматоиден артрит

CDP870 има дълъг полуживот от порядъка на приблизително 11 дни.

Ние оценяваме безопасността и ефикасността на интравенозен CDP870 при опит със случайно двойно-сляпо дозиране с контрола

плацебо, при пациенти с RA.

Методи

Пациенти:

Пациенти на възраст между 18 и 75 години, и които удовлетворяват преразгледания през 1987 г. от American College of Rheumatology (ACR) diagnostic criteria for reumatoid arthritis (RA) (критерии за диагностициране на ревматоиден артрит) (Arnet et al., *Arthritis Reum.*, 31, 315-324, 1988), се избират от приходящи пациенти на Rheumatology clinics at London, Cambridge, Norfolk and Norwich (Unated Kingdom). Изисква се пациентите да имат клинично активно заболяване, което се определя, ако имат най-малко 3 от следните критерии: ? 6 болезнени, или меки стави; ? 45 min на сутрешна скованост; и скорост на утаяване на еритроцитите (ESR) ? 28 mm/hr. Те трябва да са имали неуспех при отговор на най-малко едно модифициращо болестта противоревматично лекарство средство (Disease Modifying Anti-Rheumatic Drug (DRARD)) и са били подложени на лечение най-малко 4 седмици. Кортикостероиди са позволени, ако дозата е ? 7,5 mg/ден преднизолон. Бременни жени, кърмачки и жени в детеродна способност, неизползващи ефективен контрацептивен метод се изключват. Пациентите се изключват също така, ако те имат предшестваща история на злокачествено заболяване, съпътстващи тежки неконтролирани медицински състояния, предишен неуспех на лечение неутрализиращо TNF, или алергия към полиетиленгликол. Писмено информиращо съгласие се получава от всеки пациент преди записването. Изследването е одобрено от местния комитет по етика на изследванията.

Протокол на лечението

36 RA пациенти се разделят на 3 групи, като всяка една получава повишаваща доза от опитното лекарство средство (1, 5, или 20 mg/kg). Всяка група от 12 се разделя произволно на 8, които да получат CDP870, и 4, които да получат плацебо. CDP870 се дава като единична интравенозна инфузия (100 ml общо) в продължение на 60 min. Плацебо (натриево-ацетатен буфер) се дава по подобен начин като единична интравенозна инфузия от 100 ml в продължение на 60 min. Лечението се провежда на базата на приходящи пациенти. След 8 седмици, всички пациенти са имали

възможността да получат инфузия или от 5, или от 20 mg/kg CDP870 по отворен начин.

Клинично изследване

Активността на RA заболяване се изследва на базата на World Health Organization (Световната здравна организация) и International League of Associations for Rheumatology (Международен съюз на асоциациите по ревматология) (Boers et al., *Reumatol - Supplement*, 41, 86-89, 1994) и European League Against Rheumatism (EULAR) (Европейския съюз срещу ревматизъм) (Scott et al., *Clin. Exp. Reumatol.*, 10, 521-525, 1992) съществените данни са изложени за бройка от 28 стави. Промени в активността на заболяването се изследват чрез Disease Activity Score (Prevo et al., *Arthritis Rheum.*, 38, 44-48, 1995) и ACR responses criteria (Felson et al., *Arthritis Rheum.*, 38, 727-735, 1995). Изследвания се провеждат преди лечението, и на 1, 2, 4, 6 и 8 седмици след лечението. Пациентите също така се изследват за безопасност и поносимост на изследваното лекарство средство. Хематология, биохимия, противо-CDP870 антитела и различни възможности се изследват при всяка визита.

CDP870 плазмена концентрация и противо-CDP870 антитела

CDP870 се измерва чрез изследване на ензимно-свързан имуносорбент (ELISA). Серийни разреждания на плазма от пациенти се инкубират в блюда за микротитруване (Nunc) покрити с рекомбинантни човешки TNF α (Strathmann Biotech GmbH, Hannover). Уловен CDP870 се проявява чрез козя противочовешка капа лека верига конюгирана с пероксидаза от хрян (Cappel, INC), последвано от тетраметилбензидинов (TMB) субстрат.

Антитела срещу CDP870 се скринират (при 1/10 разреждане на плазма), използвайки сандвич ELISA двоен антиген с биотинилиран CDP870 като втори пласт. Свързаните антитела се освобождават, използвайки HRP-стрептавидин и TMB субстрат. Изследването се калибрира, използвайки свръхимунен заешки IG стандарт. Единицата за активност е еквивалентна на 1 microg заешки стандарт.

Статистически анализ

Изследването е изследователско по отношение на природата, и размера на пробата се базира на предварителен опит с подобни средства. Ефикасността на CDP870 се

анализира, като се изчисли резултата от активността на заболяването (DAS) и ACR20/50 отговори за намерението да се лекува и за протокол, използвайки методика на плътно изпитание. Резултатът от активността на заболяването се изчислява както следва: $DAS = 0,555 \times \text{корен квадратен от (28 меки стави)} + 0,284 \times \text{корен квадратен от (28 подути стави)} + 0,7 \times \text{In(ESR)} + 0,0142 \times \text{(обща оценка на пациента)}$. Най-напред, обединените активни групи се сравняват с плацебо. Ако това сравнение е значимо при 5 % ниво, всяка група на дозиране се сравнява с плацебо. Всички сравнения са двойно обработени със значимо ниво от 5 %. Всички P-стойности произлизат от изследователските анализи, и не се използват за инференциращи интерпретации.

Резултати

Демография

Приемат се 36 пациенти с RA. Техните демографски подробности са дадени на таблица 6. Средната възраст е 56 години, и 30 пациенти са жени. Средната продължителност на RA е 13 години, а 21 пациенти са с положителен ревматоиден фактор. Пациенти в различните групи имат подобни демографски характеристики. През периода на сляпо дозиране, 6/12 пациенти лекувани с плацебо отпадат от изследването поради влошаване на RA ? 4, седмици след дозирането. 2/24 пациенти, лекувани с CDP870 отпадат, и двата в групата с 1 mg/kg, поради влошаване на RA/загуба при следващите > 4 седмици след дозирането. Разликата е статистически значителна ($p = 0,009$, Fisher exact test).

**Таблица 6: Демографски подробности
(средно \pm стандартно отклонение)**

	Брой	Пол (М:Ж)	Възраст	Продъл- жител- ност на заболя- ването	Рев- матои- ден фак- тор	Брой на предиш- ни DMARDs
Плацебо	12	1,11	51 \pm 8	12 \pm 8	8(67%)	5 \pm 1
1 mg/kg	8	1:7	59 \pm 7	12 \pm 7	4(50%)	4 \pm 1
5 mg/kg	8	2:6	54 \pm 13	13 \pm 5	5(63%)	5 \pm 2
20 mg/kg	8	2:6	61 \pm 11	14 \pm 13	4(50%)	4 \pm 2

Клинична ефикасност

Пропорционалността на пациенти с ACR20 подобрене за популацията на протокол с последно извършено наблюдение преди това, е 16,7, 50, 87,5, и 62,5 % след плацебо, 1,5 и 20 mg/kg CDP870 (комбиниран лечебен ефект $p = 0,012$) на 4 седмици, и 16,7, 25, 75 и 75 % ($p = 0,032$) на 8 седмици. Намаление на резултата на DAS (средно) за популацията на протокол с

последно извършено наблюдение е 0,15, 1,14, 1,91 и 1,95 след плацебо, 1,5 и 20 mg/kg CDP870 (комбиниран лечебен ефект $p = 0,001$) на 4 седмици, и 0,31, 0,09, 2,09 и 1,76 ($p = 0,008$) на 8 седмици (фигура 23). Изменения в отделните съставни части на World Health Organization и International League of Associations for Rheumatology комплект от съществени данни е показан на фигура 24.

След отворената белязана доза за еднократно дозиране на CDP870, се постигат подобни благоприятни ефекти. От 36-те пациенти, приети за изследването, 32 получават втора инфузия с CDP870. Пропорционалността на пациенти с ACR20 подобрене от предшестващото първо инфузиране е 72,2 и 55,6 % след 5 и 20 mg/kg CDP870 на 4 седмици, и 55,6 и 66,7 % на 8 седмици.

Нежелателни явления

Лечението се понася добре, без свързана с инфузия реакция. Не се докладва за никаква алергична реакция, или кожен обрив. При двойно-сляпата фаза, има 19, 38, 8 и 14 нежелателни явления с плацебо, в групите с 1, 5 и 20 mg/kg съответно. Най-общото е главоболие с 9 епизоди при 5 пациента (1 с плацебо, 3 с 1 mg/kg, 1 с 20 mg/kg). Един пациент, който получава плацебо и 3 пациенти, които получават CDP870 (1 с 5 mg/kg, и 2 с 20 mg/kg) развиват инфекции в долните дихателни пътища. Те се докладват като средни, или умерени. Те се лекуват с орално приложение на антибиотици, и се възстановяват след 1-2-седмичен период. Трима пациенти, всеки един от които в групите с 1 и 5 mg/kg и един в групата с 20 mg/kg развиват инфекция на пикочните пътища 1-2 месеца след лечението с CDP870. Едно нежелателно явление е описано като тежко, което е епизод на болки в гърлото, появили се 3 дена след инфузия с 1 mg/kg. Повишаване на антинуклеарно антитяло се наблюдава при 4 пациенти: 1 в групата на плацебо (отрицателно до 1/40), 2 в групата с 1 mg/kg (отрицателно до 1/40, отрицателно до 1/80), и 1 в групата с 20 mg/kg (отрицателно до 1/40). Не се установяват промени в анти-ДНК антителата, или в антителата анти-кардиолипини.

CDP870 плазмена концентрация и анти-CDP870 нива

Съгласно очакването, за всички нива на дозиране на CDP870, пикът на плазмена концентрация се появява в края на инфузцията, и е с доза пропорционална на бавното спадане на плазмената концентрация след това. Профилът на плазмената концентрация на CDP870 изглежда много подобен на този, наблюдаван предварително при доброволци, където полуживотът се изчислява, че е приблизително 14 дена. При повторно дозиране, се наблюдава

подобен профил за единична доза на инфузия.

След единична интравенозна инфузия, нивата на анти-CDP870 са ниски, или неоткриваеми.

Обсъждане

Неутрализирането на TNF α е ефективна стратегия за лечение на RA. Понастоящем, това изисква използването на биологични средства, такива като mAb, или разтворим рецептор/човешки Fc слят протеин, които са скъпи в търговската мрежа. Терапевтичното средство за неутрализиране на TNF α се нуждае от свързване към TNF α с висок афинитет, и има дълъг плазмен полуживот, ниска антигенност, и висока поносимост и безопасност. То също така се нуждае от това да бъде приемливо за всички пациенти с RA, които биха се подобрили от блокиране на TNF α . Една технология, която би могла да постигне тези цели е конюгирането с полиетилен гликол на TNF α свързващ фрагмент от антитяло в E. coli. В това предварително изследване, ние установяваме, че CDP870, PEG-илиран, анти-TNF α , модифициран Fab, е ефективен, и добре поносим от пациенти с RA.

Изследванията in vitro показват, че CDP870 има подобна TNF α неутрализираща активност към мише анти-TNF α родителско антитяло. Това изследване потвърждава, че CDP870 намалява възпалението, и подобрява симптомите на RA. Клинично подобрене, както се измерва чрез критерий за ACR20 отговор в групите с 5 и с 20 mg/kg (75 %, 75 %) е сравнимо с етанерцепт (etanercept) (60 %) (Moreland et al., Anal. Int. Med., 130, 478-486, 1999) и инфликсимаб (infliximab) (50 %) (Maini et al., Lancet, 354, 1932-1939, 1999). При средните и при най-високите изследвани нива на дозиране, терапевтичният ефект достига до 8 седмици, което е сравнимо с предшестващите други mAbs (Elliott et al., Lancet, 344, 1105-1110, 1994 и Rankin et al., Br. J. Rheumatol., 34, 334-342, 1995). Предшестващо изследване показва, че терапевтичният ефект на анти-TNF α антитяло е свързан с неговия плазмен полуживот и генерирането на циркулиращи антитела (Maini et al., Arthritis Rheum. 38, (Supplement): S 186 1995 (Abstract)). Нашето изследване показва, че CDP870 има плазмен полуживот 14 дена, който е еквивалентен на този на цяло антитяло (Rankin

et al., (supra)) и много по-дълъг от полуживота на неконюгирани фрагменти Fab'. Освен това, CDP870 генерира само много ниски нива на отговор на анти тяло.

Една от важните цели на това изследване е да се изпита поносимостта и безопасността при прилагането на тези PEG-илирани Fab'. В нашето изследване, CDP870 се показва добре поносимо. Въпреки това, необходимо е допълнително изследване, за да се оцени дългосрочна токсичност, по-специално риска от демиелиниращо заболяване, инфекция и кожни обриви, за които е докладвано при етанерцепт и инфликсимаб.

Като обобщение, CDP870 е терапевтично ефективно при RA, и е добре поносимо при това краткотрайно изследване.

Трябва да се разбира, че гореописаните примери са само примерни образци, и не ограничават обхвата на настоящото изобретение, както се дефинира в следващите претенции.

Патентни претенции

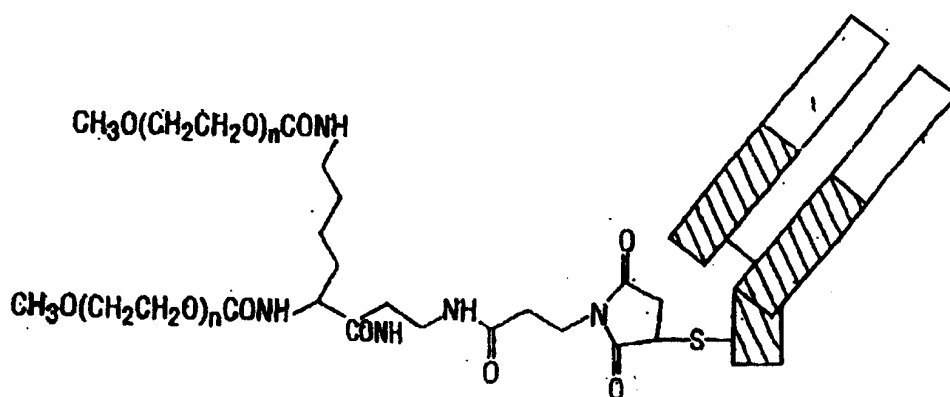
1. Молекула на анти тяло, имаща специфичност за човешки TNF α , съдържаща лека верига и тежка верига, в която леката верига съдържа променлива област hTNF40-gL1V, посочена като SEQ ID NO: 8, и тежката верига съдържа променлива област ghTNF40.4, посочена като SEQ ID NO: 11.

2. Молекула на анти тяло, имаща специфичност за човешки TNF α , съдържаща лека верига, имаща последователността, дадена в SEQ ID NO: 113, и тежка верига, имаща последователността, дадена в SEQ ID NO: 115.

3. Съединение, съдържащо молекулата на анти тяло, имаща специфичност за човешки TNF α , съдържаща лека верига, имаща последователността, дадена в SEQ ID NO: 113, и тежка верига, имаща последователността, дадена в SEQ ID NO: 115, имащо прикрепена към един от цистеиновите остатъци на C-терминалния край на тежката верига лизил-малеимидна извлечена група, където всяка аминокиселинна група на лизиловия остатък има ковалентно свързан към нея метоксиполи-(етиленгликол)-ов остатък, имащ молекулно тегло приблизително 20,000 Da, такова че общото средно молекулно тегло на метоксиполи-(етиленгликол)-ов остатък е около 40,000 Da.

4. Съединение съгласно претенция 3, където лизил-малеимидна извлечената група е [1-[[[2-[[3-(2,5-диоксо-1-пиридинил)-1-оксипропил]амино]етил]амино]-карбонил]-1,5-пентанедил]бис(иминокарбонил).

5. Съединение, съдържащо молекулата на анти тяло съгласно претенция 2 с формула:



където n е около 420.

6. ДНК последователност, която кодира тежката и/или леката верига на молекулата на анти тяло съгласно която и да е претенция от 1 до 3.

7. Клониращ или експресиращ вектор, съдържащ ДНК последователността съгласно претенция 6.

8. Клетка гостоприемник, трансформирана с вектора съгласно претенция 7.

9. Метод за получаването на молекулата на анти тяло съгласно която и да е претенция от 1 до 3, характеризира се с това, че се състои в култивиране на клетката гостоприемник съгласно претенция 8 и изолиране на молекулата на анти тялото.

10. Терапевтичен или диагностичен състав, характеризира се с това, че съдържа молекулата на анти тяло съгласно която и да е

претенция 1 или 2, или съединението съгласно която и да е претенция от 3 до 5, заедно с фармацевтично приемлив носител.

11. Молекула на антитяло съгласно претенция 1 или 2, или съединение съгласно която и да е претенция от 3 до 5, за използване при лечение.

12. Използване на молекулата на антитяло съгласно претенция 1 или 2, или на съединение съгласно която и да е претенция от 3 до 5, в производството на лекарство за лечение на ревматоиден артрит, остеоартрит, болест на Crohn или псориазис.

Приложение: 24 фигури

FIG. 1 Comparisons of framework regions of light chain of antibody hTNF40 and human group 1 consensus sequences

Hu group 1 consensus : DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (SEQ ID NO: 83)

hTNF40 : DIVMTQSOKFMSTSVGDRSVTC (SEQ ID NO: 84)

Hu Group 1 consensus : WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 85)

hTNF40 : WYQQKPGQSPKALIIY (SEQ ID NO: 86)

Hu Group 1 consensus : GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 87)

hTNF40 : GVPYRFTGSGSGTDFTLTISTVSEDLAEYFC (SEQ ID NO: 88)

Hu Group 1 consensus : FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 89)

hTNF40 : FGAGTKLELKR (SEQ ID NO: 90)

FIG. 3 Sequence of CDRs of hTNF40

H1 DYGMN (SEQ ID NO:1)

H2 WINTYIGEPIYVDDFKG (SEQ ID NO:7)

H2' WINTYIGEPIYADSVKG (SEQ ID NO:2)

H3 GYRSYAMDY (SEQ ID NO:3)

L1 KASQNVGTNVA (SEQ ID NO:4)

L2 SASFLYS (SEQ ID NO:5)

L3 QQYNIYPLT (SEQ ID NO:6)

FIG. 2

Comparisons of framework regions of heavy chain of antibody hTNF40 and human group 1 and group 3 consensus sequences

Hu Group 1 consensus	: QVQLVQSGAEVKKPKQASVKVSKKASGYTFT	(SEQ ID NO: 91)
hTNF40	: QIQI <u>VQSGPEL</u> KKP <u>GETV</u> KI <u>SKKASGYVFT</u>	(SEQ ID NO: 92)
Hu Group 1 consensus	: WVRQAPGGGLVWNG	(SEQ ID NO: 93)
hTNF40	: WVKQAPGK <u>AEK</u> WNG	(SEQ ID NO: 94)
Hu Group 1 consensus	: RVTITIKDTSTSTAYNELSSLRGGDTAVYYCAR	(SEQ ID NO: 95)
hTNF40	: <u>RFAESLETSASTA</u> FLQIN <u>NLKN</u> EDTATYFCAR	(SEQ ID NO: 96)
Hu Group 1 consensus	: WGQGTIVTVSS	(SEQ ID NO: 97)
hTNF40	: WGQGT <u>EL</u> TVSS	(SEQ ID NO: 98)
Hu Group 3 consensus	: FVQIVNESGGGLVQGGSLRLSCAASGFTFS	(SEQ ID NO: 106)
hTNF40	: QIQI <u>VQSGPEL</u> KKP <u>GETV</u> KI <u>SKKASGYVFT</u>	(SEQ ID NO: 92)
Hu Group 3 consensus	: WVRQAPGKGLDWVS	(SEQ ID NO: 107)
hTNF40	: WVKQAPGK <u>AEK</u> WNG	(SEQ ID NO: 94)
Hu Group 3 consensus	: RFTITSDNSKIFTIYLQINSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO: 108)
hTNF40	: <u>RFAESLETSASTA</u> FLQIN <u>NLKN</u> EDTATYFCAR	(SEQ ID NO: 96)
Hu Group 3 consensus	: WGQGTIVTVSS	(SEQ ID NO: 109)
hTNF40	: WGQGT <u>EL</u> TVSS	(SEQ ID NO: 98)

FIG. 4

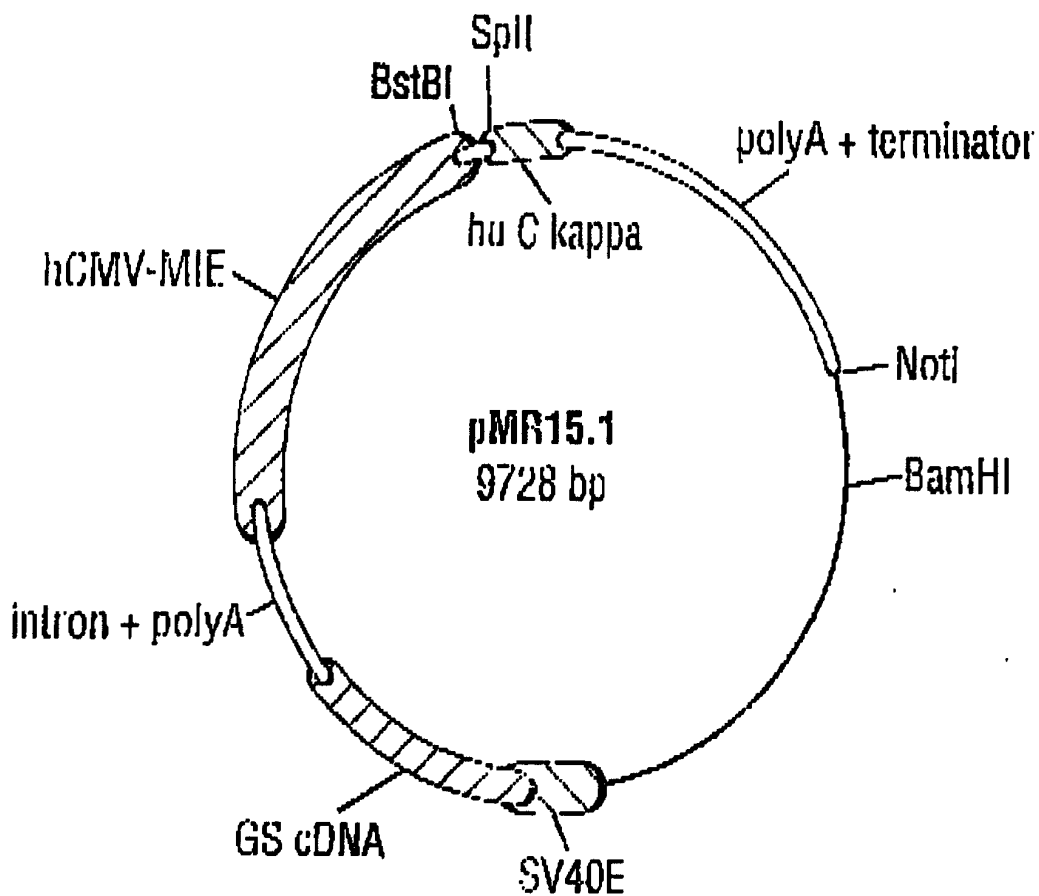


FIG. 5

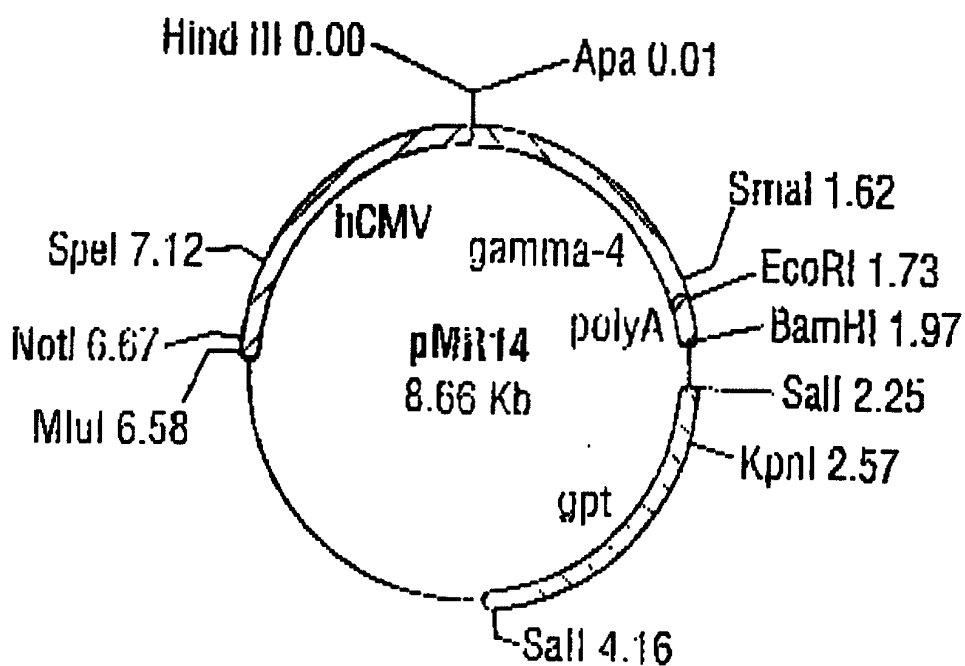


FIG. 6 Murine VI Sequence of hTNF40 (SEQ ID NO: 99)

```

10  GAC ATT GTG ATG ACC CAG TCT CAA AAA TTC ATG TCC ACA TCA GTA GGA GAC AGG
    CTG TAA CAC TAC TGG GTC AGA GTT TTT AAG TAC AGG TGT AGT CAT CCT CTG TCC
    E   V   M   L   Q   S   Q   K   F   Y   S   T   S   V   G   D   R>
    50

60  GTC AGC GTC ACC TGC AAG GCC AGT CAG AAT GTG GGT ACT AAT GTA GCC TGG TAT
    CAG TCG CAG TGG ACG TTC CGG TCA GTC TTA CAC CCA TGA TTA CAT CGG ACC ATA
    V   S   V   T   C   K   A   S   Q   N   V   G   L   N   V   A   W   Y>
    100

110 CAA CAG AAA CCA GGA CAA TCT CCT CCA GCA CTG ATT TAC TCG GCA TCC TTC CTA
    GTT GTC TTT GGT CCT CCA GGA TTT CCA TAA ATG AGC CGT AGG AAG GAT
    Q   Q   K   F   G   Q   E   P   K   A   L   I   Y   S   A   S   F   L>
    150

170 TAT AGT GGA GTC CCT TAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT
    ATA TCA CCT CAG GGA ATA GCG AAG TGT CCG TCA CCT AGA CCC TGT CTA AAG TGA
    Y   S   G   V   P   Y   R   F   T   G   S   G   G   C   D   F   T>
    200

220 CTC ACC ATC AGC ACT GTG CAG TCT GAA GAC TTG GCA GAG TAT TTC TGT CAG CAA
    CAG TGG TAG TCG TGA CAC GTC AGA CTT CTG AAC CGT CTC ATA AAG ACA GTC GTT
    L   T   I   S   T   V   Q   S   E   D   L   A   E   Y   F   C   Q   Q>
    250

280 TAT AAC ATC TAT CCT CTC ACG TTC GGT CCT GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA CGT
    ATA TTG TAG ATA GGA GAG TGC AAG CCA CGA CCC TGG TTC GAC CTC GAC TTT GCA
    Y   N   I   Y   P   L   T   F   G   A   G   T   K   L   E   L   K   R>
    300
  
```


FIG. 7 Murine Vh Sequence of hTNF40 (SEQ ID NO: 100)

```

10      20      30      40      50
CAG ATC CAG TTG GTG CAG TCT GGA CCT GAG AAG AAG CCT GGA GAG ACA GTC
GTC TAG GTC AAC CAC CAC GTC AGA CCT GGA CTC GAC TTC TTC GGA CCT CTC TGT CAG
Q   I   Q   L   V   Q   S   G   P   E   L   K   K   P   G   E   T   V>

60      70      80      90      100
AAG ATC TCC TCC AAG GCT TCT GGA TAT GTT TTC ACA GAC TAT GGA ATG AAT TGG
TTC TAG AGG ACG TTC CGA AGA CCT ATA CAA AAG TGT CTG ATA CCT TAC TTA ACC
K   I   S   C   K   A   S   G   Y   V   F   T   D   Y   G   M   N   W>

110     120     130     140     150     160
GTG AAG CAG GCT CCA GGA AAG GCT TTC AAG TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACC TAC
CAC TTC GTC CGA GGT CCT TTC CGA AAG TTC ACC TAC CCG ACC TAT TTG TGG ATG
V   K   Q   A   P   G   K   A   F   K   W   M   G   W   I   N   T   Y>

170     180     190     200     210
ATT GGA GAG CCA ATA TAT GTT GAT GAC TTC AAG GGA CGA TTT GCC TTC TCT TTG
TAA CCT CTC GGT TAT ATA CAA CTA CTG AAG TTC CCI GCT AAA CCG AAG AGA AAC
I   G   E   P   I   Y   V   D   F   K   G   R   F   A   F   S   L>

220     230     240     250     260     270
GAA ACC TCT GCC AGC ACT GCC TTT TTG CAG ATC AAC AAC CTC AAA AAT GAG GAC
CTT TGG AGA CGG TCG TGA CGG AAA AAC AAC GTC TAG TTG TTG GAG TTT TTA CTC CTG
E   T   S   A   S   T   A   F   L   Q   I   N   N   L   K   N   E   D>

280     290     300     310     320
ACG GCT ACA TAT TTC TGT GCA AGA GGT TAC CCG TCC TAT GCT ATG GAC TAC TGG
TGC CGA TGT ATA AAG ACA CAG TCT CCA ATG GCC AGG ATA CGA TAC CTG ATG ACC
T   A   T   Y   F   C   A   R   G   Y   R   S   Y   A   M   D   Y   W>

330     340     350
GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCT TCA
CCA GTT CCT TGG AGT CAG TGG CAG AGA AGT
G   Q   G   T   S   V   T   V   S   S>

```

FIG. 8 Grafted V: Sequence of hTNF40 (SEQ ID NO: 8)

```

10   20   30   40   50
GAC ATT CAA ATG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT GTA GGA GAC CGG
CTG TAA GTT TAC TGG GTC TCG TCG AGG TCG GAC TCG CGT AGA CAT CCT CTG GCC
D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R>

70   80   90   100
GTC ACC ATC ACT TGT AAA GCC AGC AGT CAG AAC GTA GGT ACT AAC GTA GCC TGG TAT
CAG TGG TAG TGA ACA TTT CCG TCA GTC TTC CAT CCA TGA TGG CAT CCG ACC ATA
V   T   I   T   C   K   A   S   Q   N   V   G   T   N   V   A   W   Y>

110  120  130  140  150  160
CAG CAA AAA CCA GGT AAA GCC CCA AAA GCC CTC ATC TAC AGT GCC TCT TTC CTC
GTC GTC TTT GGT CCA TTT CCG GGT TTT CCG GAG TAG ATG TCA CCG AGA AAG GAG
Q   Q   K   F   G   K   A   P   K   A   L   I   Y   S   A   S   P   L>

170  180  190  200  210
TAT AGT GGT GTA CCA CCA TAC AGG TTC AGC GGA TCC GGT AGT GGT ACT GAT TTC ACC
ATA TCA CCA CAT GGT ATG TCC AAG TCG CCT AGG CCA TCA CCA TGA CTA AAG TGG
Y   S   G   V   P   Y   R   F   S   G   S   G   T   D   F   T>

220  230  240  250  260  270
CTC ACG ATC AGT AGC CTC CAG CCA GAA GAT TTC GCC ACT TAT TAC TGT CAA CAG
GAG TGC TAG TCA TCG GAG GTC GGT CTT CTA AAG CCG TGA ATA ATG ACA GTT GTC
L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T   Y   Y   C   Q   Q>

280  290  300  310  320
TAT AAC ATC TAC CCA CTC ACA TTC GGT CAG GGT ACT AAA GTA GAA ATC AAA
ATA TTG TAG ATG GGT GAG TGT AAG CCA GTC CCA TGA TTT CAT CTT TAG TTT
Y   N   I   Y   P   L   I   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K>

```

FIG. 9 Grafted VI sequence of hTNF40 (SEQ ID NO: 9)

```

10      20      30      40      50
GAC ATT CAA ATG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT GTA GGA GAC CCG
CTG TAA GTT TAC TGG GTC TCG GGT AGG TCG GAC TCG CGT AGA CAT CCT CTG GCC
D   I   Q   M   T   Q   S   F   S   L   S   A   S   V   G   D   R>

60      70      80      90      100
GTC ACC ATC ACT TGT AAA GCC AGT CAG AAC GGT ACC AAC GTA GCC TGG TAT
CAG TGG TAG TGA ACA TTT CCG TCA GTC TTG CAT CCA TGA TTG CAT CGG ACC ATA
V   T   I   T   C   K   A   S   Q   N   V   G   T   N   V   A   W   Y>

110     120     130     140     150     160
CAG CAA AAA CCA GGT AAA GCC CCA AAA CTC ATC ATC TAC AGT GCC TCT TTC CTC
GTC GTT TTT GGT CCA TTT CCG GGT TTT SAG GAG TAG ATG TCA CSS AGA AAG GAG
Q   Q   K   E   G   K   A   P   K   L   L   I   Y   S   A   S   F   L>

170     180     190     200     210
TAT AGT GGT GTA CCA TAC AGG TTC AGC GGA TCC GGT AGT GGT ACT GAT TTC ACC
ATA TCA CCA CAT GGT ATG TCC AAG TCG COT AGG CCA TCA CCA TGA CTA AAG TGG
Y   S   G   V   P   Y   R   F   S   E   G   S   G   T   D   F   T>

220     230     240     250     260     270
CTC ACG ATC AGT AGC CTC CAG CCA GAA GAT TTC GCC ACT TAT TAC TGT CAA CAG
SAG TGC TAG TCA TCG GAG GTC GGT CTT CTA AAG CCG TGA ATA ATG ACA GTT GTC
L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T   Y   Y   C   Q   Q>

280     290     300     310     320
TAT AAC ATC TAC CCA CTC ACA TTC GGT CAG GGT ACT AAA GTA GAA ATC AAA
ATA TTG TAG ATG GGT GAG TGT ARG CCA GTC CCA TGA TTT CAT CTT TAG TTT
Y   N   I   Y   P   L   T   F   G   Q   G   T   K   Y   V   E   I   K>

```

FIG. 10 Grafted Vh sequence of hTNF40 (SEQ ID NO: 10)

```

10      20      30      40      50
CAG GTG CAG CTC CAG TCA GGA CCA GAG GTT AAG AAG CCG CCG GCT TCC GTC
GTC CAG CTC GAC CAG GTC AGT CCG CCG CTC CAA TTC TTC GGA CCA CGA AGG CAG
Q   V   Q   L   V   Q   S   G   A   E   V   K   K   P   G   A   S   Y>

60      70      80      90      100
AAA GTT TCG TGT AAG GCC TCA GGC TAC GTG TTC ACA GAC TAT GGT ATG AAT TGS
TPT CAA AGC ACA TTC CCG AGT CCG ATG CAC AAG TGT CTG ATA CCA TAC TTA ACC
K   V   S   C   K   A   S   G   Y   V   F   T   D   Y   G   M   N   W>

110     120     130     140     150     160
GTC AGA CAG GCC CCG GGA CAA GGC CTG GAA YGG ATG GGT TGG ATT AAT ACT TAC
CAG TCT GTC CCG GGC CCG CCG GAC CTT ACC TAC CCA ACC TAA TTA TGA ATG
V   R   Q   A   F   G   G   Q   G   L   F   W   K   S   W   I   N   T   Y>

170     180     190     200     210
ATT GGA GAG CCG ATT TAT GCT CAA AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACG TTC ACT CTA
TAA CCG CTC GGA TAA ATA GAA GTT TTC AAG GTC CCG TCT CAG TSC AAG TGA GAT
I   G   E   E   F   I   Y   A   Q   K   F   Q   S   R   V   T   F   T   L>

220     230     240     250     260     270
GAC ACC TCC ACA AGC ACT GCA TAC ATG GAG CTG TCA TCT CTG AGA TCC GAG BAC
CTG TGG AAG TGT TGG TGA CGT ATG TAC CTC GAC AGT AGA GAC TCT AGG CTC CTG
D   T   S   T   S   T   A   Y   M   E   L   S   L   R   E   E   D>

280     290     300     310     320
ACC GCA GTG TAC TAT TGT GCT AGA GGA TAC AGA TCT TAT GCC ATG GAC TAC TGG
TGG CGT CAC ATG ATA ACA CGA TCT CCG ATG TCI AGA ATA CCG TAC CTG ATG ACC
T   A   V   Y   Y   C   A   R   G   Y   R   S   Y   A   M   D   Y   W>

330     340     350
GAC CAG GGT ACC CTA GTC ACA GTC TCC TCA
CCG CTC CCA TGG GAT CAG TGT CAG AGG AGT
G   C   G   T   L   V   T   V   S   S>

```

FIG. 11 Grafted Vh Sequence of hTNF40.4 (SEQ ID NO: 11)

```

10      20      30      40      50
GAG GTT CAG CTG GTC GAG TCA GGA GGC GGT CTC GTG CAG CCT GGC GGA TCA CTG
CTC CAA GTC GAC CAG CTC AGT CCT CCG CCA GAG CAC GTC GGA CCG CCT AGT GAC
E V Q L V E S G S G L V Q P G G S L>

60      70      80      90      100
AGA TTG TCC TGT GCT GCA TCT GGT TAC GTC TTC ACA GAC TAT GGA ATG AAT TGG
TCT AAC AGG ACA CGA CGT AGA CCA CCA ATG CAG AAG TGT CTG ATA CCT TAC TTA ACC
R L S C A A S G G Y V F T D Y G M N W>

110     120     130     140     150     160
GTT AGA CAG GCC CCG GGA AAG GGC CTG GAA TGG ATG GGT TGG ATT AAT ACT TAC
CAA TCT GTC CCG GGC CCT TTC CCG GAC CTT ACC TAC CCA ACC TAA TTA TGA ATG
Y R Q A A F G G K G L E W M G W I N T Y>

170     180     190     200     210
ATT GGA GAG CCT ATT TAT GCT GAC AGC GTC AAG GGC ASA TTC ACG TTC TCT CTA
TAA CCT CTC GGA TAA ATA CGA CTG TCC CAG TTC CCG TCT AAG TSC AAG AGA GAT
I G E F I Y A D S V K G R F T F S L>

220     230     240     250     260     270
GAC ACA TCC AAG TCA ACA GCA IAC CTC CAA ATG RAT AGC CTG AGA GCA GAG GAC
CTG TGT AGG TTC AGT TGT CGT ATG GAG GTT TAC TTA TCG GAC TCT CGT CTC CTG
D T S K S T A Y L Q M N S L R A E D>

280     290     300     310     320
ACC GCA GTG TAC TAT TGT GCT AGA GGA TAC AGA TCT TAT GCC ATG GAC TAC TGG
TGG CGT CAC ATG ATA ACA CGA TCT CCT ATG TCT AGA ATA CCG TAC CTG ATG ACC
T A V Y Y C A R G Y R S Y A M D Y W>

330     340     350
GGC CAG GGT ACC CTA GTC ACA GTC TCC TCA
CCG GTC CCA TGG GAT CAG TGT CAG AGE AGT
G C G T L V T V S S>

```

FIG. 12

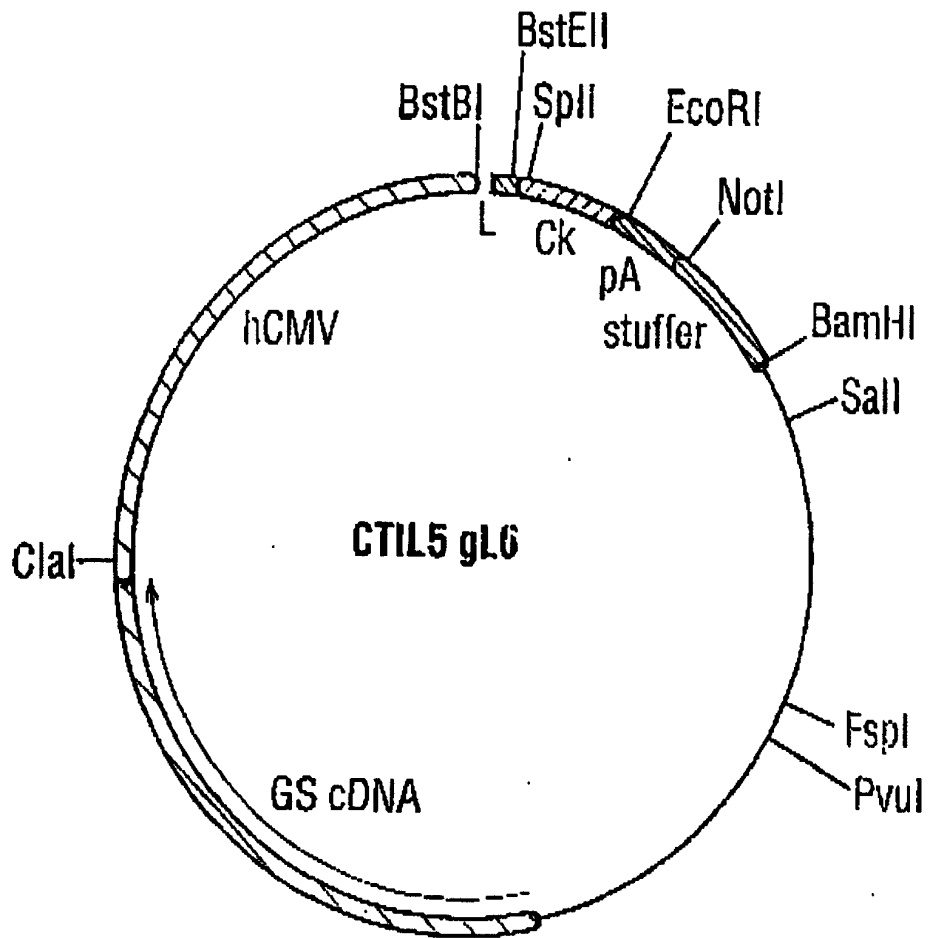
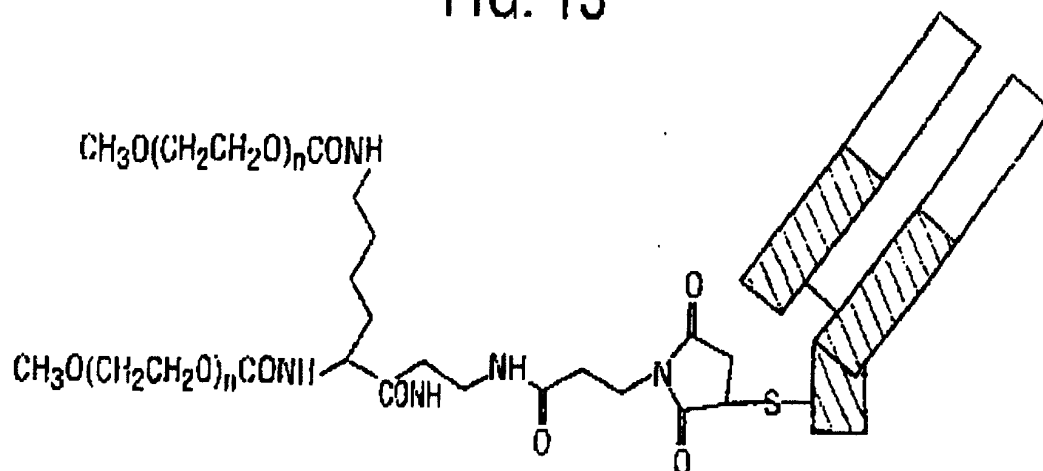


FIG. 13



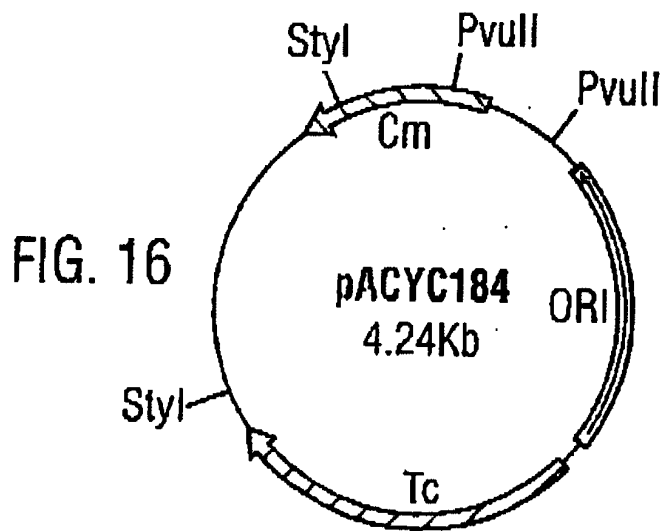
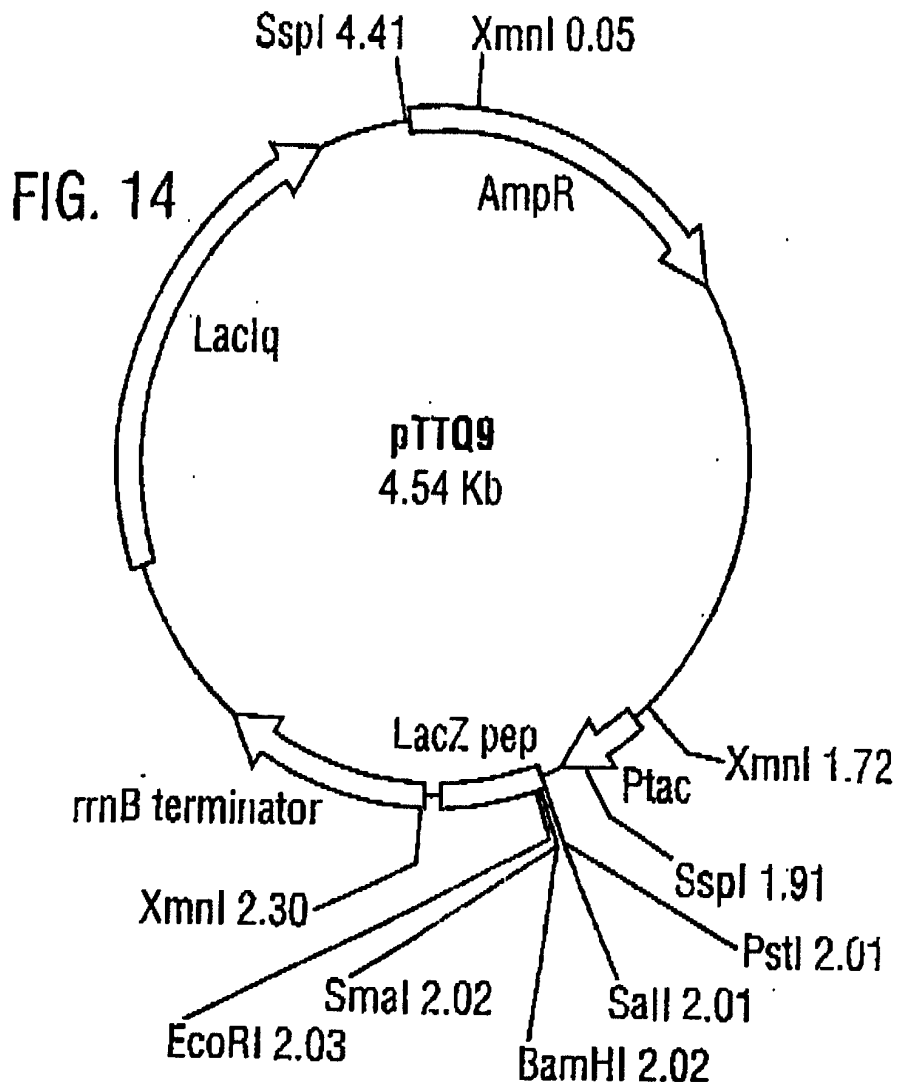
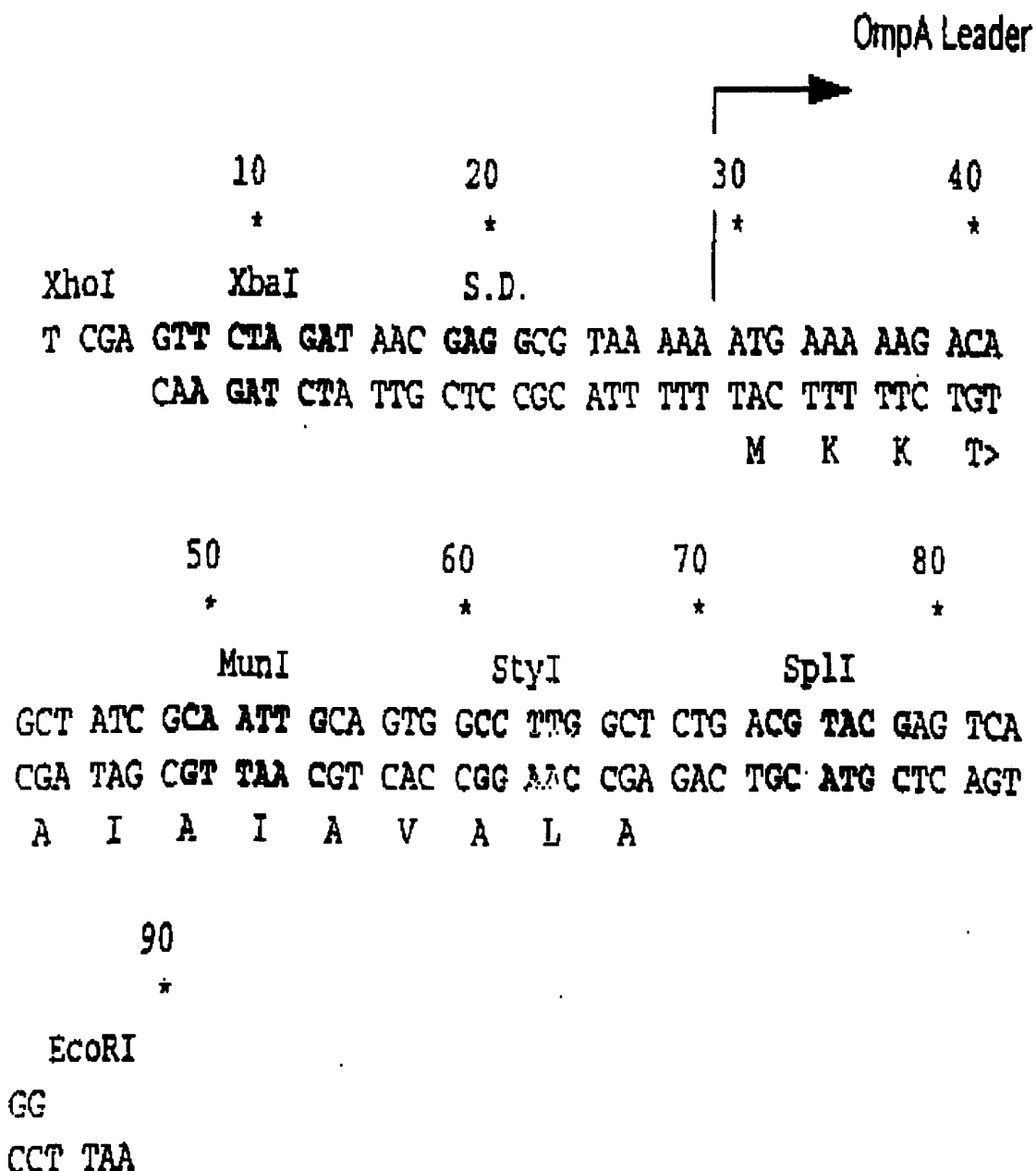
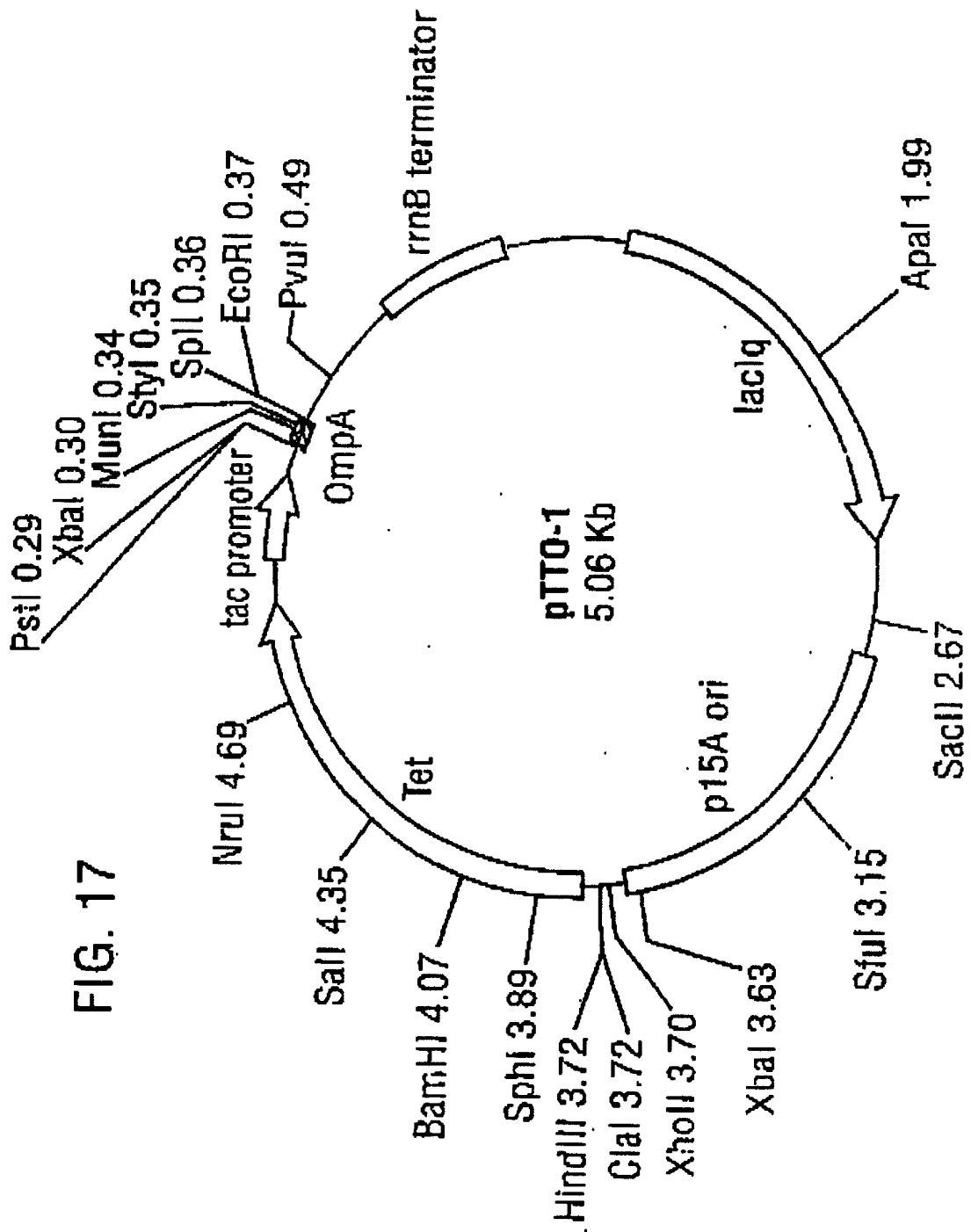


FIG. 15

Sequence of OmpA Oligonucleotide Adapter (SEQ ID NO: 101)



- Internal restriction sites are shown in bold
- The 5' XhoI cohesive end ligates into the Vector Sall site, blocking it
- S.D. represents the OmpA Shine Dalgarno sequence



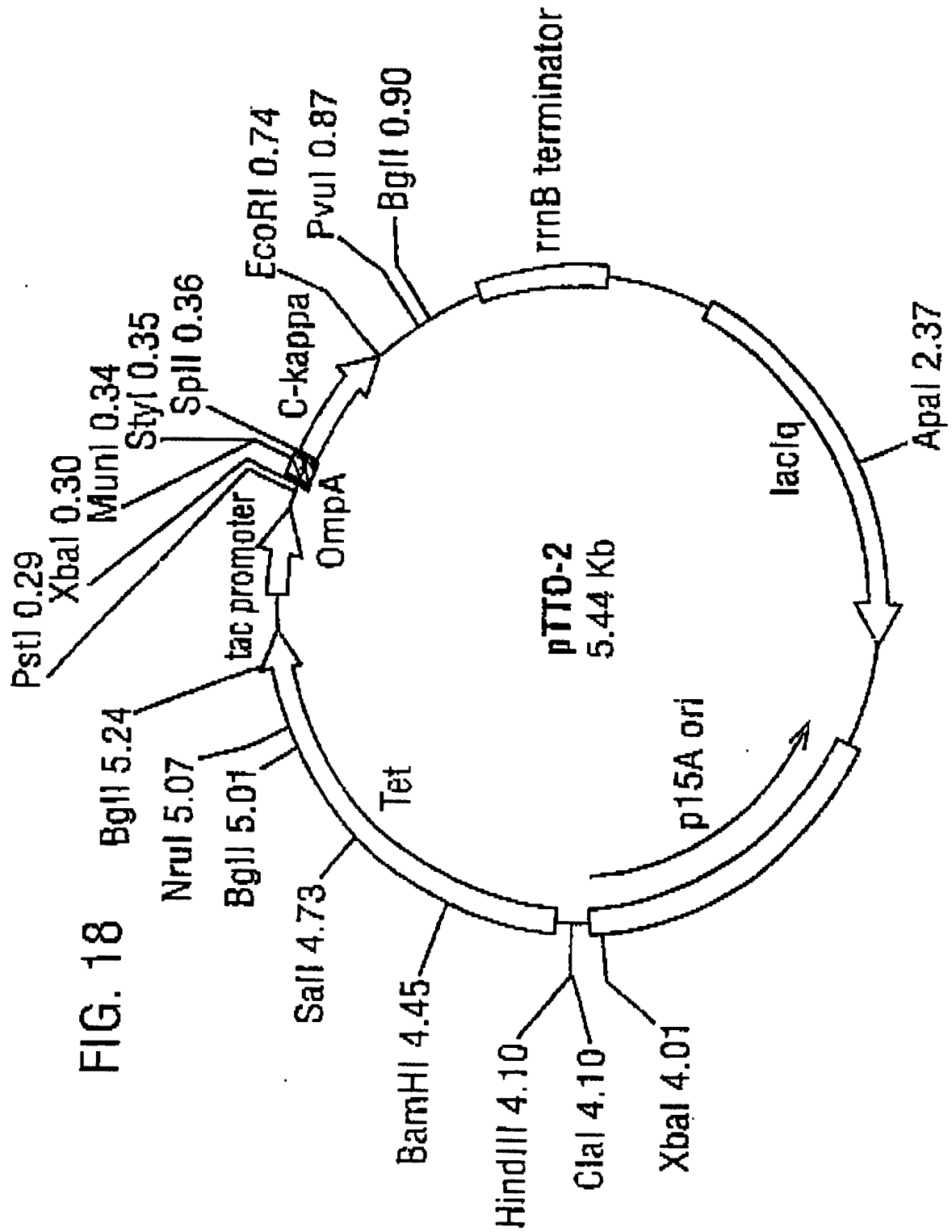


FIG. 18

FIG. 19

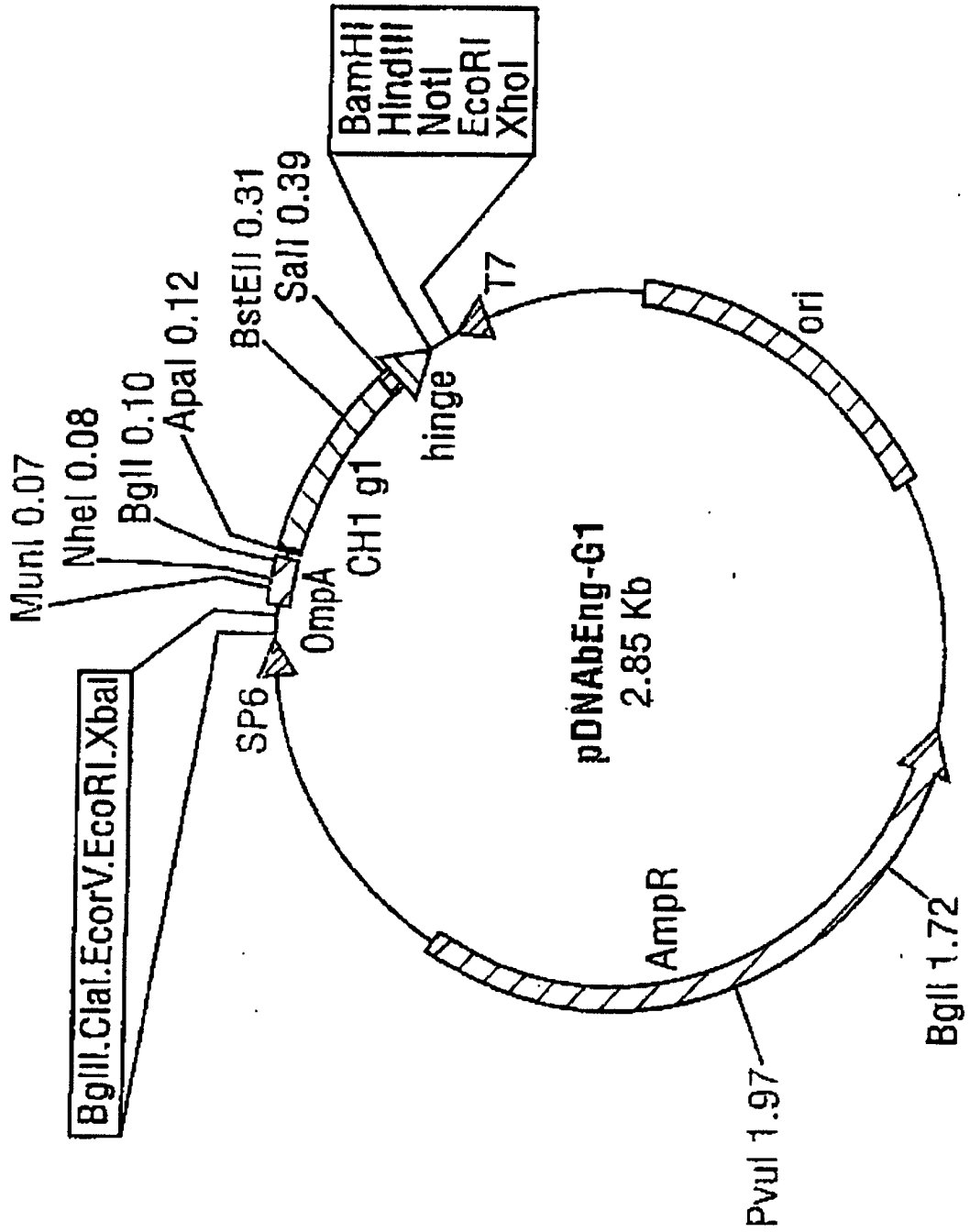


FIG. 20 OLIGONUCLEOTIDE CASSETTES ENCODING DIFFERENT INTERGENIC SEQUENCES FOR E. COLI PAB' EXPRESSION

IGS CASSETTE-2: Intergenic space = -1
 C, ACC, TCA, CCA, CTA, ACA, AAA, AGT, TTT, AAT, AAT, GGA, GGA, GCA, GCA, GCT, GCT, AAG, AAG, AAT, AAT, GCA, GCA, ATT, G (SEE FIG. 192)
 S S F V T K S F Y R C E C + K E X T A I A I
 End of alpha sequence -> Start of alpha sequence ->

IGS CASSETTE-2: Intergenic space = +1
 G, AAC, TCA, CCA, CTA, ACA, AAA, AGT, TTT, AAT, AAT, GGA, GGA, GCA, GCA, GCT, GCT, AAG, AAG, AAT, AAT, GCA, GCA, ATT, G (SEE FIG. 194)

S S F V T K S F Y R C E C + Y K K T A I A I

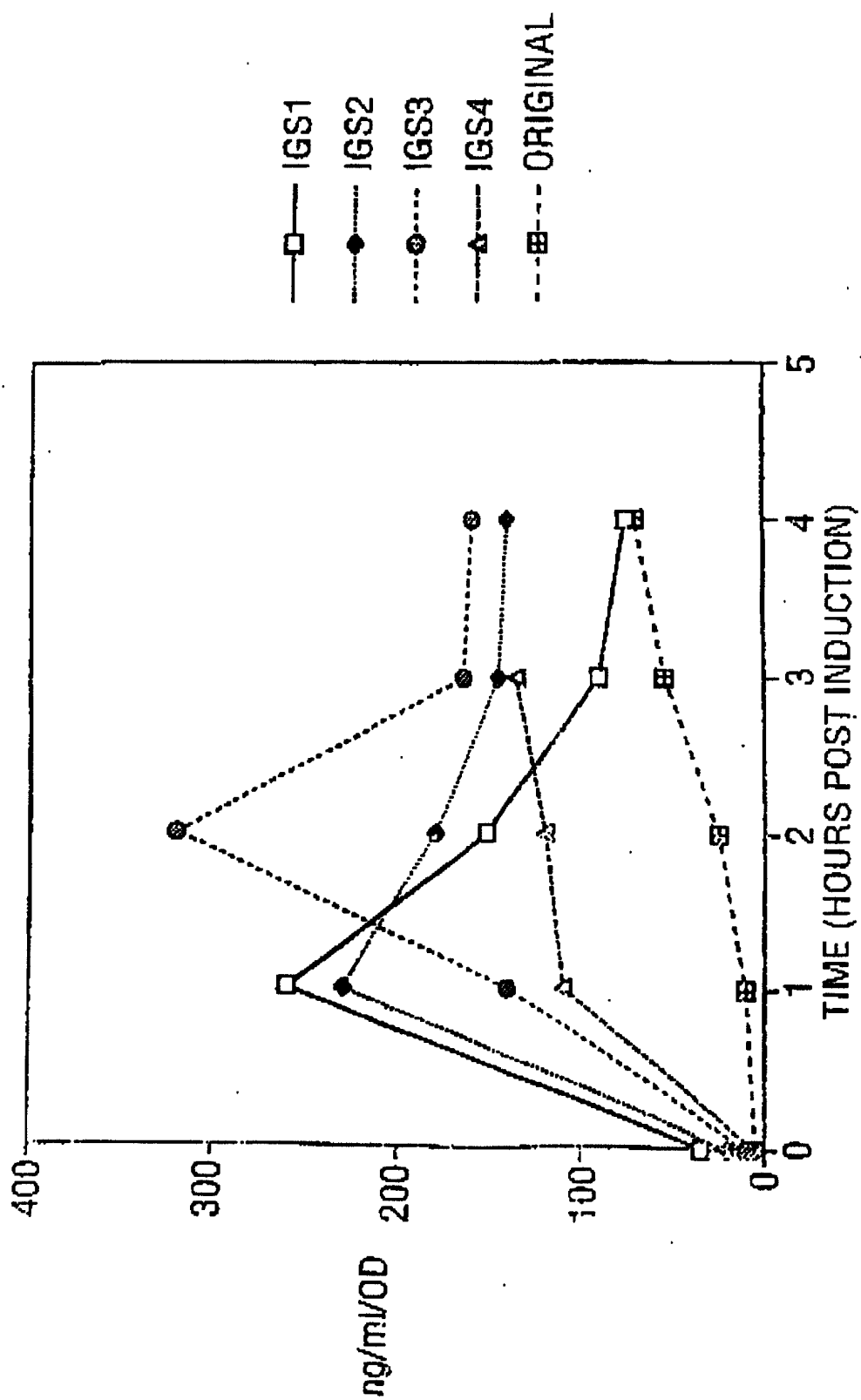
IGS CASSETTE-3: Intergenic space = +13
 S, ACC, TCA, CCA, CTA, ACA, AAA, AGT, TTT, AAT, AAT, GGA, GGA, GCA, GCA, GCT, GCT, AAG, AAG, AAT, AAT, GCA, GCA, ATT, G (SEE FIG. 194)

S S F V T K S F Y R C E C + K K K T A I A I

IGS CASSETTE-4: Intergenic space = +13
 G, ACC, TCA, CCA, CTA, ACA, AAA, AGT, TTT, AAT, AAT, GGA, GGA, GCA, GCA, GCT, GCT, AAG, AAG, AAT, AAT, GCA, GCA, ATT, G (SEE FIG. 195)

S S F V T K S F Y R C E C + W K K T A I A I

FIG. 21 Periplasmic Fab' accumulation - IGS variants



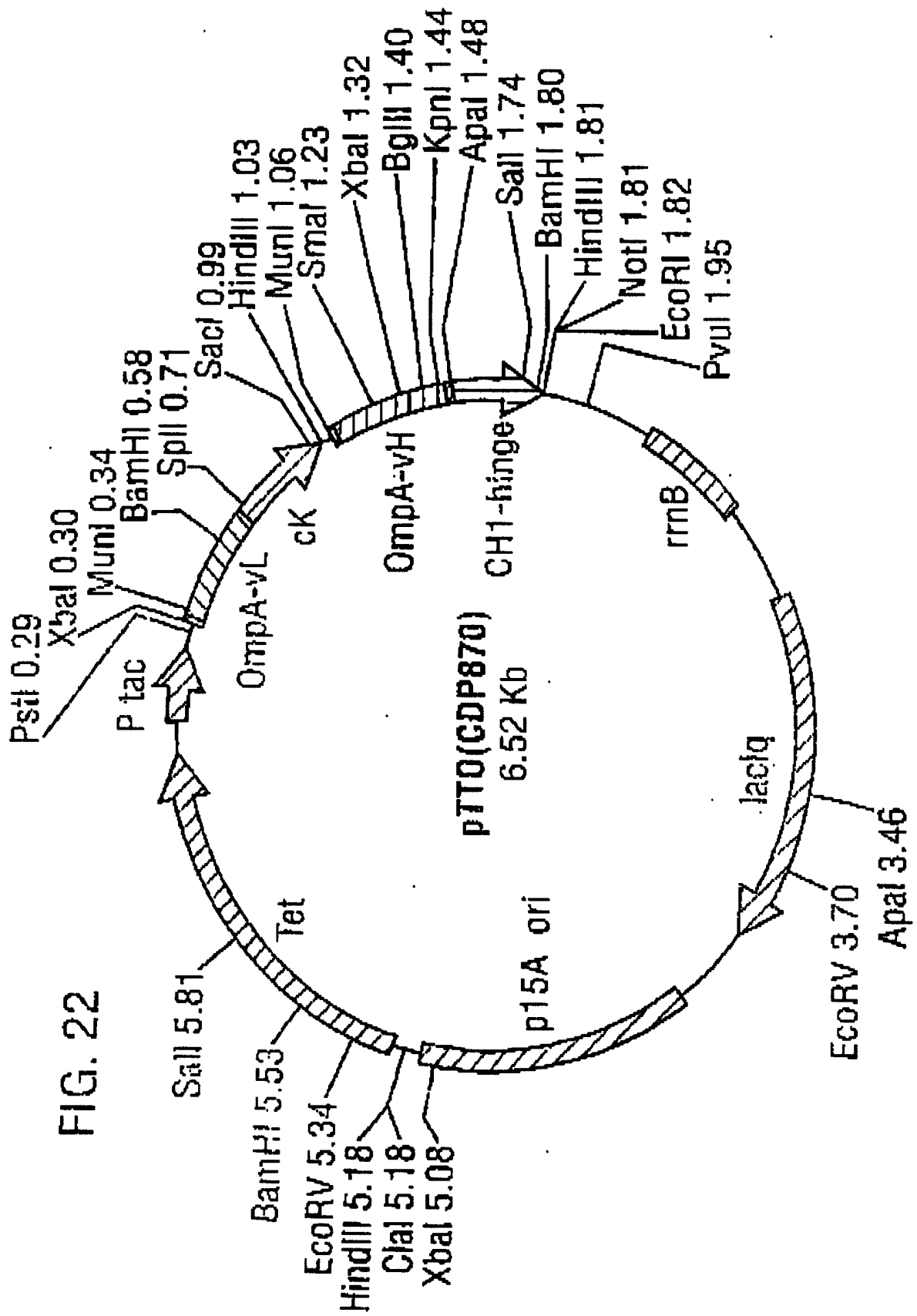


FIG. 22

FIG. 23

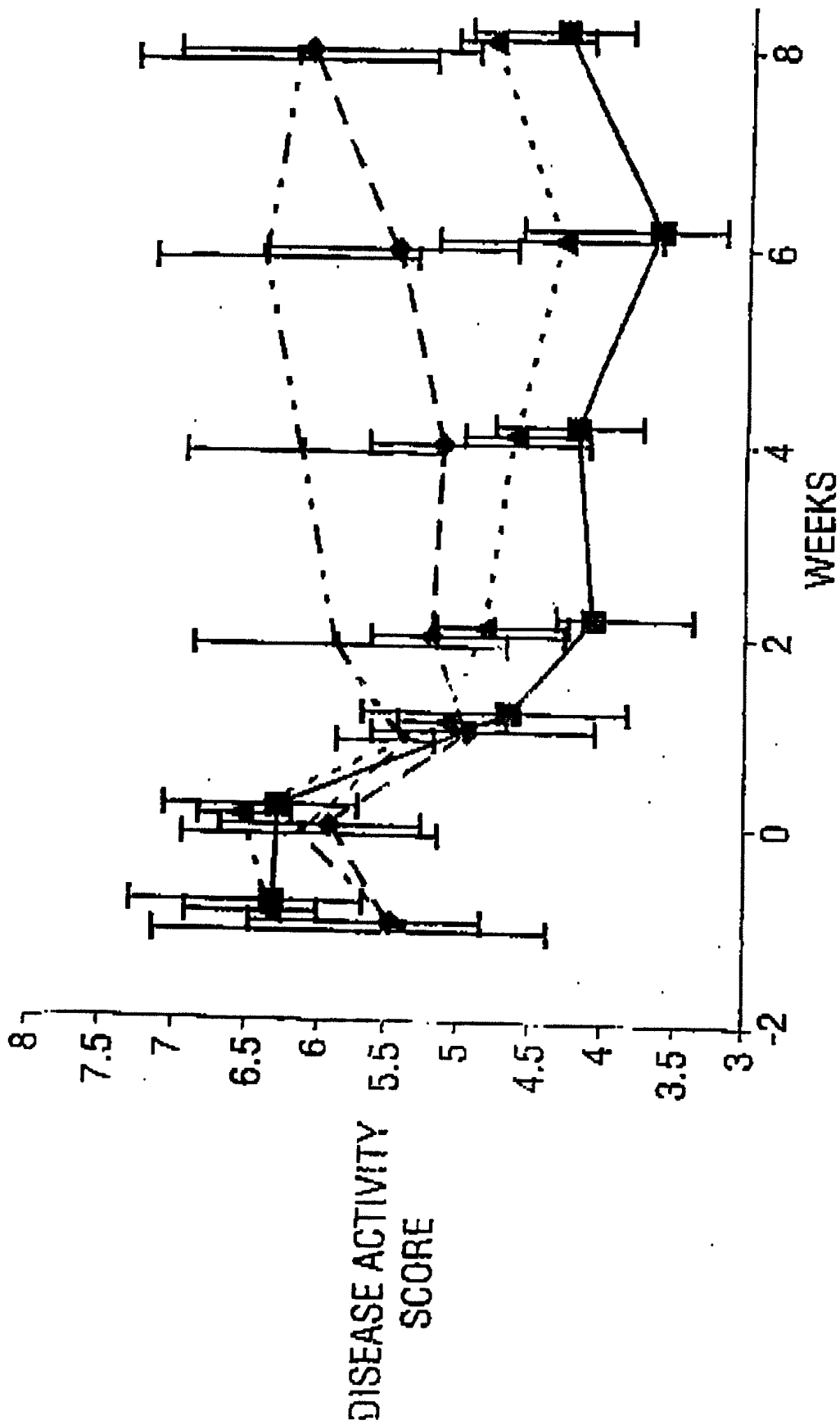


FIG. 24

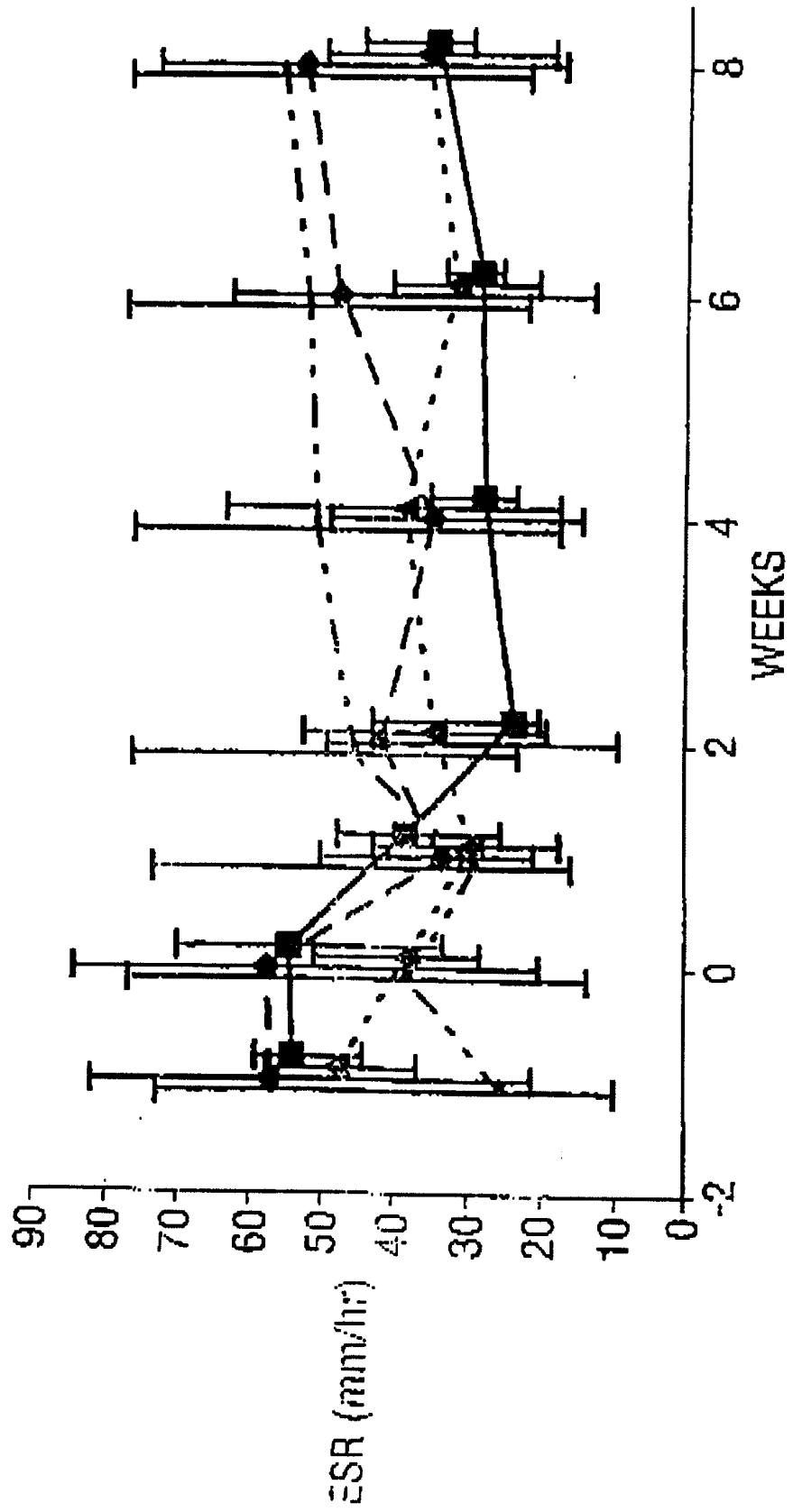


FIG. 24(contd.)

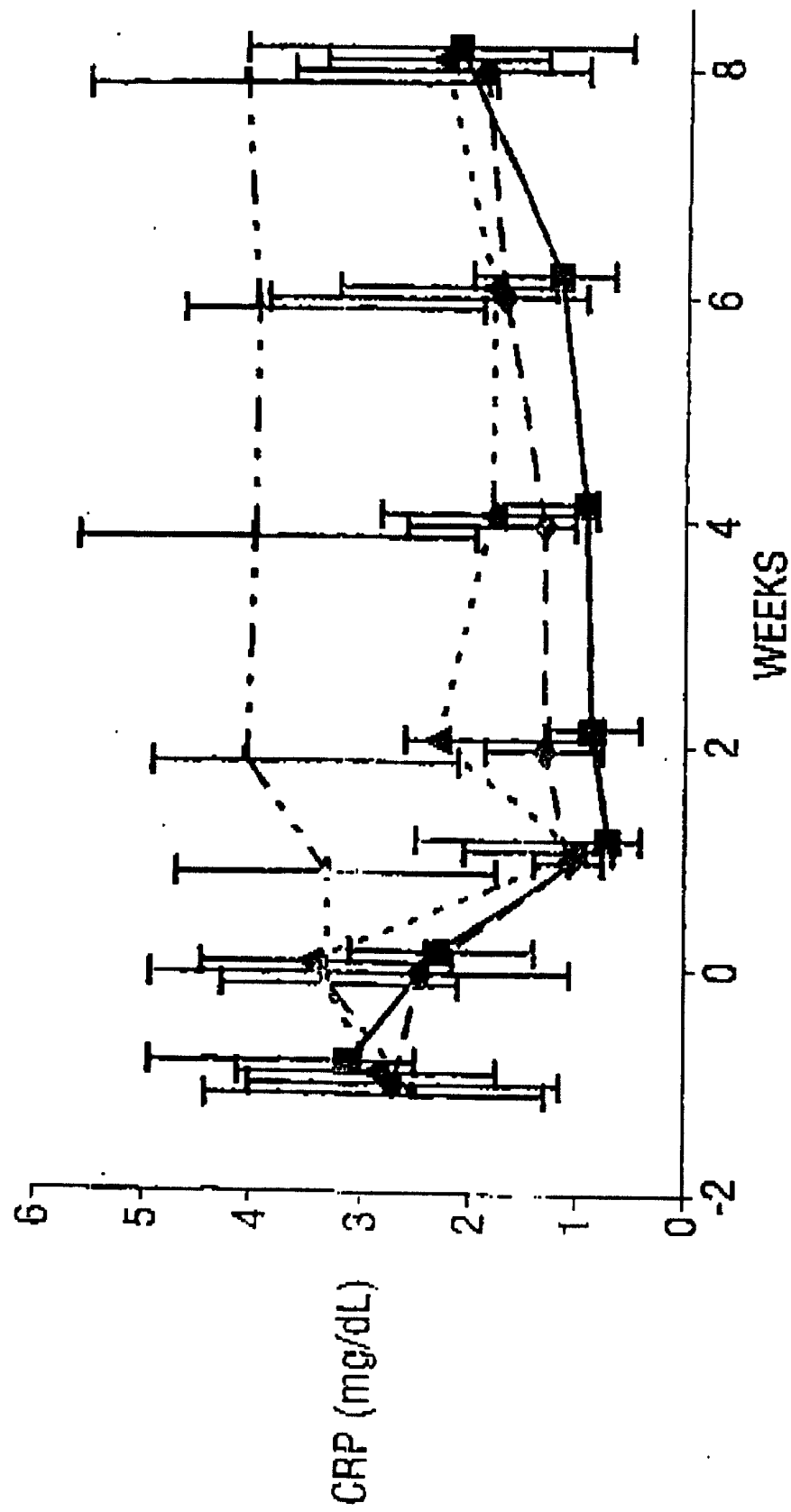


FIG. 24(contd.)

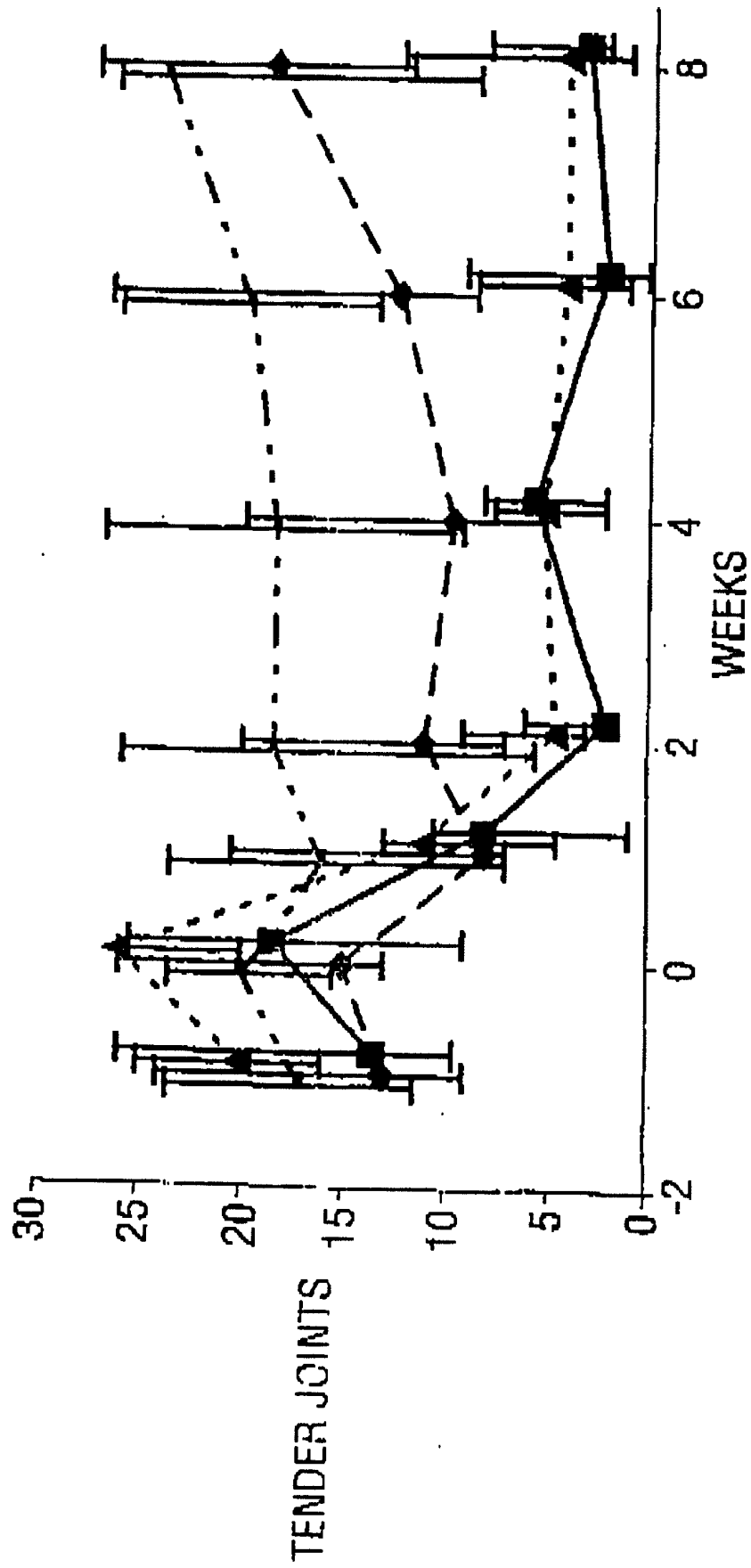


FIG. 24(contd.)

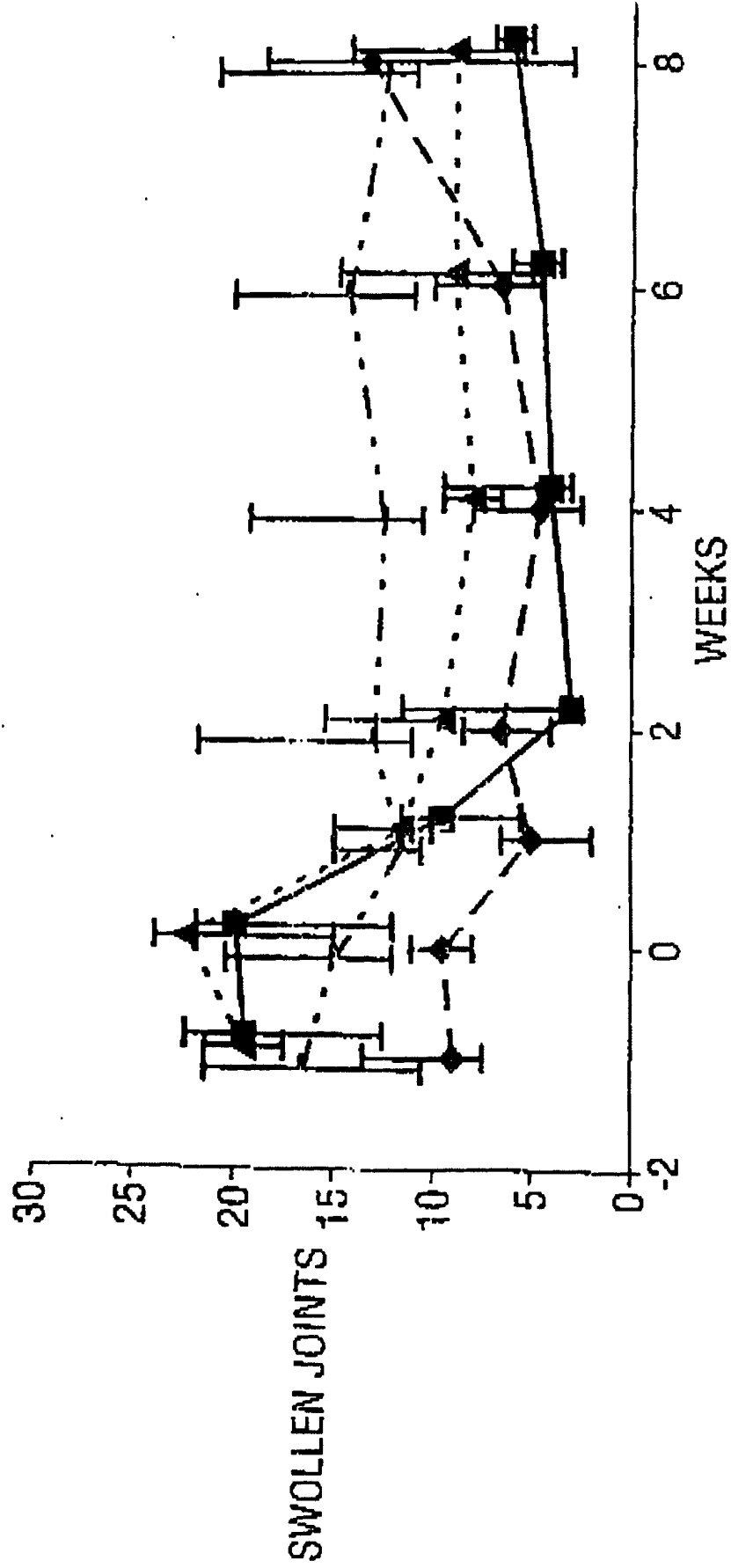


FIG. 24(contd.)

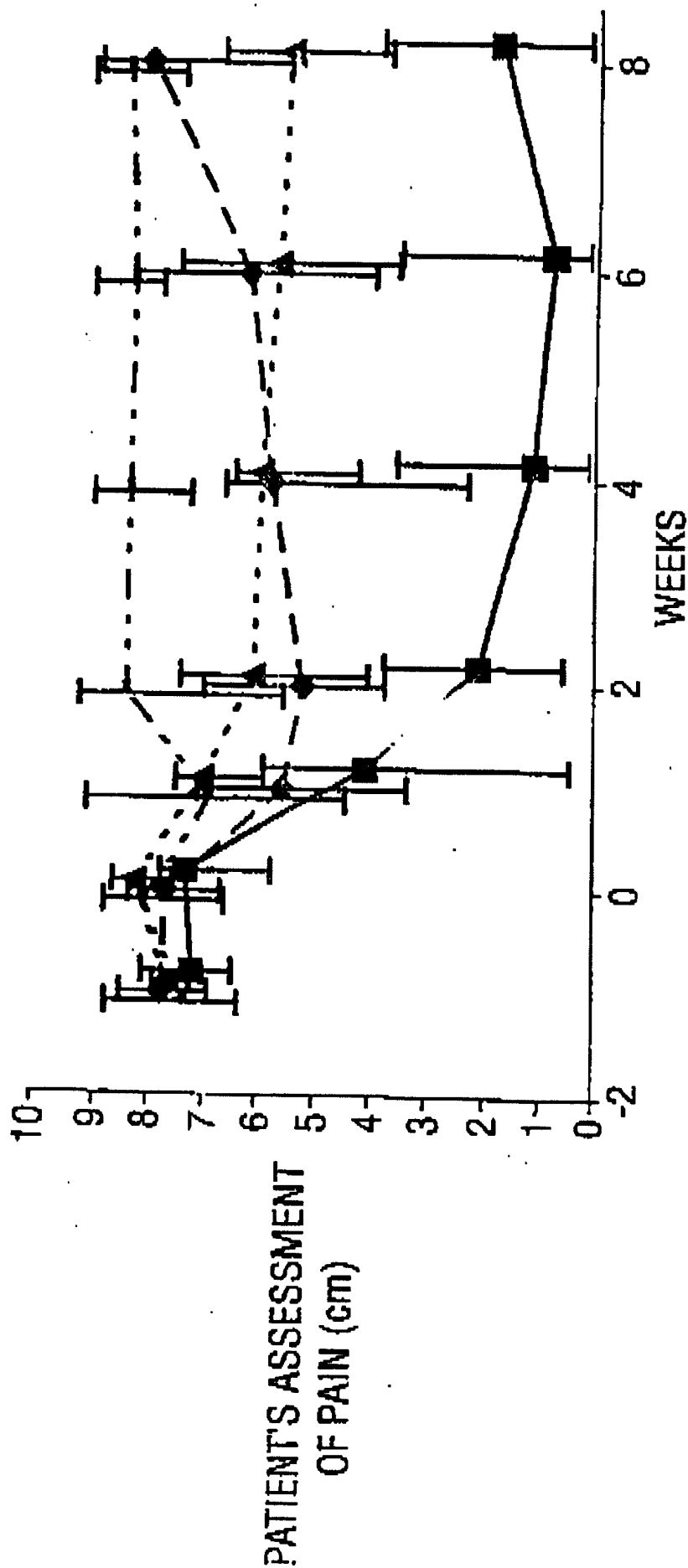


FIG. 24(contd.)

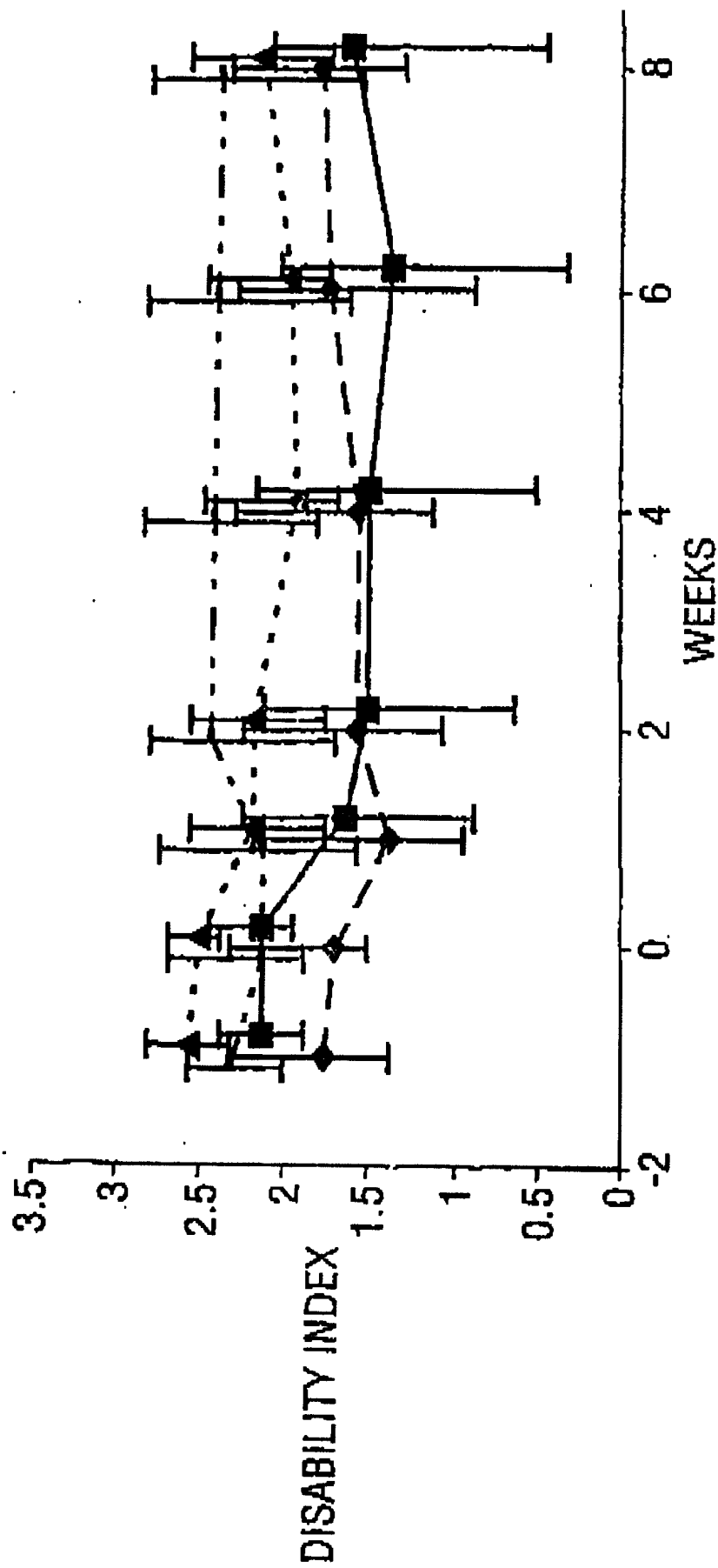


FIG. 24(contd.)

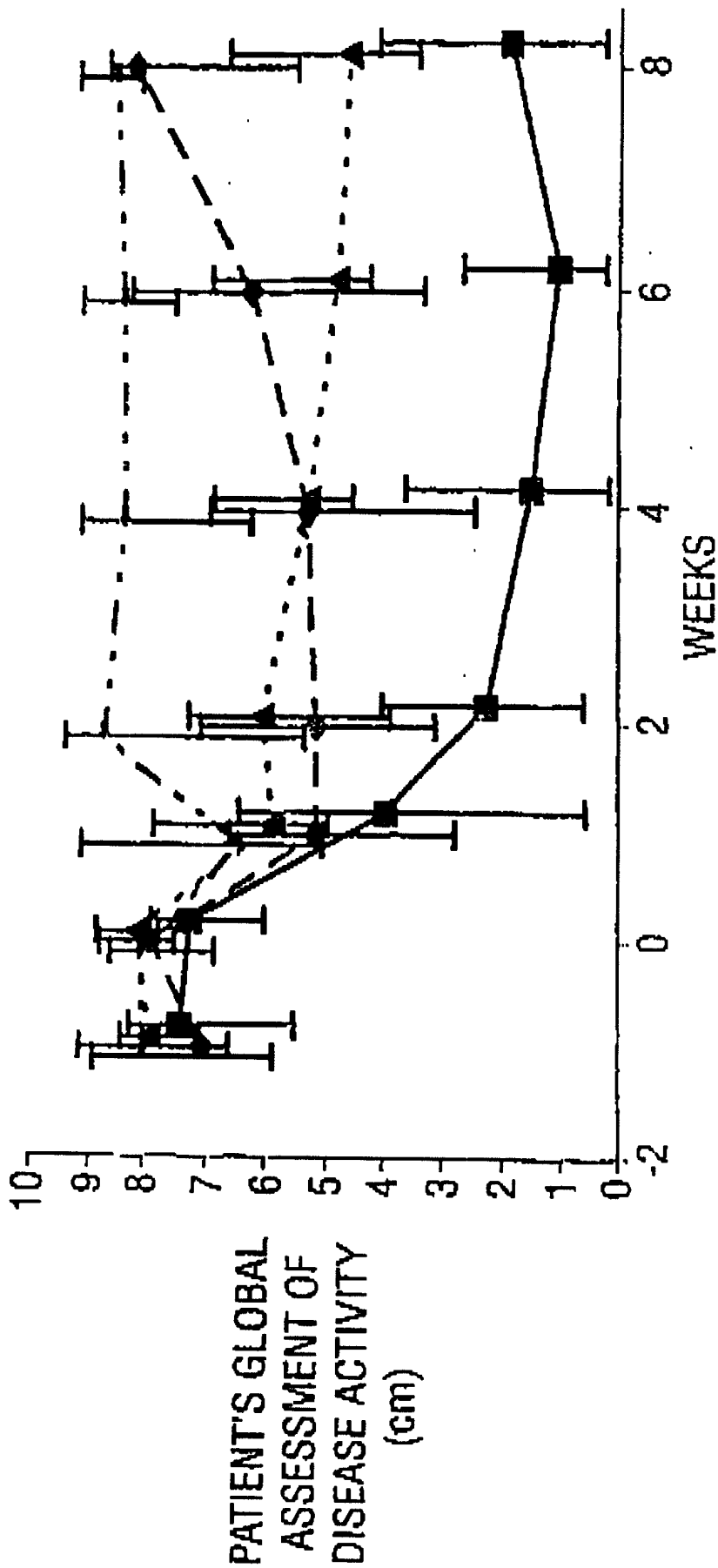
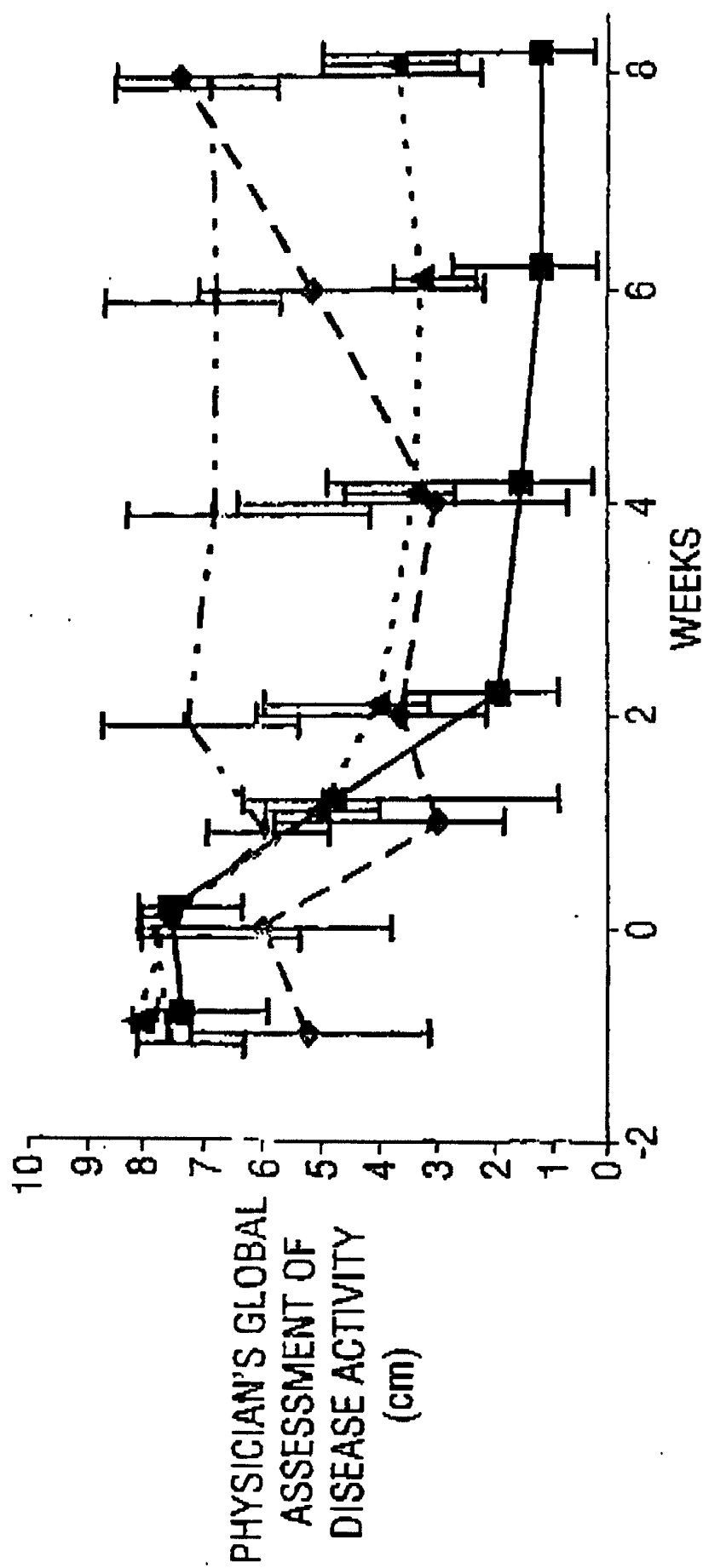


FIG. 24(contd.)



SEQUENCE LISTING

<110> CELLTECH CHIROSCIENCE LIMITED

<120> BIOLOGICAL PRODUCTS

<130> P021741W0

<140>

<141>

<160> 115

<170> Patent In Var. 2.1

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:hTNF40 CDRH1

<400> 1

Asp Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:hTNF40/human hybrid
CDRH2

<400> 2

Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:hTNF40 CDRH3

<400> 3

Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:hTNF40 CDR11

<400> 4
 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
 1 5 10

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:hTNF40 CDR12

<400> 5
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:hTNF40 CDR13

<400> 6
 Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:hTNF40 CDR12

<400> 7
 Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Val Asp Asp Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 8

<211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(321)

<220>
 <225> Description of Artificial Sequence:hTNF40-g11

<400> 8
 gac att caa atg acc cag agc cca tcc agc cta agc gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gac cgg gtc acc atc act tct aca gcc agt cag aac gta ggt act aac 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30
 gta gcc tgg tal cag caa aac cca ggt aaa gcc caa aaa gcc atc atc 144
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45
 ttc agt gcc tct ttc ctc tal agt ggt gta cca ttc agt ttc agc gga 192
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 tcc ggt agt agt act gat ttc acc ctc acc atc agt agc cta cag cca 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 gaa ggt ttc gcc act tal tac tct cca cag tat aac atc tac cca ctc 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu
 85 90 95
 aca ttc ggt cag ggt act aaa gta gaa atc aaa 323
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 9
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(321)

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:hTNF40-g12

<400> 9
 gac att caa atg acc cag agc cca tcc agc cta agc gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

66072 B1

1	5	10	15	
gac cgg gtc acc atc act tgt ana gcc agt cag aac qta ggt act aac	96			
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn				
	20	25	30	
gta gcc tgg tct cag caa aaa cca ggt aaa gcc coo aaa ctc ctc atc	144			
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile				
	35	40	45	
tac agt gcc tct ttc ctc tat agt ggt gta cca tac agg ttc agc gga	192			
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly				
	50	55	60	
tcc ggt agt ggt act gat ttc acc ctc aag atc agt agc ctc cag cca	240			
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro				
	65	70	75	80
gaa gat ttc gcc act tat tac tgt caa cag tat aac atc tac cca ctc	288			
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu				
	85	90	95	
acc ttc ggt cag ggt act aaa gta gaa atc aaa	321			
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys				
	100	105		

<210> 13

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(354)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:ghlhtNF40.4 (Figure 10)

<400> 10

cag gcg cag ctg gtc cag tca gga gca gag gtt aag aag cca ggt gct	48		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
tcc gtc aac gtt tgg tgt aag gcc tca gcc tac gtg ttc acc gac tat	96		
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr			
	20	25	30
ggt atg aat tgg gtc aga cag gcc ccg gga caa gcc cag gaa tgg atg	144		
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
	35	40	45
ggt tgg atc aat act tac att gga gag cct att tac gct cag aag ttc	192		
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gln Glu Pro Ile Tyr Ala Gln Lys Phe			
	50	55	60

66072 B1

cag ggc aga gtc acg ttc act cta gac acc tcc aca agc act gca tac 240
 Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 55 70 75 80
 atg gag ctg tca tct ctg aga tcc gag gac acc gca gtg tac tat tgt 288
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gct aga gga tac aga tct tat gcc atg gac tac tgg gcc cag ggt acc 336
 Ala Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly Thr
 100 105 110
 .cta gtc aca gtc tcc tca 354
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 11
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(354)

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:gh3hTNP40.4 (figure 11)

<400> 11
 gag gtt cag ctg gtc gag tca gga ggc ggt ctc gtg cag cct ggc gga 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 tca ctg aga ttg tcc tgt gct gca tct ggt tac gtc ttc aca gac tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 ggc atg aat tgg gtl aga cag gcc ccg gga aag ggc ctg gca tgg atg 144
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 ggt tgg att gat act tnc att gga gag cct att tat gct gaa agc gtc 192
 Gly Trp Phe Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 aag ggc aga ttc acg ttc tct cta gac acc tcc aag tca cca gca tac 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 ctc caa atg aal agc ctg aga gca gag gaa aac gca ctg tac tat tgt 288
 Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 ggt aga gaa tac aga tct tat gcc atg gac tac tgg gaa cag ggt acc 336

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

cta gtc aca gtc tcc tca 354
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 12
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:part of a primer sequence

<400> 12
 gccgcacc 9

<210> 13
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CH1

<400> 13
 atgaantgaa gctgggtcat ttctt 26

<210> 14
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CH2

<400> 14
 atgggatgga gctrtatcat syctt 26

<210> 15
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CH3

<400> 15
 atgagwltgt ggtaaactg gtttt 26

<210> 16
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CH4

 <400> 16
 atggacllktg gpytcagtt yrt 23

<210> 17
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CH5

 <400> 17
 atggactoca ggetcaattt agtttt 26

<210> 18
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CH6

 <400> 19
 atggctgtcy tngsgctrcr ettctg 26

<210> 19
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CH7

 <400> 19
 atggratgga gckggrrctt tmtctt 25

<210> 20
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CH8

 <400> 20

atgagaggtgc tcatctttt gtg 23

<210> 21
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CH9

<400> 21
 atggmttggg tgtggactt gctatt 26

<210> 22
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CH10

<400> 22
 atgggcagac ttacattctc attcct 26

<210> 23
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CH11

<400> 23
 atggatllly ggtgatttt tttattg 28

<210> 24
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CH12

<400> 24
 atgalegtgt tawgtttct gtacct 26

<210> 25
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer 5' end

<400> 25

gcygcgaagc ttgcggccac c 21

<210> 26
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CL1

<400> 26
 atgaaqthgc ctgtaggct gttggtgct 29

<210> 27
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CL2

<400> 27
 atggagwag mncactcct gytatgggt 29

<210> 28
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CL3

<400> 28
 atgagtgtg:: tractcaggt cct 23

<210> 29
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CL4

<400> 29
 atyaggrccc ctgctcagwt tyttgg 26

<210> 30
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CL5

<400> 30
 atgqathhw agtycagat twtcagott 29

<210> 31
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CL5A

 <400> 31
 atggatttwe argtgagat twtcagctt 29

 <210> 32
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CL6

 <400> 32
 atgaggtkcy ylgysagyt yctgrg 26

 <210> 33
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CL7

 <400> 33
 atgggwtca agatggagtc aca 23

 <210> 34
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CL8

 <400> 34
 atgtygggcy tktttycam ttttcaat 29

 <210> 35
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CL9

 <400> 35
 atggzlcw caactcagtt cett 24

 <210> 36
 <211> 26

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CL10

 <400> 36
 atglatatat gtttgttgtc tatttc 26

 <210> 37
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CL11

 <400> 37
 atggagccc cagctcagct tccttt 26

 <210> 38
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CL12A

 <400> 38
 atgraglyw: agaccaggt cttyr 26

 <210> 39
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CL12B

 <400> 39
 atggagacac attctcaggt ctttgt 26

 <210> 40
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CL13

 <400> 40
 atggaklcau aggccaggt kottat 26

 <210> 41
 <211> 26
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CL14

<400> 41

atgatqagtc ctgcccagtt cctggt

26

<210> 42

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

<400> 42

atgaatttgc ctgttcatct cttggtcct

29

<210> 43

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CL16

<400> 43

atggatcttc aattgctct catctcctt

29

<210> 44

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CL17A

<400> 44

atgaggtgcc tarctcagtt cctgrg

26

<210> 45

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CL17B

<400> 45

atgaagtact ctctcagtt tctagg

26

<210> 46

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CL17C

 <400> 43
 atgaggcatt ctcttcaatt cttggg 26

 <210> 47
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer 5' end

 <400> 47
 ggactgttcg aagccgccac c 21

 <210> 48
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer CL12

 <400> 48
 ggatacagtt: gylgcagcat ccgtacgttt 30

 <210> 49
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer R2155

 <400> 49
 gcagatcggc ccttcqhtga ggclymryag andybtga 37

 <210> 50
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer R1053

 <400> 50
 gctgcagac caacagactg ttcc 24

 <210> 51
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer R720

<400> 51
gctctcggag gtgctcct 18

<210> 52
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide P7982

<400> 52
gaattcaggg tcacuatcac ttgtaaagcc agtcagaacg taggtactaa cytagcctgg 60
taccagcaaa 70

<210> 53
<211> 71
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide P7983

<400> 53
alagaggaaa gaggcactgt agatgagggc ttttggggct ttacctggtt ttgctgata 60
ccaggctacg t 71

<210> 54
<211> 71
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide P7984

<400> 54
tacagtgcct ctttctctca tagtgggtga ccatacaggt toagcggate cyytagtgg 60
actgattca c 71

<210> 55
<211> 71
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide P7985

<400> 55
gacaytaata agtggcgaaa tcttctgct ggaggcact gatcgtgagc ctgaactcag 60
taccactccc g 71

<210> 56
<211> 89
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide P7986

<400> 56

atttcggcac ttattactgt caacagtola acatctacc actcacattc ggtcagggtc 60
 ctaagttagt aatcaaatgt acggaattc 89

<210> 57

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide P7981

<400> 57

gnattcaggy tcaccatcac tlytaaaagcc 30

<210> 56

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide P7980

<400> 50

gaatlccagta cgtttgaltt ctactttagt 30

<210> 59

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide R1053

<400> 59

gctgcagac taacagactg ttcc 24

<210> 60

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide R5350

<400> 60

tcagatggc acacccctcg ctaagtttga tgcacatag atcaggagct taggagc 57

<210> 61

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide R5349

<400> 61

gcagatgggtg tyccatctag attcagtggc atgggatcag gcacagact tacctaac 59

<210> 62

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide R684

<400> 62

tccaactgct cctcagat 18

<210> 63

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer P7989

<400> 63

gagaccacag gcttctaac ctctgctct gactggacca gctgcaactg agagtgcacg 60
aatttc 65

<210> 64

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer P7990

<400> 64

ggtaagaag cctggtgctt ccgtcaagt ttctgtatag gcttcaggt acgtgttcac 60
agactatggt a 71

<210> 65

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer P7991

<400> 65

ccaaccatc ccttcagga cttgtccag ggctgtcttg acccaattca taocatagtc 60
tgtgaccacg t 71

<210> 66

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer P7995

<400> 66

ggcctgaaat ggatggggtg gattaatact tacattggag agcctattta tgttgacgac 60
ttcaagggca gattcacgtt c 81

<210> 67

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer P7992

<400> 67

ccatgtatgc agtgcgttgt ggaggtgtct agagtgaacg tgaatctgcc cttgaa 56

<210> 68

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer P7993

<400> 68

ccacaagcac tgcatacatg gagctgtcat ctctgagatc cgagcagcag agagtgtact 60
at 62

<210> 69

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer P7994

<400> 69

gaattcggta ccctggcccc agtagtccat ggcataagat ctgtatcctc tagcacaata 60
gtacactgcg gtgtcctc 78

<210> 70

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer P7988

<400> 70

gaattcgtgc actctcaggt gcagctggtc 30

<210> 71

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer P7987

<400> 71

gaattcggta ccctggcccc agtagtccat 30

<210> 72

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer P7999

<400> 72

gatccgccag gctgcacgag accgcctect gactogacca gctgaacctc agagtgcacg 60
aattc 65

<210> 73

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer P8000

<400> 73

tctcgtgcag cctggcggat cgctgagatt gtctgtgct gcatctggtt acgtcttcac 60
agactatgga a 71

<210> 74

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer P8001

<400> 74

ccaaccatc catttcaggc cctttcccgg ggctgetta acccaattca ttccatagtc 60
tgtgaagacg t 71

<210> 75

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer P7997

<400> 75

ggaggtatgc tggtgacttg gatgtgtcta gagagaacgt gaatctgccc ttgaa 55

<210> 76

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer P7998

<400> 76

ccaagtcaac agcatacctc caaatgaata gcctgagagc agaggacacc gcagtgtact 60
at 62

<210> 77

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer P7993

<400> 77

gaattcggta ccctggcccc agtagtccat ggcataagat ctgtatcctc tagcacaata 60
gtacactgcg gtgtcctc 78

<210> 78

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer P7996

<400> 78

gaattcgtgc actctgaggt tcagctggtc 30

<210> 79

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer

<400> 79

cgcgcgga ttgcagtggc cttggctggt ttcgctaccg tagcgcaagc tgacattcaa 60
atgaccaga gcc 74

<210> 80

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer

<400> 80

ttcaactgct catcagatgg 20

<210> 81
 <211> 78
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: 5' primer

<400> 81
 gctatcgcaa ttgcagtggc gctagctggt ttgccaccg tggcgcaagc tgaggttcag 60
 ctggtcgagt caggaggc 78

<210> 82
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: 3' primer

<400> 82
 gcctgagttc cagcac 18

<210> 83
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:human group 1 consensus
 framework L1

<400> 83
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 84
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:hTNF40 framework L1

<400> 84
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys
 20

<210> 85
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:human group 1 consensus
 framework L2

<400> 85
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 86
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:hTNF40 framework L2

<400> 86
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 87
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:human group 1 consensus
 framework L3

<400> 87
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 88
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:hTNF40 framework L3

<400> 88
 Gly Val Pro Tyr Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Thr Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys
 20 25 30

<210> 89
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:human group 1 consensus
 framework L4

<400> 89
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 90
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:human group 1 consensus
 framework L4

<400> 90
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 1 5 10

<210> 91
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:human group 1 consensus
 framework H1

<400> 91
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30

<210> 92
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:hTNF40 framework H1

<211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: hTNF40 framework H3

<400> 96
 Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Phe Leu Gln
 1 5 10 15
 Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 97
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: human group 1 consensus
 framework H4

<400> 97
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 98
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: hTNF40 framework H4

<400> 98
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 99
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> murine

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)
 <223> mouse hTNF40 light chain variable domain

<400> 99

66072 B1

gac att gtg atg acc cag tct caa aaa ttc atg tcc aca tca gta gga 48
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

 gac agg gtc agc gtc acc tgc aag gcc agt cag aat gtg ggt act aat 96
 Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30

 gta gcc tgg tat caa cag aaa cca gga caa tct cct aaa gca ctg att 144
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45

 tac tcg gca tcc ttc cta tat agt gga gtc cct tat cgc ttc aca ggc 192
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

 agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc act gtg cag tct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Thr Val Gln Ser
 65 70 75 80

 gaa gac ttg gca gag tat ttc tgt cag caa tat aac atc tat cct ctc 288
 Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu
 85 90 95

 acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa cgt 324
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210> 100
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> murine

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(354)
 <223> mouse hTNF40 heavy chain variable domain

<400> 100
 cag atc cag ttg gtg cag tct gga cct gag ctg aag aag cct gga gag 48
 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

 aca gtc aag atc tcc tgc aag gct tct gga tat gtt ttc aca gac tat 96
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

 gga atg aat tgg gtg aag cag gct cca gga aag gct ttc aag tgg atg 144
 Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Ala Phe Lys Trp Met
 35 40 45

 ggc tgg ata aac acc tac att gga gag cca ata tat gtt gat gac ttc 192
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Val Asp Asp Phe
 50 55 60

66072 B1

aag gga cga ttt gcc ttc tct ttg gaa acc tct gcc agc act gcc ttt 240
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Phe
 65 70 75 80

ttg cag atc aac aac ctc aaa aat gag gac acg gct aca tat ttc tgt 288
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

gca aga ggt tac cgg tcc tat gct atg gac tac tgg ggt caa gga acc 336
 Ala Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

tca gtc acc gtc tct tca 354
 Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 101
 <211> 84
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> CDS
 <222> (29)..(67)

<223> Description of Artificial Sequence:OmpA oligonucleotide adaptor

<400> 101
 tcgagttcta gataacgagg cgtaaaaa atg aaa aag aca gct atc gca att 52
 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile
 1 5

gca gtg gcc ttg gct ctgacgtacg agtcagg 84
 Ala Val Ala Leu Ala
 10

<210> 102
 <211> 67
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> CDS
 <222> (2)..(40)

<220>
 <221> CDS
 <222> (43)..(66)

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:IGS cassette-1

<400> 102
 g agc tca cca gta aca aaa agt ttt aat aga gga gag tgt ta atg aag 48

66072 B1

15

20

<210> 105
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> CDS
 <222> (2)..(43)

<220>
 <221> CDS
 <222> (57)..(80)

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:IGS cassette-4

<400> 105
 g agc tca cca gta aca aaa agt ttt aat aga gga gag tgt tga 43
 Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 1 5 10

cgaggattat ata atg aag aaa act gct ata gca att g 81
 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile
 15 20

<210> 106
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:human group 3 consensus
 framework H1

<400> 106
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

<210> 107
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:human group 3 consensus
 framework H2

<400> 107

66072 B1

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

<210> 108
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:human group 3 consensus
 framework H3

<400> 108
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 109
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:human group 3 consensus
 framework H4

<400> 109
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 110
 <211> 648
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Grafted Heavy Chain for Fab

<400> 110
 gaggttcagc tggtcgagtc aggaggcggc ctctgtgcagc ctggcggatc actgagattg 60
 tctctgtgctg catctgggta cgtcttcaca gactatggaa tgaattgggt tagacaggcc 120
 ccgggaaagg gcctggaatg gatgggttgg attaatactt acattggaga gcctatttat 180
 gctgacagcg tcaagggcag attcacgttc tctctagaca catccaagtc aacagcatac 240
 ctccaaatga atagcctgag agcagaggac accgcagtgt actattgtgc tagaggatac 300
 agatcttatg ccatggacta ctggggccag ggtaccctag tcacagtctc ctgagcttcc 360
 accaagggcc catcggctct ccccctggca cctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
 gcggccctgg gctgcctggc caaggactac ttccccgaac cggtgacggc gtcgtggaac 480
 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccgctg tcctacagtc ctgaggactc 540
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacca gacctacatc 600

tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtcgaca agaaagtt

648

<210> 111
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Grafted Heavy Chain for Fab

<400> 111
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 210 215

<210> 112
 <211> 642
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Grafted Light Chain for Fab and Modified Fab

<400> 112

```

gacattcaaa tgaccagag cccatccagc ctgagcgcat ctgtaggaga ccgggtcacc 60
atcacttgta aagccagtca gaacgtaggc actaacgtag cctgggatca gcaaaaacca 120
ggtaaagccc caaaagccct catctacagt gcctctttcc tctatagtgg tgtaccatac 180
aggttcagcg gatccggtag tggtagctgat ttcaccctca cgatcagtag cctccagcca 240
gaagatttcg ccacttatta ctgtcaacag tataacatct acccactcac attcggtcag 300
ggtactaaag tagaaatcaa acgtacggta ggggccccat ctgtcttcat cttcccgccca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcac cagtaacaaa aagctttaat agaggagagt gt 642

```

<210> 113

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Grafted Light Chain for Fab and Modified Fab

<400> 113

```

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly
50           55           60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu
85           90           95

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

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

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

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

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

```


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

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

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

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

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

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Ala Ala
 225

Издание на Патентното ведомство на Република България
 1797 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Д. Кацарова

Пор. № 67128

Тираж: 40 СР