



HU000230561B1

(19) **HU****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **230 561**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 02 02346**(22) A bejelentés napja: **2001. 06. 05.**(40) A közzététel napja: **2002. 10. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2016. 12. 28.**(51) Int. Cl.: **C12N 15/13** (2006.01)**A61K 393/95** (2006.01)**A61K 47/48** (2006.01)**A61P 19/02** (2006.01)**A61P 37/06** (2006.01)**C12N 15/62** (2006.01)**C12N 15/70** (2006.01)**C07K 16/24** (2006.01)**C07K 16/46** (2006.01)**C07K 19/00** (2006.01)**C12N 1/21** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/GB 01/02477

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

WO 0194585

(30) Elsőbbségi adatok:

0013810.7**2000. 06. 06.****GB**

(72) Feltaláló(k):

Athwal, Diljeet Singh, Slough, Berkshire (GB)
Brown, Derek Thomas, Slough, Berkshire (GB)
Weir, Andrew Neil Charles, Slough, Berkshire (GB)
Popplevell, Andrew George, Slough, Berkshire (GB)
Chapman, Andrew Paul, Slough, Berkshire (GB)
King, David John, Slough, Berkshire (GB)

(73) Jogosult(ak):

UCB Pharma S.A., Brussels (BE)

(74) Képviselő:

Gödölle, Kékes, Mészáros & Szabó
Szabadalmi és Védjegy Iroda, Budapest(54) **Humán tumor nekrozis faktor-alfa specifikus antitest molekulák és alkalmazásuk**

(57) Kivonat

A találmány olyan antitest molekulákra vonatkozik, amelyek legalább egy olyan CDR-t tartalmaznak, amely humán TNF α specifitású egér monoklonális antitestből származik. Ugyancsak a találmány tárgyát képezi egy CDR-beültetett antitest is, amelyben a CDR-ek közül legalább egy, hibrid CDR. A találmány vonatkozik továbbá antitest molekulák láncait kódoló DNS szekvenciákra, vektorokra, transzformált gazdasejtekre és az antitest molekulák alkalmazására TNF α -közvetített betegségek kezelésében.

Humán tumor nekrozis faktor-alfa specifikus antitest molekulák és alkalmazásuk

A találmány olyan antitest molekulára vonatkozik, amely a humán tumor nekrozis faktor-alfa (TNF α) antigén-determinánsaira specifikus. A találmány az antitest molekula terápiás alkalmazására és az antitest molekula előállítására is vonatkozik.

A találmány tárgyát antitest molekulák képezik. Egy antitest molekula két nehéz láncból és két könnyű láncból áll. Mindkét nehéz lánc és mindkét könnyű lánc N-terminális vége variábilis domént tartalmaz. Az egyes variábilis domének négy-négy framework régióból (FRs) állnak váltakozva három komplementaritást meghatározó régióval (complementarity determining regions = CDRs). A variábilis doménekben lévő csoportok a Kabat és munkatársai által kidolgozott rendszernek megfelelően, megállapodás szerint vannak számozva. A rendszert a következő kiadvány ismerteti: Kabat et al.: Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (1987) [a továbbiakban: „Kabat et al. (supra)“]. Ezt a számozási rendszert használjuk ebben a leírásban, ha másként nem jelezzük.

A Kabat féle csoport jelölések nem mindig egyeznek meg pontosan az aminosavcsoportok (aminosavmaradékok) lineáris számozásával. A tényleges lineáris aminosavszekvencia kevesebb vagy több aminosavat tartalmazhat a pontos Kabat féle számozáshoz képest, annak megfelelően, hogy az alap variábilis domén szerkezet egy szerkezeti komponensét – akár framework, akár CDR – megrövidítjük vagy beépítéssel meghosszabbítjuk.

A csoportok helyes Kabat számozását egy adott antitestre úgy lehet meghatározni, hogy az antitest szekvenciájában a homológ csoportokat összeigazítjuk egy „standard” Kabat szerint számozott szekvenciával.

A nehéz lánc variábilis domén CDR-ei a 31-35-ös csoportnál (CDRH1), 50-65-ös csoportnál (CDRH2) és 95-102-ös csoportnál (CDRH3) helyezkednek el a Kabat számozás szerint.

A könnyű lánc variábilis domén CDR-ei a 24-34-es csoportnál (CDRL1), 50-56-os csoportnál (CDRL2) és 89-97-es csoportnál (CDRL3) helyezkednek el a Kabat számozás szerint.

CDR-beültetett antitestek előállítását írja le az EP-A-0239400 számú szabadalmi bejelentés, amely egy olyan eljárást ismertet, amelyben egy egér monoklonális antitest CDR-eit egy humán immunglobulin variábilis doménjeinek framework régióiba ültetik be helyre irányuló mutagenezissel, hosszú oligonukleotidokat használva. A CDR-ek határozzák meg az antitestek antigénkötő specificitását. Ezek viszonylag rövid peptid szekvenciák, amelyeket a variábilis domének framework régiói hordoznak.

A monoklonális antitestek CDR-beültetéssel való humanizálását célzó legkorábbi munkát szintetikus antigéneket – ilyen például az NP – felismerő monoklonális antitestekkel végezték. Azonban olyan példákat, amelyekben lizozimet felismerő egér monoklonális antitestet és humán T-sejteken lévő antigént felismerő patkány monoklonális antitestet humanizáltak CDR beültetéssel, Verhoeyen és munkatársai [Verhoeyen et al., *Science*, 239, 1534-1536 (1988)] írtak le.

Riechmann és munkatársai megállapították, hogy egyedül a CDR-ek átvitele [amint azt Kabat (Kabat et al., lásd fent) és Wu et al. (*J. Exp. Med.*, 132, 211-250 (1970) leírták] nem elégséges ahhoz, hogy kielégítő antigén kötő aktivitást biztosítson a CDR-beültetett termék számára. Azt találták, hogy számos framework csoportot meg kellett változtatni ahhoz, hogy megfeleljenek a donor framework régió csoportjainak. A WO 90/07861 számú nemzetközi közzétételi irat ajánlott kritériumokat tartalmaz azon framework csoportok kiválasztásához, amelyeket meg kell változtatni.

Nagyszámú olyan összefoglaló közleményt publikáltak, amelyek CDR-beültetett antitesteket tárgyalnak, beleértve Vaughan és munkatársai közleményét [Vaughan et al., *Nature Biotechnology*, 16, 535-539 (1998)].

A TNF α egy pro-inflammatorikus citokin, amelyet az immunrendszer sejtjei bocsátanak ki és amely az immunrendszer sejtjeivel kölcsönhatást létesít. A TNF α -t olyan makrofágok termelik, amelyeket Gram negatív baktériumok lipopoliszacharidjai (LPS) aktiváltak. Úgy tűnik, hogy a TNF α döntő fontosságú

endogén mediátorként szerepet játszik a bakteriális szepszissel járó endotoxikus sokk kialakulásában és patogenezisében. Azt is kimutatták, hogy a TNF α számos humán betegségben felszaporodik, beleértve az olyan krónikus betegségeket, mint a rheumatoid arthritis, Crohn betegség, colitis ulcerosa és a sclerosis multiplex. Humán TNF α transzgenikus egerek természetüknél fogva nagy mennyiségű TNF α -t termelnek és egy rheumatoid arthritishez hasonló spontán, destruktív poliartitist fejlesztenek ki [Kaffer et al., EMBO J., 10, 4025-4031 (1991)]. A TNF α -t ezért pro-inflammatorikus citokinnek nevezik.

Megelőzőleg már leírtak TNF α elleni monoklonális antitesteket. Meager és munkatársai [Meager et al., Hybridoma, 6, 359-370 (1987)] leírták a rekombináns TNF α elleni monoklonális antitestek alkalmazását, ugyanakkor meghatározták a TNF-en lévő neutralizáló epitópokat. Shimamoto és munkatársai [Immunology Letters, 17, 311-318 (1988)] TNF α elleni egér monoklonális antitestek alkalmazásáról és égésekben endotoxikus sokk megelőzésére való használatáról írtak. Ezenkívül a WO 92/11383 számú nemzetközi közzétételi irat TNF α -ra specifikus rekombináns antitestekre – beleértve a CDR-beültetett antitesteket – vonatkozik. Rankin és munkatársai [British J. Rheumatology, 34, 334-342 (1995)] ilyen CDR-beültetett antitestek rheumatoid arthritis kezelésében való alkalmazását írták le. Az US-A-5 919 452 számú szabadalmi leírás anti-TNF kiméra antitestekre és TNF jelenlétével összefüggő kóros állapotok kezelésében való alkalmazásukra vonatkozik.

A TNF α elleni antitesteket endotoxikus sokk megelőzésére és kezelésére már javasolták [Bentler et al., Science, 234, 470-474 (1985)]. Bodmer és munkatársai [Critical Care Medicine, 21, S441-S446 (1993)], valamint Wherry és munkatársai [Critical Care Medicine, 21, S436-S440 (1993)] szeptikus sokk kezelésében az anti-TNF α antitestek terápiás potenciáljáról értekeztek. Az anti-TNF α antitestek szeptikus sokk kezelésére való alkalmazását Kirschenbaum és munkatársai [Critical Care Medicine, 26, 1625-1626 (1998)] is taglalták. Kollagén-indukált arthritis hatékonyan kezelhető anti-TNF α monoklonális antitest alkalmazásával [Williams et al., PNAS-USA, 89, 9784-9788 (1992)].

Rheumatoid arthritis-ben szenvedő paciensek ízületi nedvében és perifériás vérében a TNF α megnövekedett szintjeit mutatták ki. Amikor rheumatoid

arthritisben szenvedő pacienseknek TNF α blokkoló szereket adtak be, ezek csökkentették a gyulladást, javították a tüneteket és késleltették az ízület károsodását [McKown et al., *Arthritis Rheum.*, 42, 1204-1208 (1999)].

Az anti-TNF α antitestek rheumatoid arthritis és Crohn betegség kezelésében való alkalmazásáról a következő közlemények számoltak be: Feldman et al., *Transplantation Proceedings*, 30, 4126-41127 (1998); Adorini et al., *Trends in Immunology Today*, 18, 209-211 (1997) és Feldman et al., *Advances in Immunology*, 64, 283-350 (1997). Az ilyen kezelésekhöz használt TNF α elleni antitestek általában kiméra antitestek. Ilyeneket tartalmaz az US-A-5 919 452 számú szabadalmi bejelentés.

Jelenleg két TNF α blokkoló termék van engedélyezve rheumatoid arthritis kezelésére. Az elsőt – neve etanercept – az Immunex Corporation forgalmazza Enbrel márkanév alatt. Ez egy rekombináns fúziós protein, amely egy humán immunglobulin Fc részhez kapcsolt két p75 oldható TNF-receptor domént tartalmaz. A másodikat, amelynek a neve infliximab, a Centocor Corporation forgalmazza Remicade néven. Ez egy kiméra antitest, amely egér anti-TNF α variábilis doméneket és humán IgG1 konstans doméneket tartalmaz.

Az előzőek folyamán előállított rekombináns anti-TNF α antitest molekuláknak általában gyenge affinitása volt TNF α -hoz, összehasonlítva azokkal az antitestekkel, amelyekből a variábilis régiók vagy a CDR-ek származtak. Ezeket a molekulákat általában emlős sejtekben kellett termelni és költséges volt az előállításuk. Az előzőek szerint előállított anti-TNF α antitestek leírását lásd: Stephens et al., *Immunology*, 85, 668-674 (1995), továbbá GB-A-2 246 570 és GB-A-2 297 145 szabadalmi bejelentés.

Stephens és munkatársai (*Immunology*, 1995, 85(4), 668-674) leírnak egy csökkentett immunogenitással és génterápiára való alkalmasságot mutatóan hosszabb féléletidővel rendelkező, anti-hTNF α antitesten (CB0010) alapuló, CDR-beültetett, humanizált anti-humán-TNF α antitestet (CPD 571).

Igény van krónikus gyulladásos (inflammatorikus) betegségek kezelésére alkalmas olyan antitest molekulára, amely ismételten alkalmazható és könnyen, jó kihozattal termelhető. Ugyancsak igény van olyan antitest molekulára, amelynek erős az affinitása TNF α -hoz és emberekben alacsony az immunogén hatása.

Első alakként egy TNF α -ra specifikus olyan antitest molekulát ismertetünk, amelyben a nehéz lánc variábilis doménje tartalmaz olyan CDR-t [Kabat et al. (supra) definíciója szerint], amelynek a szekvenciája CDRH1 esetén a 3. ábrán H1-ként megadott (1. számú szekvencia vagy másszóval 1-es azonosító számú szekvencia), CDRH2 esetén a 3. ábrán H2'-ként megadott (2. számú szekvencia) vagy a 3. ábrán H2-ként megadott (7. számú szekvencia), vagy CDRH3 esetén a 3. ábrán H3-ként megadott (3. számú szekvencia).

Az első alak antitest molekulája legalább egy olyan CDR-t tartalmaz, amelyet a H1, H2' vagy H2 és H3 (1. számú szekvencia; 2. számú szekvencia; vagy 7. számú szekvencia és 3. számú szekvencia) közül választunk a nehéz lánc variábilis domén számára. Az antitest molekula előnyösen két vagy több CDR-t tartalmaz, előnyös, ha mindhárom CDR-t tartalmazza a nehéz lánc variábilis doménben.

Második alakként egy TNF α -ra specifikus olyan antitest molekulát ismertetünk, amelyben a könnyű lánc variábilis doménje tartalmaz olyan CDR-t [Kabat et al. (lásd fent) definíciója szerint], amelynek a szekvenciája CDRL1 esetén a 3. ábrán L1-ként megadott (4. számú szekvencia), CDRL2 esetén a 3. ábrán L2-ként megadott (5. számú szekvencia) vagy CDRL3 esetén a 3. ábrán L3-ként megadott (6. számú szekvencia).

A második alak antitest molekulája legalább egy olyan CDR-t tartalmaz, amelyet az L1, L2 és L3 (4. számú szekvenciától a 6. számú szekvenciáig) közül választunk a könnyű lánc variábilis doménhez. Az antitest molekula előnyösen legalább két vagy több CDR-t tartalmaz, előnyös, ha mindhárom CDR-t tartalmazza a könnyű lánc variábilis doménben.

Az első és második alak antitest molekulái előnyösen komplementer könnyű láncot, illetve komplementer nehéz láncot tartalmaznak.

Előnyös, ha az első és második alak szerinti antitest molekula tartalmaz olyan nehéz láncot, amelyben a variábilis domén tartalmaz olyan CDR-t [Kabat et al., (lásd fent) definíciója szerint], amelynek a szekvenciája CDRH1 esetén a 3. ábrán H1-ként megadott (1. számú szekvencia), CDRH2 esetén a 3. ábrán H2'-ként vagy H2-ként megadott (2. számú szekvencia vagy 7. számú szekvencia) vagy CDRH3 esetén a 3. ábrán H3-ként megadott (3. számú szekvencia), és

tartalmaz olyan könnyű láncot, amelyben a variábilis domén tartalmaz olyan CDR-t [Kabat et al., (lásd fent) definíciója szerint], amelynek a szekvenciája CDRL1 esetén a 3. ábrán L1-ként megadott (4. számú szekvencia), CDRL2 esetén a 3. ábrán L2-ként megadott (5. számú szekvencia), vagy CDRL3 esetén a 3. ábrán L3-ként megadott (6. számú szekvencia).

A fent említett CDR szekvenciák – azaz az 1. számú és a 3-7. számú szekvenciák, illetve a 3. ábrán szereplő szekvenciák – hTNF40 egér monoklonális antitestből származnak. A 2. számú szekvencia azonban egy hibrid CDR-ből áll. A hibrid CDR tartalmazza a hTNF40 egér monoklonális antitestből való nehéz lánc CDR2 (7. számú szekvencia) részét és egy humán 3-as csoportú csírvonal V régió szekvenciából való nehéz lánc CDR2 részét.

Az egér hTNF40 antitest variábilis doménjeinek teljes szekvenciáit a 6. ábra (könnyű lánc) (99. számú szekvencia) és a 7. ábra (nehéz lánc) (100. számú szekvencia) mutatja. Ezt az egér antitestet az alábbiakban „donor antitest”-nek nevezzük.

Az első vagy második alak egy első vagylagos kiviteli formája a hTNF40 egér monoklonális antitest, amelynek könnyű és nehéz lánc variábilis domén szekvenciáit a 6. ábra (99. számú szekvencia), illetve a 7. ábra (100. számú szekvencia) mutatja be. A hTNF40 könnyű lánc konstans régió kappa és a nehéz lánc konstans régió IgG2a.

Egy második vagylagos kiviteli formában az első vagy második alak közül valamelyik szerinti antitest egy kiméra egér/humán antitest molekula, amelyet itt kiméra hTNF40 antitest molekulának nevezünk. A kiméra antitest molekula tartalmazza a hTNF40 egér monoklonális antitest variábilis doménjeit (99. számú és 100. számú szekvencia) és tartalmaz humán konstans doméneket. Előnyös, ha a kiméra hTNF40 antitest molekula a humán C kappa domént tartalmazza [Hieter et al., *Cell*, 22, 197-207 (1980); Génbank lajstromszám: J00241) a könnyű láncban és a humán gamma 4 doméneket [Flanagan et al., *Nature*, 300, 709-713 (1982)] a nehéz láncban.

Egy harmadik vagylagos kiviteli formában az első vagy második alak egyike szerinti antitest egy CDR-beültetett antitest molekula. A „CDR-beültetett antitest molekula” kifejezés, ahogyan itt használjuk, olyan antitest molekulára vonatkozik,

amelyben a nehéz és/vagy könnyű lánc a donor antitestből (például egy egér monoklonális antitestből) egy vagy több CDR-t (beleértve, ha kívánt, egy hibrid CDR-t) tartalmaz egy akceptor antitest (például egy humán antitest) nehéz és/vagy könnyű lánc variábilis régió frameworkbe beültetve.

Egy ilyen CDR-beültetett antitest variábilis doménje tartalmazhat akceptor framework régiókat, valamint egy vagy több fentiekben említett donor CDR-t.

A CDR-ek beültetésekor minden megfelelő akceptor variábilis régió framework használható, figyelembe véve annak a donor antitestnek az osztályát, típusát, amelyből a CDR-ek származnak, beleértve az egér, főemlős és humán framework régiókat. A találmányban alkalmazható humán framework szekvenciák például a következők: KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY és POM [Kabat et al., (lásd fent)]. Például a KOL és NEWM a nehéz lánchoz használható, a REI a könnyű lánchoz használható és az EU, LAY és POM mind a nehéz lánchoz, mind a könnyű lánchoz használható. A könnyű lánchoz előnyös framework régiók a humán 1-es csoportba tartozó framework régiók, amelyek az 1. ábrán láthatók (83., 85., 87. és 89. számú szekvenciák). A nehéz lánchoz előnyös framework régiók a humán 1-es csoportba és 3-as csoportba tartozó framework régiók, amelyeket a 2. ábrán mutatunk be (91., 93., 95. és 97. számú szekvenciák, illetve 106., 107., 108. és 109. számú szekvenciák).

Egy találmány szerinti CDR-beültetett antitestben előnyben részesítjük az olyan akceptor antitest használatát, amelynek a láncai homológok a donor antitest láncjaival. Nem feltétlenül szükséges, hogy a nehéz és könnyű lánc ugyanabból az antitestből származzék, és ha kívánt, tartalmazhat összetett láncokat, amelyben a framework régiók különböző láncokból származnak.

Továbbá, egy CDR-beültetett antitestben nem szükséges, hogy a framework régiók szekvenciája pontosan ugyanaz a szekvencia legyen, mint az akceptor antitest framework régióé. Például a szokatlan csoportokat az ezen akceptor lánc osztályban vagy típusban gyakrabban előforduló csoportokká lehet változtatni. Eljárhatunk úgy is, hogy az akceptor framework régiókban a kiválasztott csoportokat úgy változtatjuk meg, hogy ezek megfeleljenek annak a csoportnak, amely a donor antitestben ugyanabban a pozícióban található. Ezeknél a változtatásoknál be kell tartani azt a szükséges minimumot, hogy

megkapjuk a donor antitest affinitását. Az akceptor framework régióban a csoportok kiválasztásának metodikáját – azaz hogy melyeket szükséges megváltoztatni – a WO 91/09967 számú nemzetközi közzétételi irat ismerteti.

Egy CDR-beültetett antitest molekulában, amennyiben az akceptor nehéz láncban humán 1-es csoportú framework régiók vannak (lásd a 2. ábrát) (91., 93., 95. és 97. számú szekvenciák), akkor az az előnyös, ha a nehéz lánc akceptor framework régiók az egy vagy több donor CDR-n kívül a 28., 69. és 71. pozícióban [Kabat et al., (lásd fent)] is donor csoportokat tartalmaznak.

Vagy pedig, ha az akceptor nehéz lánc 1-es csoportú framework régiókat tartalmaz, akkor a nehéz lánc akceptor framework régiók az egy vagy több donor CDR-en kívül, donor csoportokat tartalmaznak a 28., 38., 46., 67., 69. és 71. pozícióban [Kabat et al., (lásd fent) szerint].

Ha a CDR-beültetett antitest molekulában, amennyiben az akceptor nehéz lánc humán 3-as csoportú framework régiókat (lásd a 2. ábrát) (106., 107., 108. és 109. számú szekvencia) tartalmaz, akkor előnyös, ha a nehéz lánc akceptor framework régiók az egy vagy több donor CDR-en kívül donor csoportokat tartalmaznak a 27., 28., 30., 48., 49., 69., 71., 73., 76. és 78. pozícióban [Kabat et al., (lásd fent) szerint].

Egy CDR-beültetett antitest molekulában, amennyiben az akceptor könnyű lánc – humán 1-es csoportú framework régiói vannak (lásd az 1. ábrát) (83., 85., 87. és 89. számú szekvencia), akkor előnyös, ha a könnyű lánc akceptor framework régiói donor csoportokat tartalmaznak a 46. és 60. pozícióban [Kabat et al., (lásd fent) szerint].

A donor csoportok a donor antitestből származó csoportok, azaz abból az antitestből, amelyből a CDR-ek eredetileg származnak.

Az antitest molekula tartalmazhat: egy teljes antitest molekulát teljes hosszúságú nehéz és könnyű láncokkal; ennek egy fragmentumát, ilyen egy Fab, módosított Fab, Fab', F(ab')₂ vagy Fv fragmentum; könnyű lánc vagy nehéz lánc monomert vagy dimert; egyláncú antitestet, például egy egyláncú Fv-t, amelyben a nehéz lánc és a könnyű lánc variábilis domének peptid linkerrel vannak összekapcsolva. Hasonló módon, a nehéz és könnyű lánc variábilis domének is kombinálhatók más antitest doménekkal, ahogy éppen helyénvaló.

Az antitest molekula lehet egy Fab fragmentum. Előnyös, ha a Fab fragmentum nehéz láncának a szekvenciáját a 111. számú szekvencia és könnyű láncának a szekvenciáját a 113. számú szekvencia adja meg. A 111. számú szekvencia és a 113. számú szekvencia szerinti aminosavszekvenciákat előnyösen a 110. számú szekvencia, illetve a 112. számú szekvencia szerinti nukleotid szekvenciák kódolják.

Előnyösnek tartjuk, ha a találmány szerinti antitest molekula egy olyan módosított Fab fragmentum, amelynél a módosítás nehéz láncának C-terminális végéhez egy vagy több aminosav hozzáadása, hogy ez lehetővé tegye egy effektor vagy riporter molekula hozzákapcsolását. Előnyös, ha a hozzáadott aminosavak egy módosított csukló régiót képeznek, amely egy vagy több olyan ciszteincsoportot tartalmaz, amelyhez az effektor vagy riporter molekulát lehet kapcsolni. Egy ilyen módosított Fab fragmentum előnyösen olyan nehéz láncot tartalmaz, amelynek a szekvenciáját a 115. számú szekvencia adja meg, és olyan könnyű láncot, amelynek a szekvenciáját a 113. számú szekvencia adja meg. A 115. számú szekvencia szerinti aminosavszekvenciát előnyösen a 114. számú szekvencia szerinti nukleotid szekvencia kódolja.

Előnyös effektor csoport egy polimer molekula, amelyet a módosított Fab fragmentumhoz kapcsolhatunk, hogy növeljük in vivo felezési idejét.

A polimer molekula általában szintetikus vagy természetben előforduló polimer lehet, például adott esetben egy szubsztituált egyenes vagy elágazó láncú polialkilén, polialkenilén vagy polioxialkilén polimer vagy egy elágazó vagy nem elágazó láncú poliszacharid, például egy homo- vagy heteropoliszacharid.

A fent említett szintetikus polimerekben a speciális tetszés szerinti szubsztituensek közül jelen lehet egy vagy több hidroxil-, metil- vagy metoxi-csoport. A szintetikus polimerek konkrét példáiként említjük az adott esetben szubsztituált egyenes vagy elágazó láncú polietilén-glikolt, polipropilén-glikolt, polivinilalkoholt vagy ezek származékait, főképpen az adott esetben szubsztituált polietilén-glikolt, ilyenek pl. a metoxi-polietilén-glikol vagy ennek származékai. A speciális, természetben előforduló polimerek közé tartozik a laktóz, amilóz, dextrán, glikogén vagy ezek származékai. „Származékok” – ahogyan itt használjuk – közé tartoznak a reaktív származékok, például a tiol-szelektív reaktív csoportok,

mint a maleinsavimidek és hasonlóké. A reaktív csoport közvetlenül vagy linker szegmentumon keresztül köthető a polimerhez. Érthető, hogy egy ilyen csoport maradéka bizonyos esetekben a termék részét fogja képezni, az antitest fragmentum és a polimer közötti összekötő csoportként.

A polimer mérete kívánság szerint változhat, de átlagos molekulatömege általában 500 – 50 000 D, előnyösen 5 000 – 40 000 D, különösen 25 000 – 40 000 D tartományban van. A polimer méretét elsősorban a termék tervbe vett alkalmazása alapján választhatjuk meg. Ennélfogva például ahol azt óhajtjuk, hogy a termék lépjen ki a keringésből és hatoljon be a szövetbe, például tumor kezelésében való alkalmazás esetén, ott előnyös lehet egy kis molekulatömegű polimer használata, például egy 5000 D körüli molekulatömeggel. Olyan alkalmazásokhoz, ahol a termék a keringésben marad, egy magasabb molekulatömegű polimer használata lehet előnyös, például amelynek a molekulatömege 25 000 D-től 40 000 D-ig terjed.

A különösen előnyös polimerek közé tartozik egy polialkilén polimer, ilyen egy polietilén-glikol vagy különösen egy metoxi-polietilén-glikol vagy ennek egy származéka, leginkább körülbelül 25 000 D-től körülbelül 40 000 D-ig terjedő molekulatömeg tartományban.

A módosított antitest fragmentumhoz kapcsolt polimer molekulák kovalensen kötődhetnek a fragmentumban elhelyezkedő ciszteincsoport kénatomjához. A kovalens kötés általában egy diszulfid kötés, vagy főként egy kén-szén kötés.

Ahol kívánatos, az antitest fragmentumhoz egy vagy több effektor vagy riporter molekulát köthetünk. Az effektor vagy riporter molekulákat a fragmentumban rendelkezésre álló minden oldalláncon keresztül és terminális aminosav funkció csoporton keresztül kapcsolhatjuk az antitest fragmentumra, például bármilyen szabad amino-, imino-, hidroxil- vagy karboxilcsoporton keresztül.

A fent leírt polimer-módosított antitest fragmentumok előállításához kiindulási anyagként aktivált polimert használhatunk. Aktivált polimer lehet minden olyan polimer, amely tartalmaz reaktív tiolcsoportot, ilyen például egy α -halogén-karbonsav vagy észter, például jód-acetamid, egy imid, például maleinsavimid,

egy vinil-szulfon vagy egy diszulfid. Az ilyen kiindulási anyagok a kereskedelemben kaphatók (például a Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL., USA cégtől beszerezhetők) vagy előállíthatók a kereskedelemről beszerezhető kiindulási anyagokból, hagyományos kémiai eljárások alkalmazásával.

Polietilénglikol (PEG) csoportok kapcsolásával kapcsolatban megemlíjük a következő kiadványokat: „Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Application”, szerk.: J. Milton Harsis, Plenum Press, New York (1992); „Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications”, szerk.: J. Milton Harsis és S. Zalipsky, American Chemical Society, Washington DC. (1997); „Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences”, M. Aslam and A. Dent, Grove Publishers, New York (1998).

Amennyiben az a kívánatos, hogy effektor vagy riporter molekulához kötött antitest fragmentumot kapjunk, ezt standard kémiai vagy rekombináns DNS eljárásokkal állíthatjuk elő úgy, hogy az antitest fragmentumot vagy közvetlenül kötjük az effektor vagy riporter molekulához, vagy egy kapcsoló ágens útján, az aktivált polimerrel való reakció előtt vagy ezután, ahogy éppen helyénvaló. Speciális kémiai eljárások például azok, amelyeket a WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195 és WO 89/01476 nemzetközi közzétételi iratok ismertetnek. Vagy pedig ahol az effektor vagy riporter molekula protein vagy polipeptid, ott a kötés rekombináns DNS eljárásokkal valósítható meg, például úgy, ahogyan a WO 86/01533 és az EP-A-0392745 iratokban leírták.

A találmány szerinti módosított Fab fragmentum előnyösen PEGilezett [azaz PEG (polietilénglikol) kapcsolódik hozzá kovalens kötéssel] az EP-A-0948544 számú szabadalmi bejelentésben leírt módszer szerint. Előnyös, ha a találmány szerinti antitest molekula egy olyan PEGilezett módosított Fab fragmentum, amelyet a 13. ábra mutat be. Mint a 13. ábrából kitűnik, a módosított Fab fragmentum egy maleinsavimid csoportot tartalmaz kovalensen kötve egy egyetlen tiolcsoporthoz egy módosított csukló régióban. A maleinsavimid csoporthoz egy lizincsoport van kovalensen kapcsolódva. A lizincsoporton lévő minden egyes aminocsoporthoz egy metoxi-poli(etil)énglikol polimer kapcsolódik, amelynek körülbelül 20 000 D a molekulatömege. A teljes effektor molekula összmolekulatömege tehát körülbelül 40 000 D.

A 13. ábrán feltüntetett vegyületben előnyösen az antitest rész nehéz láncának a szekvenciáját a 115. számú szekvencia írja le, a könnyű lánc szekvenciáét a 113. számú szekvencia. Ezt a vegyületet itt CDP870-nek nevezzük.

A találmány szerinti antitest molekula konstans régió doménjeit – amennyiben ilyenek vannak – az antitest molekula tervezett funkcióját és főképpen effektor funkcióit – amelyekre szükség lehet – tekintetbe véve választjuk ki. Például: a konstans régió domének lehetnek humán IgA, IgD, IgE, IgG vagy IgM domének. Pontosabban, humán IgG konstans régió domének használhatók – főképpen az IgG1 és IgG3 izotípusok –, ha az antitest molekulát terápiás alkalmazásra szánjuk és antitest effektor funkciókra van szükség. Vagy pedig IgG2 és IgG4 izotípusokat használhatunk, ha az antitest molekulát terápiás célokra szánjuk és nincs szükség antitest effektor funkciókra, azaz egyszerűen csak TNF α aktivitás blokkolásra van szükség.

Tehát a találmány szerinti antitest molekulához egy effektor vagy egy riporter molekula kapcsolódhat. Ez például lehet egy kovalens híd-szerkezet révén hozzákapcsolt makrociklusos molekula nehézfématommal való kelát képzéshez, vagy egy toxin, mint a ricin. Alternatív megoldásként rekombináns DNS technológiai eljárásokat alkalmazhatunk olyan antitest molekula előállítására, amelyben egy teljes immunglobulin molekula Fc fragmentumát (CH₂, CH₃ és csukló domén), vagy a CH₂ és CH₃ domént vagy a CH₃ domént egy funkció nélküli nem-immunglobulin proteinnel – ilyen egy enzim vagy toxin molekula – helyettesítettük, vagy amelyhez peptid kötéssel ilyeneket hozzákapcsoltunk.

A találmány szerinti antitest molekula kötési affinitása előnyösen legalább $0,85 \times 10^{-10}$ M, előnyösebben legalább $0,75 \times 10^{-10}$ M és a legelőnyösebben legalább $0,5 \times 10^{-10}$ M. [Érdemes megjegyezni, hogy a találmány szerinti előnyös humanizált antitest molekulának – mint alább leírjuk – az affinitása körülbelül $0,5 \times 10^{-10}$ M, amely jobb, mint annak az egér monoklonális antitestnek az affinitása, amelyből származott. Az egér antitest affinitása körülbelül $0,85 \times 10^{-10}$ M].

A találmány szerinti antitest molekula előnyösen tartalmazza a hTNF40-gL1 könnyű lánc variábilis domént (8. számú szekvencia) és a gh3hTNF40.4 nehéz

lánc variábilis domént (11. számú szekvencia). Ezen könnyű és nehéz lánc variábilis domének szekvenciáit a 8., illetve 11. ábrán mutatjuk be.

A találmány szerinti antitest molekula olyan variánsait is ismertetjük, amelyeknek javított affinitása van a TNF α -hoz. Ilyen variánsokat számos affinitás érlelő eljárással állíthatunk elő, beleértve a CDR-ek mutagenizálását [Yang et al., *J. Mol. Biol.*, 254, 392-403 (1995)], a lánc átalakítást [Marks et al.: *Bio/Technology*, 10, 779-783 (1992)], az *E. coli* mutátor törzsének használatát [Low et al., *J. Mol. Biol.*, 250, 359-368 (1996)], A DNS átalakítást [Patten et al., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 724-733 (1997)], a fág display-t [Thompson et al., *J. Mol. Biol.*, 256, 77-88 (1996)] és a szexuális PCR-t [Cramer et al., *Nature*, 391, 288-291 (1998)]. Vaughan és munkatársai (lásd fentebb) is tárgyalják az affinitás érés ezen módszereit.

A találmány tárgyát képezi a találmány szerinti antitest molekula nehéz és/vagy könnyű láncát (láncait) kódoló DNS szekvencia is.

A DNS szekvencia kódolja előnyösen a találmány szerinti antitest molekula nehéz vagy könnyű láncát.

Egy előnyös kiviteli formában a DNS szekvencia könnyű láncot kódol, és tartalmazza a 8. számú szekvenciát (hTNF40-gL1) vagy ennek degenerált megfelelőjét.

Egy alternatív előnyös kiviteli formában a DNS szekvencia nehéz láncot kódol, és tartalmazza a 11. számú szekvenciát (gh3h TNF40.4) vagy ennek degenerált megfelelőjét.

A találmány szerinti DNS szekvencia tartalmazhat szintetikus DNS-t, például olyat, amelyet kémiai feldolgozás útján állítanak elő, továbbá cDNS-t, genomiális DNS-t vagy ezek bármilyen kombinációját.

A találmány olyan klónozó vagy expressziós vektorra is vonatkozik, amely egy vagy több találmány szerinti DNS szekvenciát tartalmaz. Előnyös, ha a klónozó vagy expressziós vektor két DNS szekvenciát tartalmaz, amelyek a találmány szerinti antitest molekula könnyű láncát, illetve nehéz láncát kódolják.

Olyan *E. coli* expressziós vektort is ismertetünk, amely tartalmaz találmány szerinti DNS szekvenciát. Az expressziós vektor lehet a pTTO(CDP870), amelynek sematikus képe a 22. ábrán látható.

Ismertetjük a 19. ábrán bemutatott pDNA_{Eng-G1} vektort is.

Az olyan általános módszerek, amelyekkel a vektorok megszerkeszthetők, továbbá a transzfekeciós módszerek és tenyésztési módszerek jól ismertek a szakterületen jártas szakemberek előtt. E tekintetben referenciának tekintjük a „Current Protocols in Molecular Biology” című kiadványt, szerk.: F.M. Ausubel, Wiley Interscience, New York (1999) és a Maniatis féle kézikönyvet, amelyet a Cold Spring Harbor Publishing cég adott ki.

A találmány szerinti antitest molekulát kódoló DNS szekvenciák olyan eljárásokkal állíthatók elő, amelyeket jól ismernek a szakterületen gyakorlott szakemberek. Például: az antitest nehéz és könnyű láncok részét vagy egészét kódoló DNS szekvenciák kívánság szerint vagy a meghatározott DNS szekvenciák vagy a megfelelő aminosavszekvenciák alapján szintetizálhatók.

Az akceptor framework-öt kódoló DNS szekvenciák a szakmában jártas szakembereknek messzemenően rendelkezésre állnak és könnyen szintetizálhatók ismert aminosavszekvenciák alapján.

A találmány szerinti antitest molekulát kódoló DNS szekvenciák előállítására a molekuláris biológia standard technikai alkalmazhatók. A kívánt DNS szekvenciák egészben szintetizálhatók vagy részletekben, oligonukleotid szintetizáló technikák alkalmazásával. Helyre irányuló mutagenézis és polimeráz lánc-reakció (PCR) technikák is alkalmazhatók, ahogy éppen helyénvalók.

A találmány szerinti antitest molekulát kódoló DNS szekvenciák kifejezésére bármilyen alkalmas gazdasejt/vektor rendszert alkalmazhatunk. Bakteriális – például *E. coli* – és más mikrobiális rendszereket alkalmazhatunk, részben antitest fragmentumok, ilyenek az Fab és F(ab')₂ fragmentumok és főképpen az Fv fragmentumok és egyláncú antitest fragmentumok, például egyláncú Fv-k expressziójához. Nagyobb antitest molekulák – beleértve a teljes antitest molekulákat – előállításához eukarióta, azaz emlős gazdasejt expressziós rendszereket alkalmazhatunk. Alkalmas emlős gazdasejtek közé tartoznak a CHO, mieloma vagy hibridoma sejtek.

A találmány egy találmány szerinti antitest molekula előállítására alkalmas eljárásra is vonatkozik, amelyben egy találmány szerinti vektort tartalmazó gazdasejtet olyan körülmények között tenyésztünk, amelyek alkalmasak arra,

hogy a találmány szerinti antitest molekulát kódoló DNS-ből a protein expresszióját ösztönözzék és izoláljuk az antitest molekulát.

Előnyös, ha a találmány szerinti antitest molekula előállítására szolgáló eljárásban olyan *E. coli* expressziós vektort tartalmazó *E. coli*-t tenyésztünk, amely tartalmazza a találmány szerinti DNS szekvenciát. A tenyésztést olyan körülmények között végezzük, amelyek alkalmasak arra, hogy a DNS szekvenciából a protein expresszióját ösztönözzék, majd izoláljuk az antitest molekulát. Az antitest molekula a sejtől szekretálódhat, vagy pedig megfelelő szignál szekvenciák révén a periplazmatikus térbe juthat. Más megoldásként az antitest molekulák összegyűlhetnek a sejtben belüli citoplazmában. Előnyös, ha az antitest molekula a periplazmatikus térbe jut. A termelendő antitest molekulától és az alkalmazott eljárástól függően ajánlatos, ha hagyjuk, hogy az antitest molekulák felgombolyodjanak és hogy funkciók konformációt vegyenek fel. Az antitest molekulák felgombolyodásához lehetőséget biztosító eljárásokat jól ismerik a szakterületen gyakorlattal rendelkező szakemberek.

Amennyiben az antitest molekula csak nehéz vagy könnyű lánc polipeptidet tartalmaz, ebben az esetben csak egy nehéz lánc vagy könnyű lánc polipeptidet kódoló szekvenciát kell használni a gazdasejtek transzfektálására. Olyan termékek előállításához, amelyek mind nehéz, mind könnyű láncot tartalmaznak, a sejtvonalat transzfektálhatjuk két vektorral, amikor is az egyik vektor egy könnyű lánc polipeptidet és a másik vektor egy nehéz lánc polipeptidet kódol. Alternatív megoldásként egyetlen vektort használhatunk, amennyiben a vektor könnyű lánc és nehéz lánc polipeptidet kódoló szekvenciákat tartalmaz.

A találmány olyan terápiás vagy diagnosztikai készítményre is vonatkozik, amely egy találmány szerinti antitest molekulát gyógyszerészetileg elfogadott töltőanyaggal, hígítószerezrel vagy vivőanyaggal együtt tartalmaz.

Olyan terápiás vagy diagnosztikai készítmény előállítására alkalmas eljárást is ismertetünk, amelyben a találmány szerinti antitest molekulát egy gyógyszerészetileg elfogadott töltőanyaggal, oldószerezrel vagy vivőanyaggal keverjük össze.

A terápiás vagy diagnosztikai készítményben az antitest molekula lehet az egyetlen aktív alkotórész, vagy pedig más aktív alkotórészekkel lehet együtt,

beleértve más antitest alkotórészeket, például anti-T sejt, anti-IFN γ vagy anti-LPS antitesteket, vagy nem antitest alkotórészeket, mint például xantinokat.

A gyógyszerkészítményeknek lehetőleg tartalmazniuk kell a találmány szerinti antitest terápiásan hatásos mennyiségét. A „terápiásan hatásos mennyiség”, ahogyan itt használjuk, egy terápiás hatóanyagból olyan mennyiséget jelent, amely a megcélzott betegség vagy állapot kezeléséhez, enyhítéséhez vagy megelőzéséhez szükséges vagy amely kimutatható terápiás vagy preventív hatást fejt ki. Minden antitestre nézve a terápiásan hatásos dózist először vagy sejt-tenyésztési vizsgálatokkal, vagy állat modellekben – rendszerint rágcsálókban, nyulakban, kutyákban, sertésekben vagy főemlősökben – becsülhetjük meg. Az állat modell arra is használható, hogy meghatározzuk a helyes koncentráció-tartományt és a beadás módját. Ezt az információt ezután felhasználhatjuk embereknél a használható dózisok és az alkalmazási módok meghatározásához.

Egy beteg embernél a pontos hatásos mennyiség a betegség súlyosságától, a beteg általános egészségi állapotától, korától, súlyától és a beteg nemétől függ, továbbá az alkalmazás rendjétől, idejétől és gyakoriságától, a gyógyszer kombináció(k)tól, a reakció fogékonyságtól és a terápiával szembeni toleranciától és a terápiára adott választól. Ez a mennyiség rutin kísérletezéssel megállapítható, és az orvos megítélése szabja meg. Egy hatásos dózis általában 0,01 – 50 mg/kg, előnyösen 0,1 – 20 mg/kg, előnyösebben körülbelül 15 mg/kg. Az alábbi példákban bemutatjuk, hogy 1,5 és 20 mg/kg dózisokat használtunk rheumatoid arthritisben szenvedő paciensek kezelésére.

A készítmények alkalmazhatók önállóan egy betegnél, vagy alkalmazhatjuk más hatóanyagokkal, gyógyszerekkel vagy hormonokkal kombinálva.

A találmány szerinti antitest molekula bevitelénél alkalmazott dózis a kezelendő állapot sajátosságától függ, továbbá attól, hogy a TNF α szintje milyen mértékig neutralizálendő, vagy mennyire emelendő egy kívánt szint fölé, és attól, hogy az antitest molekulát profilaktikusan alkalmazzuk-e vagy egy fennálló állapot kezelésére.

Igy például, amikor a termék egy krónikus gyulladós betegség – ilyen a rheumatoid arthritis – kezelését, vagy megelőzését szolgálja, a találmány szerinti antitest molekula megfelelő dózisa 0,5 és 50 mg/kg közé esik, előnyösebben 1 és

20 mg/kg közé, a legelőnyösebb dózis pedig körülbelül 15 mg/kg. Az adagolás gyakorisága az antitest molekula felezési idejétől és hatásának időtartamától függ.

Amennyiben az antitest molekulának rövid a felezési ideje (azaz 2-10 óra), szükség lehet naponta egy vagy több dózis beadására. Vagy pedig amennyiben az antitest molekulának hosszú a felezési ideje (azaz 2-15 nap), akkor csak naponta vagy hetente egyszer, sőt 1 vagy 2 hónaponként egyszer lenne szükséges beadni egy adagot.

A gyógyszerkészítmény gyógyszerészetileg elfogadott vivőanyagot is tartalmazhat az antitest alkalmazása céljából. Maga a vivőanyag nem indukálhat antitest termelést, amely káros arra az egyénre nézve, aki a készítményt kapja és nem lehet toxikus. Az alkalmas vivőanyagok lehetnek nagy, lassan metabolizálódó makromolekulák, mint a proteinek, polipeptidek, liposzómák, poliszacharidok, politejsavak, poliglikolsavak, polimer aminosavak, aminosav kopolimerek és inaktív vírus partikulák.

Használhatunk gyógyszerészetileg elfogadott sókat, például ásványi savak sóit, ilyenek a hidrokloridok, hidrobromidok, foszfátok és szulfátok, vagy szerves savak sóit, ilyenek az acetátok, propionátok, malonátok és benzoátok.

Terápiás készítményekben a gyógyszerészetileg elfogadott vivőanyagok tartalmazhatnak továbbá folyadékokat, például vizet, fiziológiás konyhasó oldatot, glicerint és etanolt. Ezenkívül az ilyen készítmények segédanyagokat, például nedvesítőszerket, emulgeálószerket vagy pH pufferoló anyagokat tartalmazhatnak. Ezek a vivőanyagok lehetővé teszik a gyógyszerkészítmények formulálását tablettákká, pirulákká, emulziókká (slussies) és szuszpenziókká, hogy a paciens be tudja venni ezeket.

Az alkalmazáshoz előnyös formák közé olyan formák tartoznak, amelyek alkalmasak a parenterális bevételhez, például injekcióval vagy infúzióval, így bolusz injekcióval vagy folyamatos infúzióval. Amennyiben injekciós vagy infúziós termékről van szó, ez lehet szuszpenzió, oldat vagy emulzió formában, olajos vagy vizes vivőanyagban és tartalmazhat formulálószerket, például szuszpendáló-, konzerváló-, stabilizáló- és/vagy diszpergálószerket. Az antitest molekula száraz formában is készülhet, megfelelő steril folyadékkal a használat előtti visszaoldáshoz.

Amint a találmány szerinti készítmények formulálása megtörtént, közvetlenül beadhatók a betegnek. A kezelendő betegek állatok is lehetnek. Azonban előnyösnek tartjuk, ha a készítményeket humán pacienseknél való alkalmazáshoz adaptáljuk.

A találmány szerinti gyógyszerkészítmények számos, tetszés szerinti módon alkalmazhatók, beleértve – de nem kizárólag – az orális, intravénás, intramuszkuláris, intraarteriális, intramedulláris, intratekális, intraventrikuláris, transzdermális, transzkután (lásd például: WO 98/20734), szubkután, intraperitoneális, intranazális, enterális, topikális, szublingvális, intravaginális vagy rektális alkalmazásokat. Hipospray-k szintén használhatók a találmány szerinti gyógyszerkészítmények alkalmazásához. A terápiás készítményeket általában injekcióhoz alkalmas készítmény formájában, akár folyékony oldat vagy szuszpenzió formában állítjuk elő. Szilárd formák is előállíthatók, amelyekből az injekció előtt folyékony vivőanyagban oldatok vagy szuszpenziók készíthetők.

A készítmények közvetlen beadását általában injekcióban, szubkután, intraperitoneálisan, intravénásan vagy intramuszkulárisan végezzük, vagy egy szövet intersticiális terébe visszük be a készítményeket. A készítményeket lézióba is bevihetjük. Az adagolással végzett kezelés egy adagos program vagy több adagos program szerint történhet.

Tisztában kell lenni azzal, hogy a készítményben lévő aktív alkotórész egy antitest molekula. Mint ilyen, degradációra hajlamos a gyomor-bél traktusban. Tehát ha a készítményt a gyomor-bél traktust használva kell beadni, a készítménynek olyan szereket kell tartalmaznia, amelyek megvédik az antitestet a degradációtól, de amelyekből felszabadul az antitest, mielőtt a gyomor-bél traktusból felszívódott.

A gyógyszerészetileg elfogadott vivőanyagokat mélyrehatóan tárgyalja a Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

Szándékunkban van az is, hogy a találmány szerinti antitest génterápia alkalmazásával beadható legyen. Ennek megvalósítása céljából az antitest molekula nehéz és könnyű láncát kódoló DNS szekvenciákat megfelelő DNS komponensek szabályozása alatt úgy visszük be egy paciensbe, hogy az antitest láncok a DNS szekvenciákból kifejeződjenek és in situ összeszerelődjenek.

Biztosíthatjuk a fentiekben leírt antitest molekulát TNF α által közvetített betegség kezelésében történő alkalmazásra.

Biztosíthatjuk a találmány szerinti antitest molekula alkalmazását is TNF α által közvetített betegség kezelésére alkalmazható gyógyszer előállításában.

A találmány szerinti antitest molekula bármilyen olyan terápiában hasznosítható, ahol az emberi vagy állati szervezetben lévő biológiailag aktív TNF α szintjének a csökkentése kívánatos. A TNF α keringhet a szervezetben vagy nem kívánatos magas szintben jelen lehet a szervezet egy speciális helyére lokalizálva.

A TNF α emelkedett szintjei kísérik például az akut és krónikus immun- és immunregulációs rendellenességeket, a fertőzéseket, beleértve a szeptikus, endotoxikus és kardiovaszkuláris sokkot, a neurodegeneratív betegségeket, rosszindulatú betegségeket és az alkohol által indukált hepatitiszt. A TNF α emelkedett szintjeivel társult több rendellenességet részletesen tárgyal az US-A-5 919 452 számú szabadalmi bejelentés. A találmány szerinti antitest molekula a TNF α közvetített betegségek terápiájában hasznosítható. Jelentős betegségek, amelyek a találmány szerinti antitest molekulával kezelhetők, például a következők: szepszis, szívszélhűdés, szeptikus vagy endotoxikus sokk, cachexia, felnőttkori respirációs distressz szindróma, AIDS, allergiák, pszoriázis, TB, gyulladásos csontrendellenességek, véralvadási rendellenességek, égések, szerv- és szövetátültetés utáni kilökődési epizódok, Crohn betegség és autoimmun betegségek, mint a thyroiditis és a rheumatoid és osteoarthritis.

Az antitest molekula vagy készítmény ezenkívül a daganatos betegségek folyamán TNF α képződéssel társult mellékhatások csökkentésére használható, használható továbbá graft kilökődés anti-limfocita antitesttel végzett kezelésével vagy megelőzésével társult sokkhoz hasonló szindrómák kiküszöbölésére vagy csökkentésére; vagy több szervet érintő elégtelenség (multi-organ failure) kezelésére.

A találmány szerinti antitest molekulát előnyösen rheumatoid vagy osteoarthritis, Crohn-betegség vagy pszoriázis kezelésére használjuk.

Eljárást is ismertetünk olyan beteg emberek vagy állatok kezelésére, akik, illetve amelyek TNF α által közvetített rendellenességben szenvednek, vagy náluk

ennek kockázata áll fenn. Az eljárás tartalmazza, hogy a betegnek a találmány szerinti antitest molekula hatásos mennyiségét adjuk be.

A találmány szerinti antitest molekulát felhasználhatjuk diagnózisra, például in vivo diagnózisra és arra, hogy képet kapjunk olyan betegségi állapotokról, amelyekben a TNF α emelkedett szintjei vannak jelen.

Ismertetünk olyan hibrid CDR-t tartalmazó antitest molekulát is, amely csonka donor CDR szekvenciát tartalmaz, amelyben a csonka donor CDR hiányzó részét egy más szekvenciával helyettesítettük és ezzel működőképes CDR-t képeztünk. A „hibrid CDR” kifejezés – ahogyan itt használjuk – egy olyan donor CDR-t tartalmazó CDR-t jelent, amelyet egy vagy több pozícionál megcsonkítottunk, például vagy egyik vagy mindkét végén. A csonka donor CDR hiányzó részét egy más szekvenciával úgy helyettesítettük, hogy teljes és működőképes CDR-t kapjunk. A hibrid CDR-ben legalább egy aminosav cseréje valósul meg a teljes donor CDR-hez viszonyítva. A CDR csonkított részét helyettesítő szekvencia bármilyen szekvencia lehet. Előnyös, ha a CDR szekvencia nem-donor része abból az antitestből származik, amelyből az antitest molekula framework régiói származnak, ilyen egy csíravonal antitest szekvencia.

Azt találtuk, hogy a hibrid CDR-t tartalmazó antitest molekulák ugyanazt a kötési affinitást tartják meg, mint amivel egy komplett donor CDR-eket tartalmazó antitest molekula rendelkezik. A „lényegében azonos kötési affinitás” kifejezés – ahogyan itt használjuk – a teljes donor CDR-eket tartalmazó megfelelő antitest molekula kötési affinitásának legalább 70 %-át jelenti. Mint fent megjegyeztük, bizonyos esetekben a találmány szerinti antitest affinitása nagyobb lehet, mint a donor antitesté. A hibrid CDR használata a következő előnyöket nyújtja: csökkenti az antitest molekulában lévő idegen (azaz donor) szekvencia mennyiségét és növelheti az antitest molekula kötési affinitását, összehasonlítva a teljes donor CDR-eket tartalmazó megfelelő antitest molekulával.

Az antitest molekula bármely CDR-je lehet hibrid. Előnyös, ha az antitest molekulában a nehéz lánc CDR2-je hibrid.

A donor CDR csonkítása előnyösen 1-8 aminosavra, előnyösebben 4-6 aminosavra terjed ki. Előnyös továbbá, ha a csonkítást a CDR C-terminális végén végezzük.

A CDR csonkított részének szekvenciájától és a hiányzó részt helyettesítő más szekvencia szekvenciájától függően több aminosavat lehet cserélni. Előnyös, ha legalább 2 aminosavat cserélünk ki, előnyösebben legalább 3 aminosavat cserélünk ki és a legelőnyösebb, ha 4 aminosavat cserélünk ki.

Egy speciális kiviteli formában az antitest az itt leírt első alaknak felel meg, amikor is az antitestben a nehéz láncban lévő második CDR szekvenciáját a 2. számú szekvencia írja le. Ennek jobb az affinitása antigénjéhez, mint azé a donor antitesté, amelyből a CDR rész származott.

Ismertetünk olyan nukleinsavszekvenciát is, amely a találmány szerinti hibrid CDR-t tartalmazó antitest molekulát kódolja.

Ismertetünk olyan nukleinsav szekvenciát tartalmazó expressziós vektort is, amely a hibrid CDR-t tartalmazó találmány szerinti antitest molekulát kódolja.

A találmány tárgyát képezi a találmány szerinti vektorral transzformált gazdasejt is.

Ismertetünk egy hibrid CDR-t tartalmazó antitest molekula előállítására szolgáló eljárást is, amelyben a találmány szerinti gazdasejtet tenyésztjük, majd izoláljuk az antitest molekulát.

A találmányt a továbbiakban az alább leírt példákkal szemléltetjük, amelyekben a csatolt ábrákra hivatkozunk.

Az 1. ábra az 1-es alcsoportba tartozó humán könnyű lánc framework régióit mutatja a hTNF40 könnyű lánc framework régióival összehasonlítva (83-90. számú szekvenciák).

A 2. ábra az 1-es alcsoportba és 3-as alcsoportba tartozó humán nehéz lánc framework régiókat mutatja a hTNF40 nehéz lánc framework régióival összehasonlítva (91-98. számú szekvenciák és 106-109. számú szekvenciák).

A 3. ábra a hTNF40 CDR-ek aminosavszekvenciáit (1-7. számú szekvenciák) mutatja, amelyekben a CDR H2' olyan hibrid CDR, amelyben a C-terminális hat aminosav a humán 3-as alcsoportú csírvonal antitest H2 CDR szekvenciájából származik. A hibridizációból származó aminosav cseréket a szekvenciában aláhúztuk.

A 4. ábra a pMR15.1 vektort mutatja.

Az 5. ábra a pMR14 vektort mutatja.

A 6. ábra az egér hTNF40VI nukleotid szekvenciáját és előrelátható aminosav szekvenciáját mutatja (99. számú szekvencia).

A 7. ábra az egér hTNF40Vh nukleotid szekvenciáját és előrelátható aminosav szekvenciáját mutatja (100. számú szekvencia).

A 8. ábra a hTNF40-gL1 nukleotid szekvenciáját és előrelátható aminosav szekvenciáját mutatja (8. számú szekvencia).

A 9. ábra a hTNF40-gL2 nukleotid szekvenciáját és előrelátható aminosav szekvenciáját mutatja (9. számú szekvencia).

A 10. ábra a gh¹hTNF40.4 nukleotid szekvenciáját és előrelátható aminosav szekvenciáját mutatja (10. számú szekvencia).

A 11. ábra a gh³hTNF40.4 nukleotid szekvenciáját és előrelátható aminosav szekvenciáját mutatja (11. számú szekvencia).

A 12. ábra a CTIL5-gL6 vektort mutatja.

A 13. ábra a CDP870 nevű vegyület szerkezetét mutatja, amely a hTNF40 antitestből származó módosított Fab fragmentumot tartalmazza. Ez egy cisztein-csoporton keresztül kovalens kötéssel egy lizil-maleinsavimid linkerhez van kötve, ahol a lizilcsoporton lévő minden aminocsoporthoz egy metoxi-PEG csoport – amelyben n körülbelül 420 – kapcsolódik.

A 14. ábra a pTTQ9 vektort mutatja.

A 15. ábra az OmpA oligonukleotid adapter szekvenciáját mutatja (101. számú szekvencia).

A 16. ábra a pACYC 184 vektort mutatja.

A 17. ábra a pTTO-1 vektort mutatja.

A 18. ábra a pTTO-2 vektort mutatja.

A 19. ábra a pDNAbEng vektort mutatja.

A 20. ábra a különböző intergenikus szekvenciákat kódoló oligonukleotid kazettákat mutatja E. coli módosított Fab expresszióhoz (102-105. számú szekvenciák).

A 21. ábra az IGS (intergenikus szekvencia) variánsok módosított Fab periplazmatikus akkumulációját mutatja.

A 22. ábra a pTTO (CP870) vektort mutatja.

A 23. ábra a betegség aktivitás pontszámát (disease activity score = DAS) mutatja a különböző dózisú CDP870-nel és a placebo-val kezelt betegekben. A kapott középértékeket és IQ tartományokat ismertetjük a protokollonkénti populációnál, ahol az utolsó megfigyelésig végeztük a vizsgálatokat. A kis négyszögek jelentése: placebo, a rombuszok 1 mg/kg-ot, a háromszögek 5 mg/kg-ot és a nagy négyszögek 20 mg/kg-ot jelentenek.

A 24. ábra a puha ízületek számát, a duzzadt ízületek számát, a fájdalom pontszámát, a kiértékelők által a betegség aktivitásra adott összevont értékelést, a módosított egészség értékelési kérdőívet (health assessment questionnaire = HAQ), a C reaktív proteint (CRP) és a vörösvérsejt ülepedési sebességet (ESR = erythrocyte sedimentation rate) ábrázolja a CDP870 különböző dózisaival és a placebo-val kezelt pacienseknél. A kapott középértékeket és IQ tartományokat ismertetjük a protokollonkénti populációnál, ahol az utolsó megfigyelésig végeztük a vizsgálatokat. A kis négyszögek jelentése: placebo, a rombuszok 1 mg/kg-ot, a háromszögek 5 mg/kg-ot és a nagy négyszögek 20 mg/kg-ot jelentenek.

Példák

Kiméra hTNF40 antitest molekula gén klónozása és expressziója

RNS előállítása hTNF40 hibridoma sejtekből

Össz RNS-t állítottunk elő 3×10^7 hTNF40 hibridoma sejtekből, mint alább leírjuk. A sejteket fiziológiás konyhasó-oldatban mostuk és RNázol-ban ($0,2 \text{ ml}/10^6$ sejt) oldottuk. Kloroformot adtunk hozzá ($0,2 \text{ ml}/2 \text{ ml}$ homogenizátum), a keveréket erőteljesen ráztuk 15 másodpercig, ezután 15 percig jégen tartottuk. A keletkezett vizes és szerves oldószeres fázist Eppendorf centrifugában 15 perces centrifugálással elválasztottuk, majd az RNS-t a vizes fázisból kicsaptuk azonos térfogatú izopropanol hozzáadásával. Miután az elegy 15 percig állt jégen, az RNS-t centrifugálással ülepitettük, 70 %-os etanollal mostuk, szárítottuk, steril, RNáz mentes vízben mostuk. Az RNS kitermelés $400 \mu\text{g}$ volt.

A hTNF40 Vh és VI PCR klónozása

A hTNF40 nehéz és könnyű láncok variábilis doméneit kódoló cDNS szekvenciákat reverz transzkriptáz használatával szintetizáltuk az össz RNS-ben jelenlévő mRNS egyszálú cDNS másolatainak előállítására céljából, ezt követte a cDNS-ek polimeráz lánc reakcióval (PCR-rel) való sokszorozása specifikus oligonukleotid primerek alkalmazásával.

a) cDNS szintézis

A cDNS-t 20 µl reakciótérfogatban szintetizáltuk, amely a következő reagenseket tartalmazta: 50 mM trisz.HCl, pH 8,3, 75 mM kálium-klorid, 10 mM ditiotritol, 3 mM magnézium-klorid, 0,5-05 mM a dezoxiribonukleozid trifoszfátokból, 20 egység RNAsin, 75 ng random hexanukleotid primer, 2 µg hTNF40 RNS és 200 egység Moloney Murine Leukemia Virus reverz transzkriptáz. A reakcióelegyet 42 °C-on 60 percig inkubáltuk, majd a reakciót 5 percig 95 °C-on való melegítéssel állítottuk le.

b) PCR

A cDNS részleteivel PCR-t végeztünk nehéz és könnyű láncra specifikus primerek kombinációinak alkalmazásával. A nehéz és könnyű láncokhoz való 5' primerek nukleotid szekvenciáit az 1., illetve 2. táblázatban mutatjuk be. Mindegyik ilyen szekvencia – sorrendben – a következőket tartalmazza: egy restrikciós helyet, amely 5' végeiktől 7 nukleotid távolságra kezdődik, a GCCGCCACC szekvenciát (12. számú szekvencia), hogy a kapott mRNS-ek optimális transzlációját lehetővé tegye, egy iniciációs kodont, és 20-30 olyan nukleotidot, amelyek ismert egér antitestek vezér peptid szekvenciáin alapulnak (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5. kiadás, 1991, U.S Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health).

A 3' primereket a 3. táblázat mutatja. A könnyű lánc primer az antitest J-C junkcióját fogja át és az S_{pl}I enzím számára egy restrikciós helyet tartalmaz, hogy megkönnyítse a VL PCR fragmentum klónozását. A nehéz lánc 3' primerek keveréket alkotnak, amelyet arra szántunk, hogy az antitest J-C junkcióját fogja át. A 3' primer egy Apal restrikciós helyet tartalmaz a klónozás megkönnyítésére. A primerek 3' régiója kevert szekvenciát tartalmaz, amely ismert egér antitestekben talált 3' szekvenciákon alapul (Kabat et al., lásd fentebb).

A primerek fent leírt kombinációi lehetővé teszik, hogy a V_h és V_l PCR termékeket közvetlenül a megfelelő expressziós vektorba (lásd alább) klónozzuk be kiméra (egér-humán) nehéz és könnyű láncok előállítására céljából és hogy ezeket a géneket emlős sejtekben fejezzük ki a kívánt izotípusú kiméra antitestek előállítására céljából.

A PCR inkubációkat (100 µl) a következőképpen indítottuk. Minden reakció 10 mM trisz.HCl-t (pH 8,3), 1,5 mM magnézium-kloridot, 50 mM kálium-kloridot, 0,01 tömeg/térf.% zselatint, 0,25-0,25 mM-t a dezoxiribonukleozid-trifoszfátokból, 10 pM 5' primer mix-et (4. táblázat), 10 pM 3' primert [CL12 (könnyű lánc) vagy R2155 (nehéz lánc) (3. táblázat)], 1 µl cDNS-t és 1 egység Taq polimerázt tartalmazott. A reakcióelegyet 95 °C-on 5 percig inkubáltuk, majd ciklusonként a következő hőmérsékleteket és időket alkalmaztuk: 94 °C 1 percig, 55 °C 1 percig és 72 °C 1 percig. Harminc ciklus után az egyes reakcióelegyek részleteit agaróz gélben elektroforézissel analizáltuk. Az 1-es, 2-es és 7-es könnyű lánc poolokból való 5' primer keverékeket tartalmazó könnyű lánc reakciókból kapott sávok olyan méreteknél feleltek meg, amelyek a teljes hosszúságú V_l fragmentumokkal egyeztek, míg a 3-as nehéz lánc reakció poolal végzett reakcióból olyan fragmentumot kaptunk, amelynek a mérete egy V_h génre várt méret volt. Az 1-es könnyű lánc pool primerek által produkált sávot nem követtük, mivel előzetes eredmények azt mutatták, hogy ez a sáv a hibridoma sejt által termelt könnyű lánc pszeudogénnek felel meg. A 7-es könnyű lánc pool primerek által produkált sáv gyengébb volt, mint a 2-es pool primerekből kapott sáv és ezért nem követtük. Csak a 2-es könnyű lánc reakció pool-ból kapott sávot – amely a legerősebb sávot adta – követtük.

c) A PCR fragmentumok molekuláris klónozása

A 2-es könnyű lánc reakció poolban kapott DNS fragmentumokat BstBI és SphI enzimmel emésztettük, etanolos kicsapással betöményítettük, 1,4 %-os agaróz gélben elektroforetizáltuk és a 400 bázis pár tartományban lévő DNS sávokat izoláltuk. Ezeket a BstBI-gyel és SphI-gyel hasított pMR15.1 vektorba (4. ábra) való ligálással klónoztuk. Ligálás után a keverékekkel *E. coli* LM 1035 sejteket transzformáltunk és a kapott baktériumtelepekből származó plazmidokat BstBI-gyel és SphI-gyel való emésztéssel inszertumokra szűrtük. Az egyes ligálásokból származó inszertumok mintáit tovább analizáltuk nukleotid szekvenálással.

A 3-as nehéz lánc reakció poolban kapott DNS fragmentumokat – hasonló módon – Hind III-mal és ApaI-gyel emésztettük, és HindIII-mal és ApaI-gyel hasított pMR14 vektorba (5. ábra) klónoztuk be. Az inszertumokat tartalmazó reprezentatív plazmidokat szintén nukleotid szekvenálással analizáltuk.

d) Nukleotid szekvencia analízis

Nagyszámú Vh inszertumot tartalmazó izolátumból plazmid DNS-t szekvenáltunk az R1053 primer (lásd az 5. táblázatot) (amely a pMR14-ben a HCMV promotor 3' régiójában hat) és az R720 primer (lásd az 5. táblázatot) (amely a humán C-gamma 4 5' régiójában hat és lehetővé teszi pMR14-en a DNS inszertum szekvenálását elejétől végig) alkalmazásával. Azt találtuk, hogy a Vh inszertum nukleotid szekvenciák számos klónban azonosak voltak, a szignál peptidben és a J régiókban lévő különbségek kivételével. Ez azt jelentette, hogy a vizsgált klónok független izolátumok, amelyek a PCR lépés folyamán a különböző primerek használata következtében az oligonukleotid keverékekből keletkeztek. A hTNF40 (hTNF40Vh) antitest nehéz lánc variábilis domén meghatározott nukleinsav szekvenciáját és előrelátható aminosavszekvenciáját a 7. ábrán mutatjuk be (100. számú szekvencia).

A könnyű lánc klónok analízise céljából megvizsgáltuk az R1053 primer (lásd az 5. táblázatot) és R684 primer (62. számú szekvencia) (amely a humán C-

kappa 5' régiójában hat és lehetővé teszi pMR15.1-en a DNS inszertum szekvenálását elejétől végig) használatával kapott szekvenciát. Hasonló módon analizáltuk a 2-es poolban lefolyt reakciókból keletkezett VI gének nukleotid szekvenciáját és az előrelátható aminosav szekvenciát. Megint azt találtuk, hogy a VI inszertum nukleotid szekvenciák számos klónban azonosak voltak, kivéve a szignál peptidben és J régiókban, ami azt jelenti, hogy a vizsgált klónok független izolátumok, amelyek a PCR lépés folyamán használt oligonukleotid keverékből keletkeztek a különböző primerek alkalmazása következtében. A hTNF40 (hTNF40V) antitest könnyű lánc variábilis domén meghatározott nukleinsav szekvenciáját és előrelátható aminosav szekvenciáját a 6. ábrán mutatjuk be (99. számú szekvencia).

1. táblázat

Oligonukleotid primerek egér nehéz láncok 5' régiójához

CH1 : 5'ATGAAATGCAGCTGGGTCAT(G,C)TTCTT3' (13. számú szekvencia)

CH2 : 5'ATGGGATGGAGCT(A,G)TATCAT(C,G)(C,T)TCTT3' (14. számú szekvencia)

CH3 : 5'ATGAAG(A,T)TGTGGTTAAACTGGGTTTT3' (15. számú szekvencia)

CH4 : 5'ATG(G,A)ACTTTGGG(T,C)TCAGCTTG(G,A)T3' (16. számú szekvencia)

CH5 : 5'ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTZTT3' (17. számú szekvencia)

CH6 : 5'ATGGCTGTC(C,T)T(G,A)G(G,C)GCT(G,A)CTCTTCTG3' (18. számú szekvencia)

CH7 : 5'ATGG(G,A)ATGGAGC(G,T)GG(G,A)TCTTT(A,C)TCTT3' (19. számú szekvencia)

CH8 : 5'ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG3' (20. számú szekvencia)

CH9 : 5'ATGG(C,A)TTGGGTGTGGA(A,C)CTTGCTATT3' (21. számú szekvencia)

CH10 : 5'ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCT3' (22. számú szekvencia)

CH11 : 5'ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG3' (23. számú szekvencia)

CH12 : 5' ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCT3' (24. számú szekvencia)

Mindegyik fenti primer 5' végéhez hozzáadódik az 5'GCGCGCAAGCTTGCCGCCACC-3' (25. számú szekvencia).

2. táblázat

Oligonukleotid primerek egér könnyű láncok 5' régiójához

CL1 : 5'ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT3' (26. számú szekvencia)

CL2 : 5'ATGGAG(T,A)CAGACACACTCCTG(T,C)TATGGGT3' (27. számú szekvencia)

CL3 : 5'ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCT3' (28. számú szekvencia)

CL4 : 5'ATGAGG(G,A)CCCCTGCTCAG(A,T)TT(C,T)TTGG3' (29. számú szekvencia)

CL5 : 5'ATGGATTT(T,A)CAGGTGCAGATT(T,A)TCAGCTT3' (30. számú szekvencia)

CL5A : 5'ATGGATTT(T,A)CA(A,G)GTGCAGATT(T,A)TCAGCTT3' (31. számú szekvencia)

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' (32. számú szekvencia)

CL7 : 5'ATGGGC(T,A)TCAAGATGGAGTCACA3' (33. számú szekvencia)

CL8 : 5'ATGTGGGGA(T,C)CT(G,T)TTT(T,C)C(A,C)(A,C)TTTTCAAT3' (34. számú szekvencia)

CL9 : 5'ATGGT(G,A)TCC(T,A)CA(G,C)CTCAGTTCCTT3' (35. számú szekvencia)

CL10 : 5'ATGTATATATGTTTGTGCTATTTC3' (36. számú szekvencia)

CL11 : 5'ATGGAAGCCOCAGCTCAGCTTCTCTT3' (37. számú szekvencia)

CL12A : 5'ATG(A,G)AGT(T,C)(A,T)CAGACCCAGGTCTT(T,C)(A,G)T3' (38. számú szekvencia)

CL12B : 5'ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGT3' (39. számú szekvencia)

CL13 : 5'ATGGATTACAGGCCAGGTTCTTAT3' (40. számú szekvencia)

CL14 : 5'ATGATGAGTCCTGCCAGTTCCTGTT3' (41. számú szekvencia)

CL15 : 5'ATGAATTTGCCTGTTTCATCTCTTGGTGCT3' (42. számú szekvencia)

CL16 : 5'ATGGATTTCAATTGGTCCTCATCTCCTT3' (43. számú szekvencia)

CL17A : 5'ATGAGGTGCCTA(A,G)CT(C,G)AGTTCCTG(A,G)G3' (44. számú szekvencia)

CL17B : 5'ATGAAGTACTCTGCTCAGTTTCTAGG3' (45. számú szekvencia)

CL17C : 5'ATGAGGCATTCTCTTCAATTCTTGGG3' (46. számú szekvencia)

Mindegyik fenti primer 5' végéhez hozzáadódik az 5'-GGACTGTTCTGAAGCCGCCACC-3' (47. számú szekvencia)

3. táblázat

Oligonukleotid primerek egér Vh és VI gének 3' végéhez

Könnyű lánc (CL12):

5'-GGATACAGTTGGTGCAGCATCCGTACGTTT-3' (48. számú szekvencia)

Nehéz lánc (R2155):

5'-GCAGATGGGCCCTTCGTTGAGGCTG(A,C)(A,G)GAGAC(G,T,A)GTGA-3' (49. számú szekvencia)

4. táblázat

a) 5' Primer keverékek könnyű lánc PCR reakciókhoz

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

b) 5' Primer keverékek nehéz lánc PCR reakciókhoz

- 1. pool: CH1, CH2, CH3, CH4.
- 2. pool: CH5, CH6, CH7, CH8.

3. pool: CH9, CH10, CH11, CH12.

5. táblázat

Nukleotid szekvencia analízisben használt primerek

R1053: 5'-GCTGACAGACTAACAGACTGTTCC3' (50. számú szekvencia)

R720: 5'-GCTCTCGGAGGTGCTCCT3' (51. számú szekvencia)

Kiméra gének aktivitásának kiértékelése

A kiméra gének aktivitását úgy értékeltük ki, hogy emlős sejtekben való kifejezésük után az újonnan szintetizálódott antitesteket tisztítottuk és mértük. A metodikát az alábbiakban írjuk le, ezt követi az antitestek biológiai vizsgálatához alkalmazott biokémiai és sejt alapú assay-k leírása.

a) Kiméra hTNF40 antitest molekula előállítás

Biológiai kiértékeléshez a kiméra antitestet a megfelelő nehéz és könnyű lánc párok kínai hörcsög petefészek (CHO) sejtekbe való kotranszfekeciója – kalcium-foszfát precipitációt alkalmazva – után tranziens expresszióval állítottuk elő.

A transzfekeció előtti napon CHO-L761 sejtek félig összefolyt palackjait tripszínnel kezeltük, a sejteket számláltuk és T75 palackokat készítettünk egyenként 10^7 sejtrel.

A következő napon a transzfekeció előtt 3 órával lecseréltük a táptalajt. Transzfekecióhoz a kalcium-foszfát precipitátumot a következőképpen készítettük: a nehéz és a könnyű lánc expressziós vektorból 50-50 µg-ot tartalmazó 0,25 M kalcium-klorid 1,25 ml-ét 1,25 ml 2 x HBS-sel (16,36 g NaCl, 11,0 g HEPES és 0,4 g Na_2HPO_4 1 liter vízben oldva; a pH 7,1-re beállítva NaOH-val) kevertük össze és rögtön hozzáadtuk a sejtek táptalajához. Miután 3 órán át 37 °C-on CO_2 inkubátorban tartottuk a reakcióelegyet, a táptalajt és a precipitátumot eltávolítottuk és a sejteket 15 ml 15 %-os glicerin – foszfáttal pufferolt konyhasó

oldatban (PBS) – hozzáadásával sokkoltuk 1 percig. A glicerint eltávolítottuk, a sejteket egyszer mostuk PBS-sel és 48-96 órán át inkubáltuk 25 ml 10 mM nátrium-butirátot tartalmazó táptalajban. Az antitestet a táptalajból tisztítható protein A-Sepharose-ra való kötéssel, majd leoldással.

b) ELISA

ELISA módszerhez Nunc ELISA lemezeket fedtünk egy éjszakán át 4 °C-on egy poliklonális kecske antihumán Fc fragmentum specifikus antitest F(ab)₂ fragmentumával (Jackson Immunoresearch, kód: 109-006-098), fedő pufferben (15 mM nátrium-karbonát, 35 mM nátrium-hidrogén-karbonát, pH 6,9) 5 µg/ml koncentráció mellett. A kötetlen antitest eltávolítása céljából desztillált vízzel ötször mostuk a lemezeket. A vizsgálandó mintákat és tisztított standardokat körülbelül 1 µg/ml-re hígítottuk konjugáló pufferrel (0,1 M trisz.HCl pH 7,0 0,1 M nátrium-klorid, 0,2 térfogat% Tween 20, 0,2 tömeg/térfogat% Hammersten kazein). A mintákból a mikrotitráló lemezek tartályaiba kétszeres hígításokat mértünk be úgy, hogy minden tartályban 0,1 ml legyen a végső mennyiség és a lemezeket szobahőmérsékleten 1 óra hosszat inkubáltuk rázással. Az első inkubációs lépés után a lemezeket 10-szer mostuk desztillált vízzel, ezután 0,1 ml peroxidázzal konjugált egér monoklonális anti-humán kappá (GD12 klón) antitesttel (The Binding Site, kód: MP135) – 1:700 hígítás konjugáló pufferben – inkubáltuk 1 órán át. A lemezeket újból mostuk és minden tartályhoz 0,1 ml szubsztrátum oldatot adtunk. A szubsztrátum oldat 150 µl N,N,N,N-tetrametil-benzidint (10 mg/ml DMSO), 150 µl hidrogén-peroxidot (30 %-os oldat) tartalmazott 10 ml 0,1 M nátrium-acetát/nátrium-citrát oldatban (pH 6,0). A lemez kifejlesztését 5-10 percig végeztük, amíg 630 nm-en az abszorpció el nem érte a körülbelül 1,0 értéket a top standardra. Lemez leolvasó segítségével mértük 630 nm-nél az abszorpciót és a minta koncentrációját a titrációs görbéknek a standard görbékhez való hasonlítása révén határoztuk meg.

c) Affinitás konstansok meghatározása BioCore analízissel

A hTNF40 és a humán TNF közötti kötési kölcsönhatást BIA technológiával vizsgáltuk. Egy hTNF40 konstans régiója elleni, affinitás-tisztított kecske poliklonális antitestet immobilizáltunk dextrán polimer szenzor csip felületre standard NHS/EDC kémiai eljárással. A hTNF40 viszonylag alacsony szintjeit (200-500 RU) fogtuk be, hogy biztosítsuk a tömeg transzport hatások minimalizálását. Különböző koncentrációjú humán TNF-et vittünk át a befogott hTNF40-en, hogy lehetővé tegyük az asszociációs kinetika meghatározását. A ligandum injekciója után, puffert engedtünk át a felületen, hogy mérhessük a disszociációt. A szilárd fázisú hTNF40 és a humán TNF közötti kölcsönhatásra kiszámítottuk az asszociációs és disszociációs sebességi konstansokat és levezettünk egy K_D értéket.

1. példa

A hTNF40 CDR-beültetése

A fentiekben leírtuk a hTNF40 antitest nehéz és könnyű lánc variábilis régiók génjeinek molekuláris klónozását és alkalmazásukat kiméra (egér-humán) hTNF40 antitestek termelésére. Az egér hTNF40 V_I és V_H nukleotid és aminosav szekvenciákat a 6., illetve a 7. ábra (99. számú és 100. számú szekvencia) mutatja be. Ebben a példában a hTNF40 antitest CDR-beültetését írjuk le.

A hTNF40 könnyű lánc CDR beültetése

A hTNF40 könnyű lánc framework régióinak és a négy humán könnyű lánc alcsoport megfelelő régióinak egymáshoz igazítása (Kabat et al., 1991, supra) felfedte, hogy a hTNF40 leginkább azokkal az antitestekkel volt homológ, amelyek a humán könnyű lánc 1-es alcsoportba tartoznak. Közvetkezésképpen a CDR-beültetett könnyű lánc szerkesztéséhez választott framework régiók a humán 1-es csoportú konszenzus szekvencia framework régióinak feleltek meg.

Az egér hTNF40 framework régiók aminosav szekvenciáinak és a konszenzus humán 1-es csoportú könnyű láncoknak az összehasonlítása az 1. ábrán látható, amely mutatja, hogy 22 különbözőség (aláhúzva) van a két

szekvencia között. Analizáltuk, hogy ezek közül a framework különbözőségeik közül bármelyik hozzájárul-e az antigénkötéshez. Két vizsgálandó csoportot azonosítottunk; ezek a 46. és 60. pozíciók voltak. Ennek az analízisnek az alapján a CDR-beültetett könnyű lánc két változatát szerkesztettük meg. Az egyikben – hTNF40-gL1 (8. számú szekvencia) – a 46. és 60. csoport a hTNF40 könnyű láncból származott, míg a másodikban – hTNF40-gL2 (9. számú szekvencia) – minden csoport általánosan elfogadott (konszenzus) humán csoport volt, kivéve a 60-as számú csoportot, amely a hTNF40 könnyű láncból származott.

CDR-beültetett hTNF40-gL1 könnyű lánc szerkesztése

A hTNF40-gL1 szerkesztését alább részletesen ismertetjük. A következő átfedő oligonukleotidokat (P7982-P7986) használtuk a polimeráz láncreakcióban (PCR) a csonkított beültetett könnyű lánc összeszerelésére. Az összeszerelt fragmentumból hiányzik az antitest vezérszekvencia és a framework 1 első 17 aminosava.

oligo 1 P7982:

5' GAATTCAGGGTCACCATCACTTGTAAGCCAGTCAGAACGTAGG
TACTAAC GTAGCCTGGTATCAGCAAA3' (52. számú szekvencia)

oligo 2 P7983:

5' ATAGAGGAAAGAGGCACTGTAGATGAGGGCTTTTGGGGCTTTA
CCTGGTTTTTGCTGATACCAGGCTACGT3' (53. számú szekvencia)

oligo 3 P7984:

5' TACAGTGCCTCTTTCCTCTATAGTGGTGTACCATACAGGTTTCAGC
GGATCCGGTAGTGGTACTGATTTTAC3' (54. számú szekvencia)

oligo 4 P7985

5'GACAGTAATAAGTGGCGAAATCTTCTGGCTGGAGGCTACTGATCGTG
AGGGTGAAATCAGTACCACTACCG3' (55. számú szekvencia)

oligo 5 P7986:

5'ATTTCGCCACTTATTACTGTCAACAGTATAACATCTACCCACTCACAT
TCGGTCAGGGTACTAAAGTAGAAATCAAACGTACGGAATTC3' (56.
számú szekvencia)

Fwd P7981:

5'GAATTCAGGGTCACCATCACTTGTAAGCC3' (57. számú szekvencia)

Bwd P9780

5'GAATTCGTCACGTTTGATTCTACTTTAGT3' (58. számú szekvencia)

PCR reakcióelegyet készítettünk 100 µl-ben, amely a következőket tartalmazta: 10 mM trisz.HCl, pH 8,3, 1,5 mM magnézium-klorid, 50 mM kálium-klorid, 0,001 tömeg/térfogat% zselatin, 0,25-0,25 mM a dezoxiribonukleozid-trifoszfátokból, 2-2 pM P7982, P7983, P7984, P7985, P7986, 10-10 pM P 7980, P 7981 és 1 egység Taq polimeráz. Egy reakcióciklusban 94 °C-t 1 percig, 55 °C-t 1 percig és 72 °C-t 1 percig alkalmaztunk. Harminc ciklus után minden reakciót agaróz gélben való elektroforézissel analizáltunk, a PCR fragmentumot a gélből kimetszettük és Mermaid kit segítségével izoláltuk. A kapott fragmentumot BstEII és SphI enzimmal hasítottuk megfelelő pufferben. A kapott terméket végül agaróz gélben elektroforetizáltuk és a 270 bázispár méretű fragmentumot egy gél szeletből izoláltuk, majd a CTIL5-gL6 vektorba (12. ábra) ligáltuk, amelyet előzőleg ugyanezen enzimekkel emésztettünk. A fenti vektor szolgáltatja a hiányzó antitest vezér szekvenciát és a framework 1 első 17 aminosavát.

A ligációs keveréket használtuk az *E. coli* Lm1035 törzs transzformálására és a kapott telepeket PCR-rel, restrikciós enzimes emésztésekkel és nukleotid szekvenálással analizáltuk. A hTNF40-gL1 VI régió nukleotid és aminosav szekvenciája a 8. ábrán látható (8. számú szekvencia).

CDR-beültetett hTNF40-gL2 könnyű lánc szerkesztése

A hTNF40-gL2-t (9. számú szekvencia) PCR használatával szerkesztettük. A következő oligonukleotidokat használtuk az aminosav cserék bevezetéséhez:

R1053: 5'GCTGACAGACTAACAGACTGTTCC3' (59. számú szekvencia)

R5350: 5' TCTAGATGGCACACCATCTGCTAAGTTTGATGCAGCATAGAT
CAGGAGCTTAGGAGC3' (60. számú szekvencia)

R5349: 5'GCAGATGGTGTGCCATCTAGATTCAGTGGCAGTGGATCA
GGCACAGACTTTACCCTAAC3' (61. számú szekvencia)

R684: 5'TTCAACTGCTCATCAGAT3' (62. számú szekvencia)

Két 20 µl-es reakcióelegyet készítettünk. Mindkettő a következőket tartalmazta: 10 mM trisz.HCl, pH 8,3, 1,5 mM magnézium-klorid, 150 mM kálium-klorid, 0,01 tömeg/térfogat% zselatin, 0,25-0,25 mM a dezoxiribonukleozid-trifoszfátokból, 0,1 µg hTNF40-gL1, 6 pM R1053/R5350 vagy R5349/R684 és 0,25 egység Taq polimeráz. A reakciót a következő cikluson vittük át: 94 °C 1 percig, 55 °C 1 percig és 72 °C 1 percig. Harminc ciklus után a reakcióelegyeket agaróz gélben való elektroforézissel analizáltuk, a PCR fragmentumokat a gélből kimetszettük és Mermaid kit alkalmazásával izoláltuk.

Ennek részleteit egy második menet PCR-nek vetettük alá. A reakcióelegy – 100 µl – a következőket tartalmazta: 10 mM trisz.HCl, pH 8,3, 1,5 mM magnézium-klorid, 50 mM kálium-klorid, 0,01 tömeg/térfogat% zselatin, az első reakciómenetből kapott PCR fragmentumok mindegyikéből 1/5 rész, 30 pM R1053 és R684 és 2,5 egység Taq polimeráz. A reakcióhőmérsékletek ugyanazok voltak, mint fent. PCR után a keveréket fenol/kloroform-mal, majd kloroform-mal extraháltuk és etanollal kicsaptuk. Az etanolos csapadékot centrifugálással nyertük ki, megfelelő pufferben feloldottuk és BstEII és SphI enzimmel hasítottuk. A kapott terméket végül agaróz gélben elektroforetizáltuk és a 270 bázis pár méretű DNS fragmentumot egy gél szeletből izoláltuk, végül az előzőleg ugyanezen enzimekkel emésztett pMF15.1 vektorba (4. ábra) ligáltuk.

A ligációs keveréket *E. coli* LM1035 sejtek transzformálására használtuk, és a kapott telepeket PCR-rel, restrikciós enzimes emésztéssel és nukleotid szekvenálással analizáltuk. A hTNF40-gL2 VI régió nukleotid és aminosavszekvenciája a 9. ábrán látható (9. számú szekvencia).

A hTNF40 nehéz lánc CDR-beültetése

A hTNF40 nehéz lánc CDR-beültetését ugyanannak a stratégiának az alkalmazásával végeztük, mint amelyet a könnyű láncnál leírtunk. Úgy találtuk, hogy a hTNF40 nehéz lánc az 1-es alcsoportba tartozó humán nehéz láncokkal a leginkább homológ és ezért a humán 1-es csoport framework-ök általánosan elfogadott (konszenzus) szekvenciáit választottuk a hTNF40 nehéz lánc CDR-ek befogadására.

Vizsgálni kívántuk, hogy mi az előfeltétele annak, hogy egy homológ humán framework úgy működjön a CDR beültetéshez, mint egy akceptor framework, ezért egy második framework-öt – humán 3-as csoport – választottunk a hTNF40 nehéz lánc humanizálására.

A hTNF40 framework régió és a két különböző framework régió összehasonlítását a 2. ábrán mutatjuk be, ahol látható, hogy a hTNF40 32 pozíciónál (aláhúzva) különbözik a humán 1-es alcsoportbeli konszenzus csoportoktól és 40 pozíciónál (aláhúzva) a humán 3-as alcsoportbeli konszenzus csoportoktól. Miután analizáltuk, hogy ezek közül valamelyik hozzájárulhat-e az antigén kötéshez, a 28-as, 38-as, 46-os, 67-es, 69-es és 71-es csoportot tartottuk meg donorként a gh1hTNF40.1 CDR-beültetett nehéz láncban az 1-es csoportú framework használatával. A 27-es, 28-as, 30-as, 48-as, 49-es, 69-es, 71-es, 73-as, 76-os és 78-as csoportot tartottuk meg donorként a gh3hTNF40.4 CDR-beültetett nehéz láncban a 3-as csoportú framework használatával. A 28-as, 69-es és 71-es csoportot tartottuk meg donorként a gh1hTNF40.4 CDR-beültetett nehéz láncban az 1-es csoportú framework használatával.

A gh1hTNF40.4 CDR-beültetett nehéz lánc szerkesztése

A gh1hTNF40.4-et (10. számú szekvencia) PCR-ben szereltük össze egymást átfedő oligonukleotidokat használva a megfelelő primerek jelenlétében. A PCR-ben a következő oligonukleotidokat használtuk.

1-es csoportú graft

oligo 1 P7989:

5'GAAGCACCAGGCTTCTTAACCTCTGCTCCTGÁCTGGACCAGCTGCAC
CTGAG AGTGCACGAATTC3' (63. számú szekvencia)

oligo 2 P7990:

5'GGTTAAGAAGCCTGGTGCTTCCGTCAAAGTTTCGTGTAAGGCCTCAG
GCTACGTGTTACAGACTATGGTA3' (64. számú szekvencia)

oligo 3 P7991:

5' CAACCCATCCATTTCAAGCCTTGTCCCGGGGCCTGCTTGACCCA
ATTCATAC25 CATAGTCTGTGAACACGT3' (65. számú szekvencia)

oligo 4 P7995:

5' GGCCTGAAATGGATGGGTTGGATTAATACTTACATTGGAGAGCCT
ATTTATGTTGACGACTTCAAGGGCAGATTCACGTTTC3' (66. számú
szekvencia)

oligo 5 P7992:

5'CCATGSTATGCAGTGC GTTGTGGAGGTGTCTAGAGTGAACGTGAATCT
GCCCTTGAA3' (67. számú szekvencia)

oligo 6 P7993:

5'CCACAAGCACTGCATACATGGAGCTGTCATCTCTGAGATCCGAGGAC
ACCGCAGTGTACTAT3' (68. számú szekvencia)

oligo 7 P7994:

5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCATGGCATAAGATCTGTATC
CTCTAGCACAATAGTACTGCGGTGTCCTC3' (69. számú szekvencia)

Fwd: P7988:

5'GAATTCGTGCACTCTCAGGTGCAGCTGGTC3' (70. számú szekvencia)

Bwd P7987:

5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCAT3' (71. számú szekvencia)

Az összeszereléshez szolgáló reakcióelegy, 100 µl, a következőket tartalmazta: 10 mM trisz.HCl, pH 8,3, 1,5 mM magnézium-klorid, 50 mM kálium-klorid, 0,01 tömeg/térfogat% zselatin, 0,25-0,25 mM a dezoxiribonukleozid-trifoszfátokból, 2-2 pM P7989, P7990, P7991, P7992, P7993 és P7994, 10-10 pM P7988 és P7987 és 2 egység Taq polimeráz. Egy reakció-ciklusban 94 °C-t 1 percig, 55 °C-t 1 percig és 72 °C-t 1 percig alkalmaztunk. Harminc ciklus után a reakcióelegyet fenol/kloroform elegyével (1/1), majd kloroformmal extraháltuk és etanollal kicsaptuk. Centrifugálás után a DNS-t megfelelő restrikciós pufferben feloldottuk és ApaLI-gyel és KpnI-gyel emésztettük. A kapott fragmentumot agaróz gélből izoláltuk és pMR14-be (5. ábra) ligáltuk, amelyet előzőleg ugyanezen enzimekkel emésztettünk. A pMR14 a humán gamma 4 nehéz lánc konstans régióját tartalmazza. Amikor a pMR14-et ApaLI-gyel és KpnI-gyel hasítjuk, a hasított vektor úgy tudja befogadni az emésztett DNS-t, hogy az emésztett DNS 3' vége a gamma 4 konstans régiót kódoló szekvencia 5' végéhez leolvasási keretben csatlakozik. Ennélfogva az ebből a vektorból kifejeződő nehéz lánc gamma 4 izotípusú lesz. A ligációs keveréket használtuk az E. coli LM1035 sejtek transzformálására és a kapott baktériumtelepeket restrikciós emésztéssel és nukleotid szekvencia analízissel szűrtük. Ilyen módon azonosítottunk egy plazmidot, amely a helyes gh1hTNF40.4 szekvenciát (10. ábra) (10. számú szekvencia) tartalmazta.

A gh3hTNF40.4 CDR-beültetett nehéz lánc szerkesztése

A gh3hTNF40.4-et (11. számú szekvencia) PCR-ben szereltük össze egymást átfedő oligonukleotidokat használva a megfelelő primerek jelenlétében. A PCR-ben a következő oligonukleotidokat használtuk.

3-as csoportú graft

oligo 1 P7999:

5'GATCCGCCAGGCTGCACGAGACCGCCTCCTGACTCGACCAGCTGAA
CCTCAG AGTGCACGAATTC3' (72. számú szekvencia)

oligo 2 P8000:

5'TCTCGTGCAGCCTGGCGGATCGCTGAGATTGTCCTGTGCTGCATCT
GGTACGTCTTCACAGACTATGGAA3' (73. számú szekvencia)

oligo 3 P8001

5'CCAACCCATCCATTCAGGCCCTTCCCAGGGCCTGCTTAACCCAAT
TCATTCCATAGTCTGTGAAGACGT3' (74. számú szekvencia)

oligo 4 P7995:

5'GGCCTGAAATGGATGGGTTGGATTAATACTTACATTGGAGAGCCTAT
TTATGTTGACGACTTCAAGGGCAGATTCACGTTC3' (66. számú
szekvencia)

oligo 5 P7997:

5' GGAGGTATGCTGTTGACTTGGATGTGTCTAGAGAGAACGTGA
ATCTGCCCTTGAA3' (75. számú szekvencia)

oligo 6 P7998:

5'CCAAGTCAACAGCATACCTCCAAATGAATAGCCTGAGAGCAGAGGAC
ACCGCAGTGTACTAT3' (76. számú szekvencia)

oligo 7 P7993:

5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCATGGCATAAGATCTGTATC
CTCTAGCACAAATAGTACTACTGCGGTGTCCTC3' (77. számú szekvencia)

5 Fwd P7996:

5'GAATTCGTGCACTCTGAGGTTTCAGCTGGTC3' (78. számú szekvencia)

Bwd P7987:

5'GAATTCGGTACCCTGGCCCCAGTAGTCCAT3' (71. számú szekvencia)

Az összeszereléshez szolgáló reakcióelegy, 100 μ l, összetétele a következő volt: 10 mM trisz.HCl, pH 8,3, 1,5 mM magnézium-klorid, 50 mM kálium-klorid, 0,01 tömeg/térfogat% zselatin, 0,25-0,25 mM a dezoxiribonukleozid-trifoszfátokból, 2-2 pM P7999, P8000, P8001, P7995, P7997, P7998 és P7993, 10-10 pM P7996 és P7987 és 1 egység Taq polimeráz. A reakcióelegyre a következő ciklust alkalmaztuk: 94 °C 1 percig, 55 °C 1 percig és 72 °C 1 percig. Harminc ciklus után a reakcióelegyet fenol/kloroformmal (1/1), majd kloroformmal extraháltuk, és etanollal kicsaptuk. Centrifugálás után a DNS-t megfelelő restriktációs pufferben feloldottuk és ApaI-gyel és KpnI-gyel emésztettük. A kapott fragmentumot agaróz gélből izoláltuk és pMR14-be (5. ábra) ligáltuk, amelyet előzőleg ugyenezen enzimekkel emésztettünk. A pMR14 a humán gamma 4 nehéz lánc konstans régiót tartalmazza. Amikor a pMR14-et ApaI-gyel és KpnI-gyel hasítjuk, a hasított vektor úgy képes befogadni az emésztett DNS-t, hogy az emésztett DNS 3' vége a gamma 4 konstans régiót kódoló szekvencia 5' végéhez leolvasási keretben csatlakozik. Ennélfogva az ebből a vektorból kifejeződő nehéz lánc gamma 4 izotípusú lesz. A ligációs keveréket használtuk az *E. coli* LM1035 sejtek transzformálására és a kapott baktérium telepeket restriktációs emésztéssel és nukleotid szekvencia analízissel szűrtük. Ilyen módon egy olyan plazmidot azonosítottunk, amely a helyes gh3hTNF40.4 szekvenciát (11. számú szekvencia) (11. ábra) tartalmazta.

CDR-beültetett módosított Fab fragmentum előállítása

A PTTO-1 E. coli vektor alkalmazásával előállítottunk egy CDR-beültetett, módosított Fab fragmentumot a hTNF40 antitestre alapozva. A hTNF40 antitest variábilis régióit ebbe a vektorba szubklónoztuk és az intergenikus szekvencia optimalizálásával hoztuk létre a pTTO(CDP870) vektort. A pTTO expressziós vektort úgy szerkesztettük, hogy a rekombináns proteinek oldható formáinak periplazmatikus akkumulációját valósítsa meg E. coli-ban. E plazmid főbb vonásai a következők:

- (i) tetraciklin rezisztencia marker – a rezisztencia gén termék nem inaktíválja az antibiotikumot, ennél fogva a plazmid tartalmú sejtek szelekciója megmarad,
- (ii) alacsony másolatszám – a replikációs origó a p15A plazmidból származik, amely a colE1 eredetű replikonokat tartalmazó plazmidokkal kompatibilis;
- (iii) erős, indukálható lac promoter a klónozott gén(ek) transzkripciójához;
- (iv) lac^R gén – a lac represszor protein konstitutív expresszióját biztosítja, a lac promotert represszált állapotban tartva az IPTG/allolaktózzal való indukcióig;
- (v) OmpA szignál szekvencia – a klónozott gén(ek) periplazmatikus szekrécióját biztosítja,
- (vi) az OmpA szignál szekvencia transzlációs kapcsolódása egy rövid LacZ peptidhez, amely a transzláció hatékony megindulását biztosítja.

A vektort módosított Fab fragmentumok expressziójára fejlesztettük ki egy dicisztronos message-ből egy olyan módszer kidolgozása révén, amely empirikus módon szelektálja az optimális intergenikus szekvenciát egy sor négyféle rendeltetésű kazettából. Ennek alkalmazását a pTTO(CDP870) szerkesztésénél írtuk le.

Anyagok és módszerek

DNS technikák

Standard eljárásokat használtunk a technikák kivitelezésére, beleértve a DNS hasítást, agaróz gél elektroforézist, ligálást és transzformálást. A restrikciós enzimeket és a DNS módosító enzimeket a New England Biolabs vagy a Boehringer Mannheim cégtől szereztük be és a szállító cégek előírásai szerint alkalmaztuk. A DNS fragmentumokat agarózból tisztítottuk GeneClean technika (BIO 101) alkalmazásával. Az oligonukleotidokat az Oswell Oligonucleotide Service szállította és 40 nm méretben voltak szintetizálva. Plazmid DNS-t a Plasmid DNA Mini/Midi Kitek (Qiagen) segítségével izoláltunk. PCR-t Perkin Elmer féle „Amplitaq” használatával végeztünk, a cég előírásai szerint. DNS szekvenáláshoz az Applied Biosystems Taq cycle sequencing kitet használtuk.

Rázott palack indukció

Az *E. coli* W3110 kultúrákat tetraciklinnel (7,5 µg/ml) kiegészített L-levesben tenyésztettük. Indukcióhoz a friss, egy-éjszakás kultúrákat (tenyésztés 30 °C-on) $OD_{600} = 0,1$ -re hígítottuk 2-literes terelőlemez palackban 200 ml L-levesben, majd 30 °C-on tenyésztettük orbitális inkubátorban. $OD_{600} = 0,5$ elérésekor IPTG-t adagoltunk 200 µM-ig. Időközönként mintákat (OD -re korrigálva) vettünk.

Periplazmatikus extrakció

A tenyészet-mintákat jégen hűtöttük (5 percig), majd a sejteket centrifugálással arattuk le. Extrakciós pufferben (100 mM trisz.HCl, 10 mM EDTA, pH 7,4) való reszuszpendálás után a mintákat egy éjszakán át 30 °C-on inkubáltuk, majd centrifugálással derítettük.

Az összeszerelés vizsgálata

A módosított Fab koncentrációkat ELISA módszerrel határoztuk meg. A lemezeket 4 °C-on egy éjszakán át anti-humán Fd 6045-tel fedtük (2 µg/ml fedő pufferben, fiziológiás konyhasó oldatban, 100 µl/tartály). Mosás után 100 µl mintát mértünk be tartályonként; standardként tisztított A5B7 gamma-1 Fab-t – kezdetként 2 µg/ml-t – használtunk. A mintákból 2-szeres sorozathígítást készítettünk a lemezen végig minta konjugátum pufferben (literenként 6,05 g trisz-amino-metán, 2,92 g nátrium-klorid, 0,1 ml Tween-20, 1 ml kazein (0,2 %-os); a lemezeket 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk, rázással. A lemezeket mostuk, szárítottuk, majd 100 µl anti-humán C-kappa (GD12)-peroxidáz reagenst (minta konjugátum pufferben hígítva) adtunk hozzá. Az inkubálást szobahőmérsékleten végeztük, 1 órán át, rázással. A lemezeket mostuk, szárítottuk, ezután hozzáadtunk 100 µl szubsztrátum oldatot [10 ml nátrium-acetát/citrát oldat (0,1 M, pH), 100 µl hidrogén-peroxid oldat, 100 µl tetrametil-benzidin oldat (10 mg/ml dimetil-szulfoxidban)]. A szubsztrátum hozzáadása után 4-6 perc múlva olvastuk le az abszorpciót 630 nm-en.

A pTTO-1 plazmid szerkesztése

(a) A pTTQ9 polilinker helyettesítése

A pTTQ9 plazmidot az Amersham cégtől szereztük be és a 14. ábrán mutatjuk be. Egy részletét (2 µg) Sall és EcoRI restriktációs enzimmel emésztettük, az emésztett anyagot 1 %-os agaróz gélen futtattuk és a nagy DNS fragmentumot (4520 bp) tisztítottuk. Két oligonukleotidot szintetizáltunk, amelyek egymáshoz anellálva az OmpA polilinker régiót kódolják. Lásd a 15. ábrát. Ez a szekvencia ragadós végeket tartalmaz, amelyek a pTTQ9 hasítása következtében képződött Sall és EcoRI végekkel kompatibilisek. Ennek a „kazettának” a pTTQ9 vektorba való klónozása nem regenerálja a Sall helyet, de az EcoRI hely megmarad. Ez a kazetta az *E. coli* külső membrán protein OmpA szignál szekvenciájának – amelyet az OmpA gén Shine Dalgarno riboszóma kötőhelye előz meg – első 13 aminosavát kódolja. Ezenkívül a következő enzimek számára tartalmaz restriktációs helyeket: XbaI, MnlI, StyI és SplI. A MnlI és StyI helyek az OmpA szignál

szekvencia kódoló régióján belül vannak és mint 5' klónozó helyek gének beépítését szolgálják. A két oligonukleotidot, amelyek ezt a kazettát létrehozták, úgy anelláltuk egymáshoz, hogy 5 pM/μl koncentrációban összekevertük, vízfürdőben 95 °C-on 3 percig hevítettük őket, majd lassan szobahőmérsékletre hűtöttük. Az anellált szekvenciát ezután a Sall/EcoRI-gyel hasított pTTQ9-be ligáltuk. A kapott közfitermék plazmidot PTQOmp-nek neveztük és DNS szekvenálással ellenőriztük.

(b) Fragmentum előállítás és ligálás

A pTTO-1 plazmidot úgy állítottuk elő, hogy egy DNS fragmentumot, amely a pACYC184 plazmidból származott, két olyan fragmentumhoz ligáltunk, amelyek a pTQOmp-ből keletkeztek. A pACYC184 plazmidot a New England Biolabs-tól szereztük be, a plazmid restrikciós térképe a 16. ábrán látható. Egy részletét (2 μg) teljesen megemésztettük a StyI restrikciós enzimmal, majd Mung Bean nukleázzal kezeltük; ez a kezelés tompa végeket hoz létre azáltal, hogy visszavágja az 5' túlnyúló bázisokat. Fenolos extrahálás és etanolos kicsapás után a DNS-t PvuII-vel hasítottuk és így kaptuk a 2348, 1081, 412 és 403 bp méretű fragmentumokat. A 2348 bp méretű fragmentumot agaróz gél elektroforézis után tisztítottuk. Ez a fragmentum kódolja a tetraciklin rezisztencia markert és a p15A replikációs origo-t. A fragmentumot ezután borjúbél alkalikus foszfátazzal kezeltük, hogy eltávolítsuk az 5' terminális foszfátokat, hogy ezáltal megakadályozzuk a molekula ön-ligációját.

A pTQOmp plazmid egy részletét (2 μg) SspI és EcoRI enzimmal emésztettük és a 2350 bp hosszú fragmentumot, agaróz gél elektroforézis után, megtisztítottuk a nem kívánatos 2040 bp és 170 bp hosszú fragmentumoktól; ez a fragmentum kódolja a transzkripció terminátor régiót és a *lacIⁿ* gént. A pTQOmp egy másik részletét (2 μg) EcoRI-gyel és XmnI-gyel emésztettük és így kaptuk a 2289, 1670, 350 és 250 bp méretű fragmentumokat. A 350 bp hosszú fragmentumot, amely a *lac* promotert, az OmpA szignál szekvenciát és a többszörös klónozó helyet kódolja, gélben tisztítottuk.

A három fragmentumot ezután ligáltuk, az egyes fragmentumokból megközelítőleg ekvimoláris mennyiségeket használva. Minden klónozási junkciót DNS szekvenálással ellenőriztünk. A plazmid restrikciós térképét a 17. ábra mutatja. A pTTO-2 plazmidot ezután a humán Ig könnyű lánc kappa konstans domént kódoló DNS beépítésével készítettük el. Ezt a pHC132 plazmidból kaptuk S_{ph}I-EcoRI restrikciós fragmentumként, amelyet a pTTO-1 megfelelő helyére építettünk be. A pTTO-2 plazmid a 18. ábrán látható.

Humanizált hTNF40 variábilis régiók beépítése pTTO-2-be

A hTNF40g_L1 variábilis könnyű lánc régiót (8. számú szekvencia) a megfelelő, emlős sejt expresszióhoz való pMR10-1 vektorból, PCR-rel való „kiszabadítás” (PCR „rescue”) útján kaptuk meg. Az OmpA vezérszekvencia helyettesíti az eredeti Ig vezérszekvenciát. A PCR primerek szekvenciáját az alábbiakban ismertetjük:

5' primer:

CGCGCGGCAATTGCA GTGGCCTTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAAG
CTGACATTCAAATGACCCAGAGCCC (79. számú szekvencia)

3' primer:

TTCAACTGCTCATCAGATGG (80. számú szekvencia)

A standard feltételek mellett végzett PCR után a terméket tisztítottuk, M_unI és S_{ph}I enzimmal emésztettük, majd géiben tisztítottuk. A tisztított fragmentumot ezután a pTTO-2 M_unI/S_{ph}I helyére építettük be, a pTTO(hTNF40L) könnyű lánc köztitermék előállítására céljából.

A gh3hTNF40.4 variábilis nehéz lánc régiót hasonló módon kaptuk a pGamma-4 vektorból. A PCR primereket alább ismertetjük.

5' primer:

GCTATCGCAATTGCAGTGGCGCTAGCTGGTTTCGCCACCGTGGCGCAAG

CTGAGGTTTCAGCTGGTTCGAGTCAGGAGGC (81. számú szekvencia)

3' primer:

GCCTGAGTTCCACGACAC (82. számú szekvencia)

PCR után a terméket tisztítottuk, NheI és ApaI enzimmal emésztettük, majd a pDNAbEng-G1 vektorba (19. ábra) szubklónoztuk. DNS szekvenálással való ellenőrzés után a nehéz láncot EcoRI enzimmal hasítottuk és a pTTO(htNF40L) EcoRI helyére klónoztuk be, miáltal megkaptuk a pTTO(htNF40) E. coli expressziós plazmidot.

Intergenikus szekvencia optimalizálása módosított Fab expresszióhoz

A pTTO vektorban a módosított Fab expressziója történik meg egy olyan dicisztronos message-ből, amely először a könnyű láncot, majd a nehéz láncot kódolja. A két gén közötti DNS szekvencia (intergenikus szekvencia = IGS) befolyásolhatja a nehéz lánc expressziójának szintjét azzal, hogy kihat a transzláció elindulásának a gyorsaságára. Például: egy rövid intergenikus szekvencia transzláció kapcsolódást eredményezhet a könnyű és nehéz lánc között, amennyiben a transzlatáló riboszóma nem teljesen válik el a mRNS-től a könnyű lánc szintézis befejeződése után, a nehéz lánc szintézis megindulása előtt. Bármelyik Shine Dalgarno (SD) riboszóma kötőhely (a 16S rRNS-sel homológ) „erejének” („strength”) is lehet hatása, mint ahogy hatása lehet az SD és az ATG start kodon közötti távolságnak és szekvencia összetételének. Az ATG körül a mRNS potenciális másodlagos szerkezete egy másik fontos faktor; az ATG-nek „hurok”-ban kell lennie és nem egy „szár”-on belül beszorítva, míg a fordítottja érvényes az SD-re. Tehát az IGS összetételének és hosszúságának a módosításával lehetővé válik a transzláció iniciációs erejének a módosítása és ennélfogva a nehéz lánc termelés szintjének a módosítása. Valószínű, hogy a transzláció elindulásának optimális gyorsaságot kell elérnie ahhoz, hogy egy adott Fab nehéz láncának az expresszióját maximalizálja. Például: az egyik módosított Fab esetén a magas szintű expresszió tolerálható, de egy eltérő módosított, eltérő

aminosavszekvenciájú Fab esetén toxikusnak bizonyulhat, talán a szekréció vagy a felgombolyodás eltérő eredményessége miatt. Ezért négy intergenikus szekvencia sorozatot terveztünk (20. ábra), amely lehetővé tette, hogy a hTNF40-alapú módosított Fab számára empirikusan határozzuk meg az optimális IGS-t. Az IGS1 és IGS2 nagyon rövid intergenikus szekvenciák (-1, illetve +1) és várhatóan szorosan összekapcsolódó transzlációt eredményeznek; az SD szekvenciák (aláhúzva) kevésbé különböznek. Ez a két szekvencia nagy valószínűséggel a transzlációs iniciáció magas szintjét biztosítja. Az IGS3-ban és IGS4-ben hosszabb a távolság a start és a stop kodon között (+13) és szekvencia összetételük különbözik; az IGS3-nak „erősebb” az SD szekvenciája. Mindegyik szekvencia másodlagos szerkezetét tanulmányoztuk (az m/fold programot használtuk) és amennyire lehetett, „optimalizáltuk”; azonban a két lánc transzlációjának szoros összekapcsolódása esetén a riboszómális disszociáció hiánya azt jelenti, hogy a mRNS nem lehet „lecsupaszított”, amely megakadályozza a másodlagos szerkezet kialakulását.

IGS variánsok klónozása.

A 20. ábrán látható IGS kazetták határos SacI és MnlI klónozó helyeket tartalmaznak. Ezeket komplementer oligonukleotid párok anellálása révén képeztük. Vektor fragmentumot készítettünk a pTTO(hTNF40) SacI-gyel és NotI-gyel való emésztésével, a nehéz lánc fragmentumot pedig a pDNA_{EngG1}(hTNF40H) MnlI-gyel és NotI-gyel való emésztésével állítottuk elő. Három-lépéses ligációkat végeztünk úgy, hogy a két restrikciós fragmentum ekvimoláris mennyiségeit használtuk és az egyes anellált oligo kazettákból körülbelül 0,05 pM-t használtunk fel. Ilyen módon a következő négy expressziós plazmidot állítottuk elő: pTTO(hTNF40 IGS-1), pTTO(hTNF40 IGS-2), pTTO(hTNF40 IGS-3), pTTO(hTNF40 IGS-4).

Rázott palackos expresszió analízis.

A négy plazmiddal *E. coli* W3110 törzset transzformáltunk, ugyanakkor az eredeti expressziós szerkezettel is, majd a rázott palackok tartalmát expresszióra analizáltuk, ahogyan leírtuk. Egy jellemző kísérlet eredményeit a 21. ábrán

mutatjuk be. A különböző intergenikus szekvenciák különböző expressziós profilokat eredményeztek. Az IGS1 és IGS2 gyorsan akkumulálja periplazmatikus módosított Fab-t egy csúccsal az indukció után 1 óra múlva, ezután a kinyerés szintje esik. IGS1-nél a csúcs nagyobb, az esés élesebb. Ezek az eredmények egybevágnak a szintézis magas szintjével, mint várható volt ezeknél a szerkezeteknél a szoros transzlációs kapcsolódás következtében. Kétségtelen, hogy az IGS1 a nehéz lánc expresszió magasabb szintjét eredményezi, mint az IGS2. Ebben az esetben úgy tűnik, hogy ez a magasabb szintű expresszió nehezen tolerálható, mivel a periplazmatikus expressziós szintek az 1 órás csúcs után esnek. Ez látható az IGS1 tenyészet növekedési profilján (nem mutatjuk), amely az indukció után 1 óra múlva eléri a csúcst az esés előtt, amiből sejt halálra és lízisre lehet következtetni. Az IGS3 lassabban akkumulálja a módosított Fab-t, de az indukció után 2 órával magasabb csúcs értékkel (325 ng/ml/OD) éri el a csúcst, mielőtt a szintek esnek. Ennek a tenyészetnek a növekedése 3 órán át folytatódott az indukció után és magasabb csúccsal érte el a biomasszát (nem mutatjuk). Ez egybevág egy alacsonyabb szintű nehéz lánc szintézissel. Az IGS4 az anyagot még lassabban akkumulálja és nem sikerül elérnie a másik 3 szerkezet termelékenységének magas csúcsát. Mindegyik IGS variáns teljesítményben jelentősen felülmúlja az eredeti vektorét. Azt a hipotézist, hogy a különböző IGS szekvenciák a transzlációt különböző gyorsasággal indítják el, ezek a kísérleti eredmények alátámasztják. Ami a hTNF40 alapú módosított Fab-t illeti, úgy tűnik, hogy a nehéz lánc transzláció iniciáció magas üteme kevésbé tolerált és ezért nem optimális. Egy lassabb ütem, amit az IGS3 biztosít, jobb növekedési tulajdonságokat eredményez és ennek következtében idővel jobb hozam halmozódik fel.

A fermentorban kapott kitermelés összehasonlítása után az IGS3 szerkezetet választottuk, minthogy ez adta a legmagasabb hozamot és pTTO(CDP870)-nek neveztük el – lásd a 22. ábrát.

A pTTO(CDP870) plazmid által kódolt nehéz lánc szekvenciáját a 115. számú szekvencia mutatja és a könnyű lánc szekvenciáját a 113. számú szekvencia mutatja.

A CDR-beültetett, hTNF40-alapú módosított Fab PEGilezése.

A tisztított, módosított Fab-t hely-specifikusan konjugáltuk egy elágazó láncú PEG molekulával. Ezt úgy értük el, hogy a módosított Fab csonkított csukló régiójában egyetlen cisztein csoportot aktiváltunk, majd (PEG)-lízil-maleinsavimid-del reagáltattuk, mint előzőleg leírták [A.P. Chapman et al., Nature Biotechnology, 17, 780-783 (1991)]. A PEGilezett molekulát a 13. ábrán mutatjuk be és a vegyületet CDP870-nek neveztük el. A PEGilezett CDR-beültetett, hTNF40-alapú módosított Fab (CDP870) hatékonysága a rheumatoid arthritis kezelésében.

A CDP870-nek hosszú a felezési ideje, körülbelül 11 nap.

Egy intravénás CDP870 ártalmatlanságát és hatékonyságát randomizált, kettős-vak, placebo-ellenőrzött, növekvő dózissal végzett vizsgálatban, RA paciensekben értékeltük.

MÓDSZEREK

Betegek:

A londoni, cambridgei, norfolki és norwichi (UK) Rheumatológiai Klinikák ambuláns betegek közül olyan 18 és 75 év közötti korú pacienseket választottunk, akik kielégítették az American College of Rheumatology (ACR) 1987-ben átdolgozott, rheumatoid arthritis-re (RA) vonatkozó diagnosztikai kritériumait [Arnett et al., Arthritis Rheum., 31, 315-324 (1988)]. Megszabtuk, hogy a pacienseknek klinikailag aktív betegsége legyen, amelyet a következő kritériumok közül legalább 3 határoz meg: ≥ 6 fájdalmas vagy érzékeny ízület, ≥ 45 percig tartó kora reggeli merevség; és a vörösvérsejt ülepedési sebesség (ESR = erythrocyte sedimentation rate) ≥ 28 mm/h. Legalább egy betegség módosító reuma ellenes gyógyszerre [Disease Modifying Anti-Rheumatic Drug = DRARD] ne tudjanak válaszolni és legalább 4 hete nem kaptak kezelést. A kortikoszteroidok megengedettek voltak, ha a dózis prednizolonból $\geq 7,5$ mg/nap volt. Kizártuk a terhes nőket, szoptató nőket és azokat a nőket, akik szülőképes korúak és nem használnak hatékony fogamzásgátlási módszert. Azokat a pacienseket is kizártuk, akiknek a megelőző kórtörténetében rosszindulatú betegség fordult elő, amely súlyos, ellenőrizhetetlen egészségi állapottal járt együtt, továbbá akiknél előzőleg

a TNF α -neutralizáló terápia nem volt sikeres vagy akik polietilén-glikolra allergiásak. Felvétel előtt minden pácienstől – akiket tájékoztattunk – írott beleegyezést kaptunk. A vizsgálatokat a helyi kutatás etikai bizottságok jóvá hagyták.

Kezelési protokoll:

36 RA beteget 3 csoportba osztottunk, mindegyik csoport a vizsgálati gyógyszerből növekvő dózist (1,5 vagy 20 mg/kg) kapott. Mindegyik 12 főből álló csoportot taláalomra 8 főre – akik CDP870-et kaptak – és 4 főre – akik placebo-t kaptak – osztottunk. A CDP870-et egyetlen intravénás infúzióban (összesen 100 ml) adtuk be 60 perc alatt. A placebo (nátrium-acetát puffer) hasonlóan adtuk be egyetlen 100 ml-es infúzióként 60 perc alatt. A kezelést ambuláner végeztük. Nyolc hét múlva minden betegnek alkalmat adtunk, hogy nyíltan vagy 5, vagy 20 mg/kg CDP870 infúziót kapjon.

Klinikai kiértékelés:

A RA betegség aktivitását a World Health Organization and International League of Associations for Rheumatology [Boers et al., *J. Rheumatol.* – kiegészítés, 41, 86-89 (1994)] és a European League Against Rheumatism (EULAR) [Scott et al., *Clin. Exp. Rheumatol.*, 10, 521-525 (1992)] 28 ízület pontszámait tartalmazó alap-adat készletek (core data sets with 28 joint counts) alapján értékeltük ki. A betegség aktivitásában bekövetkező változásokat a Disease Activity Score (betegség aktivitás pontszám) [Preavo et al., *Arthritis Rheum.*, 38, 727-735 (1995)] segítségével értékeltük. Az értékeléseket a kezelés előtt és a terápia után az 1., 2., 4., 6. és 8. héten végeztük el. A pacienseknél a vizsgálati gyógyszer ártalmatlanságát és elviselhetőségét is értékeltük. Minden vizitnél hematológiai és biokémiai értékelést végeztünk, vizsgáltuk továbbá az anti-CDP870 antitesteket és a káros mellékhatásokat.

CDP870 plazma koncentráció és anti-CDP870 antitestek:

A CDP870-et enzim-immunassay-vel (ELISA) mértük. A paciensekből nyert plazma sorozathígításait rekombináns humán TNF α -val (Strathmann Biotech

GmbH, Hannover) fedett mikrotitráló lemezekken (Nunc) inkubáltuk. A befogott CDP870-et torna peroxidázzal konjugált kecske anti-humán kappa könnyű lánc (Cappel, ICN), ezt követően tetrametil-benzidin (TMB) szubsztrátum hozzáadásával mutattuk ki.

CDP870 elleni antitestekre (1/10 plazma hígítás mellett) kettős antigén szendvics ELISA – második réteggént biotinezett CDP870 szolgál – használatával szűrtünk. A megkötött antitesteket HRP-sztreptavidin és TMB szubsztrátum segítségével mutattuk ki. Az assay-t egy hiperimmun nyúl IgG standardot használva kalibráltuk. Egy egységnyi aktivitás 1 µg nyúl standarddal egyenértékű.

Statisztikai analízis.

A vizsgálat kutatási jellegű volt és a minta mennyisége hasonló szerekkel kapott tapasztalaton alapult. A CDP870 hatékonyságát a betegség aktivitási pontszámok (disease activity score = DAS) kiszámításával analizáltuk, az ACR20/50 válaszokat a kezelésbe való bevonáshoz használtuk és protokollonként kódolt tesztelési eljárást használtunk. A betegség aktivitás pontszámát a következőképpen számítottuk ki: $DAS = 0,555 \times (28 \text{ puha ízület}) \text{ négyzetgyöke} + 0,284 \times (28 \text{ duzzadt ízület}) \text{ négyzetgyöke} + 0,7 \times \ln(\text{ESR}) + 0,0142 \times (\text{a beteg teljes értékelése})$. Először az egyesített aktív csoportokat hasonlítottuk a placebohoz. Ha ez az összehasonlítás 5 %-os szinten szignifikáns volt, mindegyik adagolási csoportnál elvégeztük az összehasonlítást. Minden összehasonlítást két oldali (two tailed) módszerrel végeztünk 5 %-os szignifikancia szinttel. Minden p-érték kísérleti analízisből származott és ezek nem használhatók kikövetkeztetett magyarázathoz.

EREDMÉNYEK

Demográfia:

Harminchat RA páciens-t toboroztunk, demográfiai adataikat a 6. táblázat tartalmazza. Az átlag életkor 56 év volt és 30 páciens volt nő. A RA közepes időtartama 13 év volt és 21 páciens rheumatoid faktor pozitív volt. A különböző csoportokba tartozó pácienseknek hasonló demográfiai jellemzőik voltak. A vak adagolási szakaszban 6/12 placebo-kezelt páciens visszalépett a vizsgálatból az

adagolás után ≥ 4 héttel rosszabbodó RA miatt. A CDP870-kezelt paciensek közül 2/24 visszalépett, mindkettő az 1 mg/kg csoportból, rosszabbodó RA miatt, illetve nem vett részt a követésben > 4 héttel az adagolás után. A különbség statisztikailag szignifikáns volt ($p = 0,009$, Fisher egzakt teszt).

6. táblázat: Demográfiai adatok (közéérték \pm standard eltérés)

	Szám	Nem (Férfi:nő)	Kor	Betegség időtartama	Rheumatoid faktor	Előző DNSRD-k száma
Placebo	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

Klinikai hatékonyság:

A protokollonkénti populációnál az elvégzett utolsó megfigyelésig az ACR20 javulást mutató paciensek százalékos aránya placebo és 1,5 és 20 mg/kg CDP870 után 16,7, 50, 87,5, illetve 62,5 % volt (összevont kezelési eredmény $p = 0,001$) a 4. héten és 16,7, 25, 75 és 75 % ($p = 0,032$) a 8. héten. A protokollonkénti populációnál az elvégzett utolsó megfigyelésig a DAS pontokban elért csökkenés (medián) placebo, 1,5 és 20 mg/kg CDP870 adása után 0,15, 1,14, 1,91 és 1,95 volt (összevont kezelési eredmény $p = 0,001$) a 4. héten és 0,31, 0,09, 2,09 és 1,76 ($p = 0,008$) a 8. héten (23. ábra). A World Health Organization and International League of Association for Rheumatology alap adat készlet individuális összetevőiben bekövetkezett változásokat a 24. ábrán mutatjuk be.

A CDP870 kódolatlan címkével ellátott dózisának adása után hasonló jó hatásokat értünk el. A vizsgálatba bevont 36 beteg közül 32 kapott második CDP870 infúziót. Az előző első infúziótól az ACR20 javulást mutató paciensek aránya 72,2 és 55,6 % volt 5 és 20 mg/kg CDP870-nél a 4. héten és 55,6 és 66,7 % a 8. héten.

Kedvezőtlen események

A kezelést jól tűrték a paciensek, infúzióval kapcsolatos reakció nem volt. Nem jelentettek allergiás reakciót vagy bőr-kiütést. A kettős-vak fázisban 19, 38, 8 és 14 kedvezőtlen esemény fordult elő a placebo, 1,5, illetve 20 mg/kg csoportban. A legáltalánosabb a fejfájás volt 5 paciensenél (placebonál 1, 1 mg/kg-nál 3 és 20 mg/kg-nál 1) 9 esetben. Egy paciensenél, aki placebot kapott és 3 paciensenél, akik CDP870-et kaptak (5 mg/kg-nál 1 és 20 mg/kg-nál 2) alsó légúti fertőzés alakult ki. Ezeket enyhe vagy közepes lefolyásúnak mondták, orális antibiotikumokkal kezelték és 1-2 hét alatt megszűntek. Három paciensenél – az 1 és 5 mg/kg csoportban – és egy paciensenél a 20 mg/kg csoportban húgyúti fertőzés alakult ki 1-2 hónappal a CDP870 kezelés után. Egy kedvezőtlen eseményt súlyosnak írtak le, ez egy nyaki fájdalom volt, amely 1 mg/kg-os infúzió után 3 nappal fordult elő. Négy paciensenél anti-nukleáris antitest növekedést észleltek: a placebo csoportban 1 (negatívról 1/40-re), az 1 mg/kg csoportban 2 (negatívról 1/40-re, negatívról 1/80-ra) és a 20 mg/kg csoportban 1 (negatívról 1/40-re). Nem találtak változást az anti-DNS vagy anti-kardiolipin antitestekben.

CDP870 plazma koncentráció és anti-CDP870 szintek.

Mint várható volt, a CDP870 minden dózis szintjénél a plazma koncentráció az infúzió befejezésekor érte el csúcsát, dózis arányos volt a plazma koncentrációval, majd ezután lassan csökkent. A CDP870 plazma koncentráció profilja nagyon hasonlónak látszott ahhoz, amelyet önkéntesekben előzőleg megfigyeltünk, amikor úgy számoltunk, hogy a felezési idő körülbelül 14 nap. Újbóli adáskor az egy-adagos infúziónál hasonló profilt figyeltünk meg.

Egy egy-adagos intravénás infúziót követően az anti-CDP870 szintek alacsonyak vagy kimutathatatlanok voltak.

A TNF α neutralizálása RA-ban egy hatékony kezelési stratégia. Ehhez jelenleg biológiai hatóanyagok használatára van szükség, ilyen egy kiméra mAb vagy egy oldható receptor/humán Fc fúziós protein, amelyeknek költséges az előállítása. Egy terápiás TNF α neutralizáló szernek magas affinitással kell kötnie a TNF α -t és hosszú felezési idővel, alacsony antigenicitással kell rendelkeznie,

továbbá legyen igen jó az elviselhetősége és legyen ártalmatlan. Legyen hozzáférhető minden RA beteg számára, akiknél a TNF α blokádnak jótékony hatású. Egy olyan technológia, amellyel ezek a célok elérhetők egy E. coli-ban előállított TNF α kötő antitest fragmentum polietilén-glikollal való konjugálása. Ebben az előzetes vizsgálatban úgy találtuk, hogy a CDP870, egy PEGilezett, anti-TNF α , módosított Fab, hatásos és a RA betegek jól tűrik.

In vitro kísérletekben kimutattuk, hogy a CDP870 hasonló TNF α neutralizáló hatást fejt ki, mint az eredeti egér anti-TNF α antitest. Ez a vizsgálat megerősítette, hogy a CDP870 csökkenti a gyulladást és javítja a RA tüneteit. A klinikai javulás az 5 és 20 mg/kg csoportban (75 %, 75 %) – az ACR20 válasz kritériumokkal mérve – hasonlítható volt az etanercept-hez (60 %) [Moreland et al., *Annals Int. Med.* 130, 478-486 (1999)] és az infliximab-hoz (50 %) [Maini et al., *Lancet*, 354, 1932-1939 (1999)]. A vizsgált közepes és legmagasabb adagolási szinteknél a terápiás hatás 8 hétig tartott, amely az előző többi mAb-hez hasonlítható [Elliot et al., *Lancet*, 344, 1105-1110 (1994) és Rankin et al., *Br. J. Rheumatol.*, 34, 334-342 (1995)]. Előző vizsgálatban kimutatták, hogy az anti-TNF α antitest terápiás hatása plazma felezési idejével és keringő antitestek képződésével van összefüggésben [Maini et al., *Arthritis Rheum.*, 38, (kiegészítés): S186 (1995) (kivonat)]. A mi vizsgálatunk kimutatta, hogy a CDP870 felezési ideje 14 nap, ami azonos egy teljes antitestével (Rankin et al., lásd fentebb) és sokkal hosszabb a konjugátlan Fab' fragmentumok felezési idejénél. Ezenkívül a CDP870 ellen csak alacsony szinteken képződött antitest válasz.

Ennek a tanulmánynak egyik fontos célja az volt, hogy megvizsgáljuk ezen PEGilezett Fab' alkalmazásának elviselhetőségét és ártalmatlanságát. A mi vizsgálatunkban a CDP870 jól elviselhetőnek mutatkozott. Mindazonáltal további vizsgálat lesz szükséges ahhoz, hogy kiértékeljük a hosszantartó toxicitást, különösen a demielinizáló betegség, fertőzés és bőr kiütés kockázatát, amelyről az etanercept és infliximab alkalmazásával kapcsolatban számoltak be.

Összegezve, a CDP870 terápiásan hatásos RA-ban és ebben a rövid lejáratú vizsgálatban jól elviselhetőnek bizonyult.

Magától értetődik, hogy a fenti példák csupán a szemléltetés célját szolgálják és nem korlátozzák a találmány oltalmi körét, amelyet a következő igénypontokban határoztunk meg.

SZEKVENCIA LISTA

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása: hTNF40 CDRH1

<400> 1
Asp Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása: hTNF40/humán hibrid CDRH2

<400> 2
Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása: hTNF40 CDRH3

<400> 3
Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása: hTNF40 CDRL1

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

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:hTNF40 CDRL2

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

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:hTNF40 CDRL3

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

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:hTNF40 CDRL2

<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> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

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

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:hTNF40-gL1

<400> 8
gac att caa atg acc cag agc coa tcc agc ctg 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 tgt aaa 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 tat cag caa aaa cca ggt aaa gcc cca aaa gcc ctc atc 144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala 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 acg 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
      88                90                95

aca 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> 9

<211> 321

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:hTNF40-gL2

<400> 9

```
gac att caa atg acc cag agc cca tcc agc ctg agc gga 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 tgt aaa 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 tat cag caa aaa cca ggt aaa gcc cca 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 acg 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

aca 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> 10
<211> 354
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

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

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:ghlHTNF40.4 (10. ábra)

<400> 10
cag gtg cag ctg gtc cag tca gga gca gag gtt aag aag cct ggt gct 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Gln Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

tcc gtc aaa gtt tog tgt aag gcc tca ggc tac gtg ttc aca 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 ggc ctg 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 att aat act tac att gga gag cct att tat gct caa aag ttc 192
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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
65 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 ggc 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> 11
<211> 354
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

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

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:gh3hTNP40.4 (11. ábra)

<400> 11
gag gtt cag ctg gtc gag tca gga ggc ggt ctc gtg cag cot 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
gga atg aat tgg gtt aga cag gcc ccg gga aag ggc ctg gaa 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 aat act tac att gga gag cct att tat got gac agc gtc 192
Gly Trp Ile 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 aca tcc aag tca aca gaa 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 aat agc ctg aga gca gag gac acc gca gtg tac tat tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
got aga gga tac aga tct tat gcc atg gac tac tgg ggc 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> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer szekvencia része

<400> 12
gccgccacc

<210> 13
<211> 26
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CH1

<400> 13
atgaaatgca gctgggtcat attctt 26

<210> 14
<211> 26
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CH2

<400> 14
atgggatgga gctrtatcat sytctt 26

<210> 15
<211> 26
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CH3

<400> 15
atgaagwtgt ggftaaactg ggtttt 26

<210> 16
<211> 23
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CH4

<400> 16
atgractttg ggytcaagctt grt 23

<210> 17
<211> 26
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CH5

<400> 17
atggactcca ggctcaattt agtttt 26

<210> 18
<211> 26
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CH6

<400> 18
atggctgtctc tggsgctctc cttctg 26

<210> 19
<211> 26
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CH7

<400> 19
atggratgga gckggrtctt tctctt 25

<210> 20
<211> 23
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CH8

<400> 20
atgagagrgc tgaktctttt gtc 23

<210> 21
<211> 26
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CH9

<400> 21
atggmtggg tctggamctt gctatt 26

<210> 22
<211> 26
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CH10

<400> 22
atgggcagac ttacattctc attctt 26

<210> 23
<211> 28
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CH11

<400> 23
atggtttttg ggctgatttt ttttattg 28

<210> 24
<211> 26
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CH12

<400> 24
atgatggtgt taagtottot gtacct 26

<210> 25
<211> 21
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer 5'-vég

<400> 25
gggggcaagc ttgcggccac c 21

<210> 26
<211> 29
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CL1

<400> 26
atgaagttgc ctgtaggct gttggtgct 29

<210> 27
<211> 29
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CL2

<400> 27
atggagwcag acacactcct gytatgggt 29

<210> 28
<211> 23
<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CL3

<400> 28
atgagtgtgc tcaactcaggt cct 23

<210> 29
<211> 26
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CL4

<400> 29
atgaggrccc ctgctcagwt tyttgg 26

<210> 30
<211> 29
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CL5

<400> 30
atggatttwc aggtgcagat twtcagctt 29

<210> 31
<211> 29
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CL5A

<400> 31
atggatttwc arytgcagat twtcagctt 29

<210> 32
<211> 26
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CL6

<400> 32
atgaggtkoy ytqytsagyt yctgrg 26

<210> 33
<211> 23
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CL7

<400> 33
atgggwtca agatggagtc aca 23

<210> 34
<211> 29
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CL8

<400> 34
atgtggggay ctktttycam tttttcaat 29

<210> 35
<211> 24
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CL9

<400> 35
atggtriccw caactcagtt cctt 24

<210> 36
<211> 26
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CL10

<400> 36
atgtatatafat gtttgttgtc tatttc 26

<210> 37
<211> 26
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CL11

<400> 37
atggaagccc cagctcagct tctctt 26

<210> 38
<211> 26
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CL12A

<400> 38
atgragtywc agaccaggt cttyrt 26

<210> 39
<211> 26
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CL12B

<400> 39
atggagacac attctcaggt ctttgt 26

<210> 40
<211> 26
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CL13

<400> 40
atggattcac aggcccaggt tcttat 26

<210> 41
<211> 26
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CL14

<400> 41
atgatgagtc ctgcccagtt cctggt 26

<210> 42
<211> 29
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CL15

<400> 42
atgaattttgc ctgttcaatct cttggtgct 29

<210> 43
<211> 29
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CL16

<400> 43
atggatttttc aaattggtcct cactctcctt 29

<210> 44
<211> 26
<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CL17A

<400> 44
atgaggtgcc tarcttagtt cctgrg 26

<210> 45
<211> 26
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CL17B

<400> 45
atgaagtact ctgctcagtt totagg 26

<210> 46
<211> 26
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CL17C

<400> 46
atgaggcatt ctcttcaatt cttggg 26

<210> 47
<211> 21
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer 5'-vég

<400> 47
ggaactgttcg aagccgccac c 21

<210> 48
<211> 30
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer CL12

<400> 48
ggatacagtt ggtgcagcat ccgtacgttt 30

<210> 49
<211> 37
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer R2155

<400> 49
gcagatgggc ccttcgttga ggctgmrqag acdqtga 37

<210> 50
<211> 24
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer R1053

<400> 50
gctgacagac taacagactg ttcc 24

<210> 51
<211> 18
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer R720

<400> 51
gctctcggag gtgctcct 18

<210> 52
<211> 70
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:oligonukleotid P7982

<400> 52
gaattcaggg tcacctcac ttgtaaagcc agtcagaacg taggtactaa cgtagcctgg 60
taccagcaaa 70

<210> 53
<211> 71
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:oligonukleotid P7983

<400> 53
atagaggaaa gaggcactgt agatgagggc ttttggggct ttacctggtt tttgctgata 60
ccaggctang t 71

<210> 54
<211> 71
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:oligonukleotid P7984

<400> 54

tacagtgcct ctttccctota tagtgggtga ccatacaggt tcagcggatc cggtagtggg 60
actgatttca c 71

<210> 55
<211> 71
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:oligonukleotid P7985

<400> 55
gacagtaata agtggcgaaa tcttctggct ggaggctact gatcgtgagg gtgaaatcag 60
taccactacc g 71

<210> 56
<211> 89
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:oligonukleotid P7986

<400> 56
atttcgccac ttattactgt caacagtata acatctacco atccacattc ggtcagggta 60
ctaaaagtaga aatcaaactg acggaattc 89

<210> 57
<211> 30
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:oligonukleotid P7981

<400> 57
gaattcaggg tcaccatcac ttgtaaagcc 30

<210> 58
<211> 30
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:oligonukleotid P7980

<400> 58
gaattccgta cgtttgattt ctactttagt 30

<210> 59
<211> 24
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:oligonukleotid R1053

<400> 59
gctgacagac taacagactg ttcc 24

<210> 60
<211> 57
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:oligonukleotid R5350

<400> 60
tctagatggc acaccatctg ctaagtttga tgcagcatag atcaggagct taggagc 57

<210> 61
<211> 59
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:oligonukleotid R5349

<400> 61
gcagatgggtg tgccatctag attcagtggc agtggatcag gcacagactt taccctaac 59

<210> 62
<211> 18
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:oligonukleotid R684

<400> 62
ttcaactgct catcagat 18

<210> 63
<211> 65
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer P7989

<400> 63
gaagcaccag gcttcttaac ctctgtctct gactggacca gctgcacctg agagtgcacg 60
aatc 65

<210> 64
<211> 71
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer P7990

<400> 64
ggtaagaag cctgggtgctt ccgtcaaagt ttctgtgtaag gctcaggtct acgtgttcac 60
agactatggt a 71

<210> 65
<211> 71
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer P7991

<400> 65
ccaacccatc catttcaggo cttgtccggg ggootgcttg acccaattca taccatagtc 60
tgtgaacacg t 71

<210> 66
<211> 81
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer P7995

<400> 66
ggcctgaat ggatgggttg gattaatact tacattggag agcctattta tgttgacgac 60
ttcaagggca gattcacggtt c 81

<210> 67
<211> 56
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer P7992

<400> 67
ccatgtatgc agtgcgttgt ggaggtgtct agagtgaacg tgaatctgcc cttgaa 56

<210> 68
<211> 62
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer P7993

<400> 68
ccacaagcac tgcatacatg gagctgtcat ctctgagatc cgaggacacc gcagtgtact 60
at 62

<210> 69
<211> 78
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer P7994

<400> 69
gaattcggta ccttggcccc agtagtccat ggcataagat ctgtatctct tagcacaata 60
gtacactggg gtgtctct 78

<210> 70
<211> 30
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer P7986

<400> 70
gaattcgtgc actctcaggt gcagctggtc 30

<210> 71
<211> 30
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer P7987

<400> 71
gaattcggta cctctggccc agtagtccat 30

<210> 72
<211> 65
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer P7999

<400> 72
gatccgccag gctgcacgag accgcctcct gactcgacca gctgaacctc agagtgcacg 60
aatc 65

<210> 73
<211> 71
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer P8000

<400> 73
tctcgtgcag cctggcggat cgctgagatt gtcctgtgct gcatctgggt acgtcttcac 60
agactatgga a 71

<210> 74
<211> 71
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:primer P8001

<400> 74
ccaaccrta catttcagga cctttccagg ggcctgotta acccaattca ttccatagtc 60
tgtgaagacg t 71

<210> 75

<211> 55
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása: primer P7997

<400> 75
ggaggtatgc tgttgacttg gatgtgtcta gagagaacgt gaatctgcc ttgaa 55

<210> 76
<211> 62
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása: primer P7998

<400> 76
ccaagtcaac agcataacct caaatgaata gctgagagc agaggacacc gcagtgtact 60
at 62

<210> 77
<211> 78
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása: primer P7993

<400> 77
gaattcggta ccttgcccc agtagtccat gccataagat ctgtatctc tagcacaata 60
gtacactgog ggtctctc 78

<210> 78
<211> 30
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása: primer P7996

<400> 78
gaattcgtgc actctgaggt tcagctggtc 30

<210> 79
<211> 74
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása: 5' primer

<400> 79
cgogcggcaa ttgcagtggc cttggtggt ttgctaccg tagcgcgaagc tgacattcaa 60
atgacccaga gcc 74

<210> 80

<211> 20
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása: 3' primer

<400> 80
ttcaactgct catcagatgg 20

<210> 81
<211> 78
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása: 5' primer

<400> 81
gctatcgcaa ttgcagtggc gctagctggg ttgcgccacg tggcgcaagc tgaggttcag 60
ctggtcagat caggaggc 78

<210> 82
<211> 18
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása: 3' primer

<400> 82
gcctgagttc cacgscac 18

<210> 83
<211> 23
<212> PRT
<213> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:humán 1 csoportú konszenzus
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> Mesterséges szekvencia

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása: 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> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:humán 1 csoportú konszenzus
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> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: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> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:humán 1 csoportú konszenzus
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> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: 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> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: humán 1 csoportú konszenzus
framework L4

<400> 89

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Gln Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 90

<211> 11

<212> PRT

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: hTNF40 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> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: humán 1 csoportú konszenzus
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> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:hTNF40 framework H1

<400> 92

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

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

<210> 93

<211> 14

<212> PRT

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:humán 1 csoportú konszenzus
framework H2

<400> 93

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

<210> 94

<211> 14

<212> PRT

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:hTNF40 framework H2

<400> 94

Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Ala Phe Lys Trp Met Gly
1 5 10

<210> 95

<211> 32

<212> PRT

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:humán 1 csoportú konszenzus
framework H3

<400> 95

Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

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

<210> 96

<211> 32

<212> PRT

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: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> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:humán I csoportú konszenzus
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> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:hTNF40 framework H4

<400> 98

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 99

<211> 324

<212> DNS

<213> patkány

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<223> egér hTNF40 könnyű lánc variábilis domén

<400> 99

gac att gtc atg acc cag tct caa aac 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 gtc 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 tgg 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> DNS
 <213> patkány

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(354)
 <223> egér hTNF40 nehéz lánc variábilis domén

<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		
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> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

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

<223> A mesterséges szekvencia leírása:OmpA oligonukleotid adaptor

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

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

<210> 102
<211> 67
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

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

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

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:IGS kazetta-1

<400> 102
g agc tca cca gta aca aaa agt ttt aat aga gga gag tgt ta atg aag 48
Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Met Lys
1 5 10 15

aag act gct ata gca att g 67
Lys Thr Ala Ile Ala Ile
20

<210> 103
<211> 69

<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

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

<220>
<221> CDS
<222> (45)..(68)

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:IGS kazetta-2

<400> 103
g agc tca cca gta aca aaa agt ttt aat aga ggg gag tgt taa a atg 47
Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Met
1 5 10 15

aag aag act gct ata gca att g 69
Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile
20

<210> 104
<211> 81
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

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

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

<220>
<223> A mesterséges szekvencia leírása:IGS kazetta-3

<400> 104
g agc tca cca gta aca aaa agc ttt aat aga gga gag tgt tga 43
Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5 10

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

<210> 105
<211> 81
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

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

<220>

<221> CDS

<222> (57)..(80)

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:IGS kazetta-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> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:humán 3 csoportú konszenzus
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> 14

<212> PRT

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:humán 3 csoportú konszenzus
framework H2

<400> 107

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

<210> 108

<211> 32

<212> PRT

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:humán 3 csoportú konszenzus
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 Gln Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 109

<211> 11

<212> PRT

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:humán 3 csoportú konszenzus
framework B4

<400> 109

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 110

<211> 648

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Beültetett nehéz lánc Fab számára

<400> 110

gaggttcagc	tggttcagtc	aggaggcggc	ctcgtgcagc	ctggcggatc	actgagattg	60
tctgtgctg	catctgggta	cgtcttcaca	gactatggaa	tgaattgggt	tagacaggcc	120
ccgggaaaag	gcctgggaatg	gatgggtrgg	attaactctt	acattggaga	gcctatttat	180
gctgacagcg	tcaagggcag	attcacgttc	tctctagaca	catccaagtc	aacagcctac	240
ctccaaatga	atagcctgag	agcagaggac	acgcagctgt	actattgtgc	tagaggatag	300
agatcttatg	ccatggacta	ctggggccag	ggtaccctag	tcacagtctc	ctcagcttcc	360
accaagggcc	catoggtctt	ccccctggca	ccctctctca	agagcacctc	tgggggcaca	420
ggggccctgg	gctgcctggc	caaggactac	ttccccgaac	cggtgacggc	gtcgtggaac	480
tcaggccccc	tgaccagcgg	cgtgcacacc	ttccccgctg	tcctacagtc	ctcaggactc	540
tactccctca	gcagcgtggc	gaccgtgccc	tcagcagct	tgggcaccca	gacctacatc	600
tgcaacgtga	atcacaagcc	cagcaacacc	aaggtcagca	agssagtt		648

<210> 111

<211> 216

<212> PRT

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Beültetett nehéz lánc Fab számára

<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> DNS
 <213> Mesterséges szekvencia

<220>
 <223> Bedltetett könnyű lánc Fab és módosított Fab számára

<400> 112
 gacattcaaa tgaccagag cccatccagc ctgagcgcac ctgtaggaga cggggtcacc 60
 atcaattgta aggccagtc gaacgtaggc actaacgtag cctgggtatca gcaaaaacca 120
 ggtaaaagccc caaaagccct catctacagc gctctcttcc totatagtgg tgtaccatac 180
 aggttcagcg gatccggtag tggtagctgt ttcacccctca cgtacagtag cctccagcca 240
 gaagatttcg ccacttatta ctgtcaacag tataacatct acccactcac attccggtcag 300
 ggtaactaaag tagaaatcaa acgtaccgga gggccccat ctgtcttcat ottcccgcga 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgc tctgtttggt gccigtgtgaa taacttctat 420
 cccagagagc ccbaagtaca gtggaagggt gataacgcc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcaccatca gccctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaa cagactacga gaaacacaaa gtctacgctt gcaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcac cagtaacaaa aagctttaat agaggagagt gt 642

<210> 113

<211> 214
<212> FRT
<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Beültetett könnyű lánc Fab és módosított Fab számára

<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
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 114
<211> 667
<212> DNS
<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Beültetett nehéz lánc módosított Fab számára

<400> 114

```

gaggttcagc tggtegagtc aggaggcggg ctcgtgcagc ctggcggatc actgagattg 60
tctctgctg catctgggta cgtcttcaca gactatggaa tgaattgggt tagacaggcc 120
ccgggaaagg gcoctggaatg gatggggttg attaataactt acattggaga gcctatttat 180
gctgacagcg tcaagggcag attcacgttc tctctagaca catcccaagtc aacagcatac 240
ctccaaatga atagcctgag agcagaggac accgcagtgt actattgtgc tagaggatac 300
agatcttatg ccattggacta ctggggccag ggtaccctag tcacagtcctc ctcagcttcc 360
accaagggcc catcgggtctt cccctggca cctctctcca agagcacctc tgggggcaca 420
goggcctgg gctgcctggg caaggactac tccccgaac cggtgacggg gtctgtggaac 480
tcagggcgcc tgaccagcgg cgtgcacacc tccccggctg tcttcacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gaacctacac 600
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtcgaca agaaaagtga gcccaaatct 660
tgtgacaaaa ctccacacatg cgcctgg 687

```

<210> 115
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> Mesterséges szekvencia

<220>
 <223> Beültetett nehéz lánc módosított Fab számára

<400> 115
 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 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Ala Ala
225

Szabadalmi igénypontok

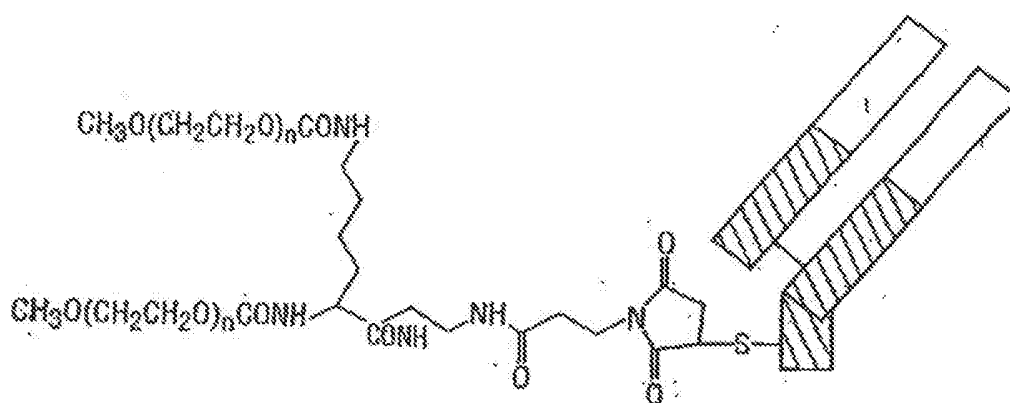
1. Humán-TNF α -specifitással rendelkező antitest molekula, amely rendelkezik könnyű láncsal és nehéz láncsal, ahol a könnyű lánc tartalmazza a 8. számú szekvenciaként megadott hTNF40-gL1 könnyű lánc variábilis régiót és a nehéz lánc tartalmazza a 11. számú szekvenciaként megadott gh3hTNF40.4 nehéz lánc variábilis régiót.

2. Humán-TNF α -specifitással rendelkező antitest molekula, amely rendelkezik a 113. számú szekvenciában megadott szekvenciájú könnyű láncsal és a 115. számú szekvenciában megadott szekvenciájú nehéz láncsal.

3. Vegyület, amely tartalmaz olyan humán-TNF α -specifitással rendelkező antitest molekulát, amely rendelkezik a 113. számú szekvenciában megadott szekvenciájú könnyű láncsal és a 115. számú szekvenciában megadott szekvenciájú nehéz láncsal, és amelyben a nehéz lánc C-terminális végén lévő egyik cisztein csoporthoz egy lizil-maleinsavimid-származék csoport kapcsolódik, ahol a lizil csoport két aminocsoportjának mindegyikéhez kovalensen kapcsolódik egy-egy kb. 20 000 Da molekulatömegű metoxipoli(etilénglikol) csoport, így a metoxipoli(etilénglikol) csoportok átlagos összmolekulatömege kb. 40 000 Da.

4. A 3. igénypont szerinti vegyület, amelyben a lizil-maleinsavimid-származék csoport [1-[[[2-[[3-(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)-1-oxopropil]amino]etil]amino]-karbonil]-1,5-pentándiil]bisz(iminokarbonil).

5. Vegyület, amely tartalmazza a 2. igénypont szerinti antitest molekulát, és amelynek a képlete a következő:



ahol n értéke körülbelül 420.

6. DNS szekvencia, amely kódolja az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti antitest molekula nehéz és/vagy könnyű láncát.

7. Klónozó vagy expressziós vektor, amely tartalmazza a 6. igénypont szerinti DNSszekvenciát.

8. Gazdasejt, amelyet a 7. igénypont szerinti vektorral transzformáltunk.

9. Eljárás az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti antitest molekula előállítására, amely eljárás tartalmazza a 8. igénypont szerinti gazdasejt tenyésztését és az antitest molekula izolálását.


10. Terápiás vagy diagnosztikai készítmény, amely tartalmazza az 1. vagy 2. igénypont szerinti antitest molekulát vagy a 3-5. igénypontok bármelyike szerinti vegyületet gyógyászatilag elfogadható vízóanyaghoz társítva.

11. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti antitest molekula vagy a 3-5. igénypontok bármelyike szerinti vegyület terápiában való alkalmazásra.

12. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti antitest molekula vagy a 3-5. igénypontok bármelyike szerinti vegyület alkalmazása rheumatoid arthritis,

osteoarthritis, Crohn-betegség vagy psoriasis kezelésére alkalmazható gyógyszer előállításában.

A meghatalmazott


GÖDÖLLE, KÉKES, MESZÁROS & SZABÓ
Szabadalmi és Védjegy Iroda
1024 Budapest, Kelet Károly u. 13/b
Frankné dr. Machytko Daisy
szabadalmi ügyvéd

1/27

1. ábra

A hTNF40 antitest könnyű lánc és a humán 1 csoportú konszenzus szekvenciák framework régióinak összehasonlítása

Hu 1 csoportú konszenzus : DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (83.sz. szekv.)
 hTNF40 : DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC (84.sz. szekv.)

Hu 1 csoportú konszenzus : WYQQKPGKAPKLLIY (85. számú szekvencia)
 hTNF40 : WYQQKPGQSPKALIY (86. számú szekvencia)

Hu 1 csoportú konszenzus : GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS~~SL~~QPEDFATYYC (87.sz.szekv.)
 hTNF40 : GVPYRFIGSGSGTDFTLTISTVQSEDLAEYFC (88.sz. szekv.)

Hu 1 csoportú konszenzus : FGQGTKVEIKR (89. számú szekvencia)
 hTNF40 : FGAGTKLELKR (90. számú szekvencia)

3. ábra A hTNF40 CDR-ek szekvenciái

H1 DYGMN (1. számú szekvencia)

H2 WINTYIGEPIYVDDFKG (7. számú szekvencia)

H2' WINTYIGEPIYADSVKG (2. számú szekvencia)

H3 GYRSYAMDY (3. számú szekvencia)

L1 KASQNVGTNVA (4. számú szekvencia)

L2 SASFLYS (5. számú szekvencia)

L3 QQYNIYPLT (6. számú szekvencia)

2/27

2. ábra

A hTNF40 antitest nehéz lánc és a humán 1 csoportú és 3 csoportú konszenzus szekvenciák framework régióinak összehasonlítása

Hu 1 csoportú konszenzus : QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (91.sz.szekv.)
hTNF40 : QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYVFT (92.sz. szekv.)

Hu 1 csoportú konszenzus : WVRQAPGQGLEWMG (93. számú szekvencia)
hTNF40 : WVKQAPGKAFKWMG (94. számú szekvencia)

Hu 1 csoportú konszenzus : RVTITRDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR (95.sz.szekv.)
hTNF40 : RFAFSLETSASTAFLQINNLK NEDTATYFCAR (96.sz. szekv.)

Hu 1 csoportú konszenzus : WGQGTILTVSS (97. számú szekvencia)
hTNF40 : WGQGTILTVSS (98. számú szekvencia)

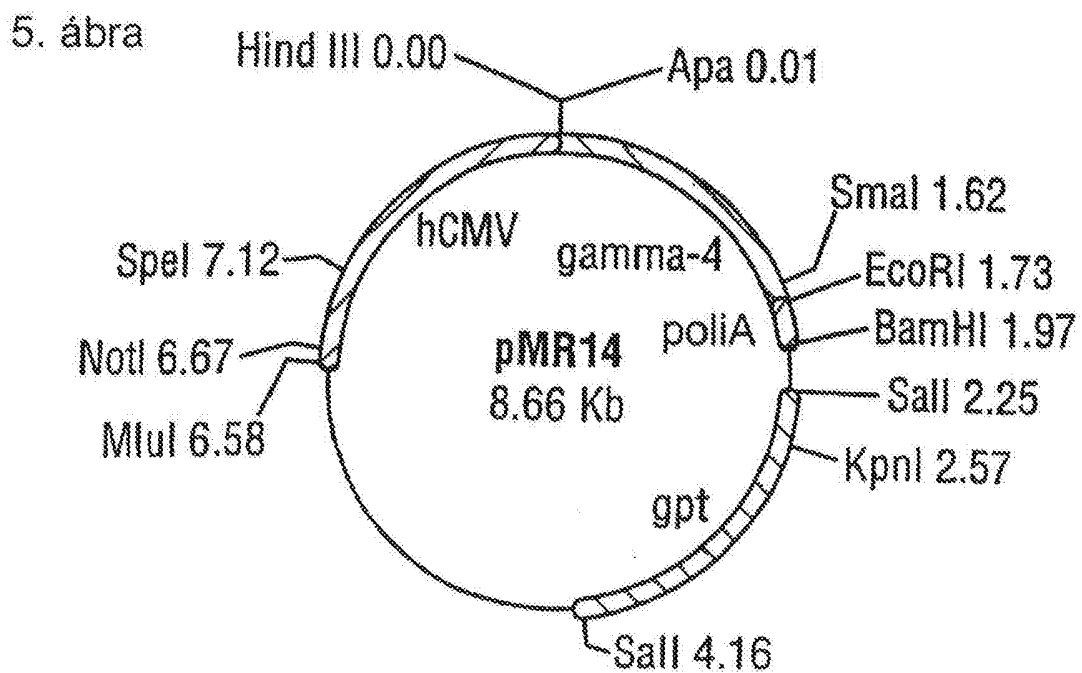
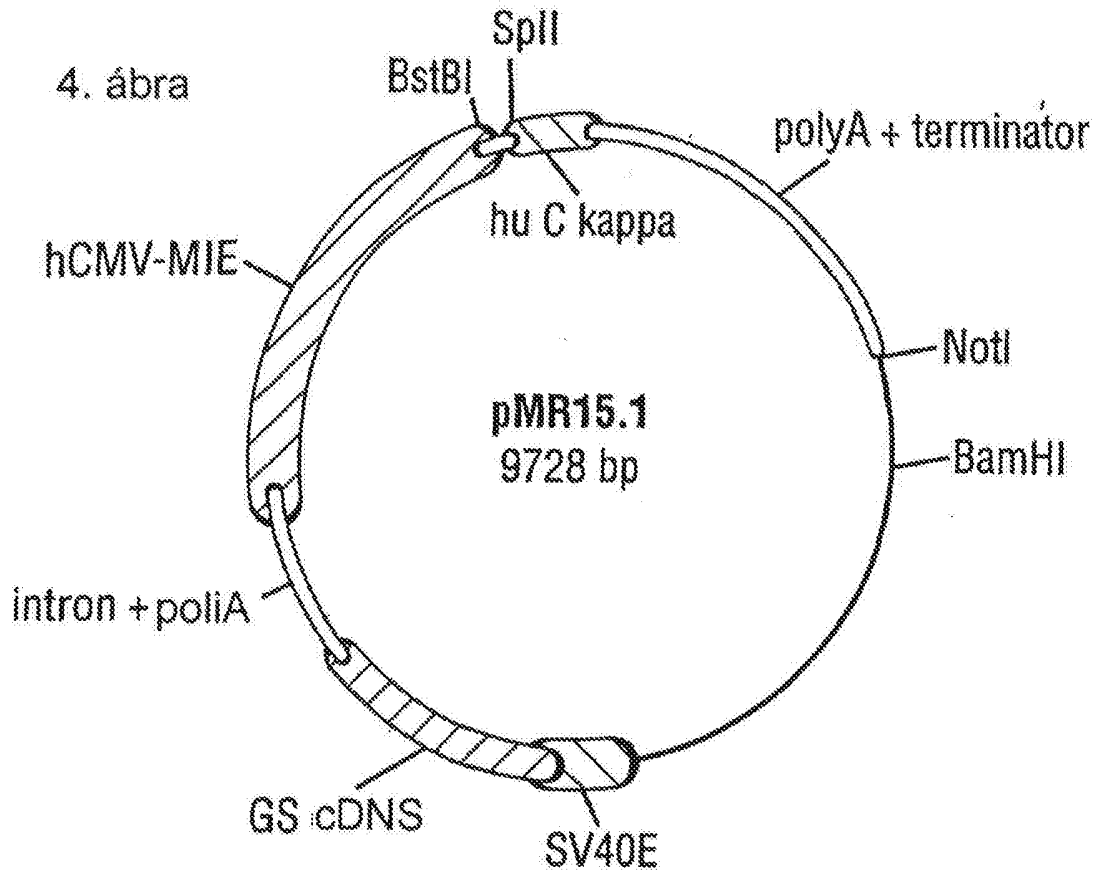
Hu 3 csoportú konszenzus : EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (106.sz.szekv.)
hTNF40 : QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYVFT (92. sz. szekv.)

Hu 3 csoportú konszenzus : WVRQAPGKGLEWVS (107. számú szekvencia)
hTNF40 : WVKQAPGKAFKWMG (94. számú szekvencia)

Hu 3 csoportú konszenzus : RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (108.sz. szekv.)
hTNF40 : RFAFSLETSASTAFLQINNLK NEDTATYFCAR (96. sz. szekv.)

Hu 3 csoportú konszenzus : WGQGTILTVSS (109. számú szekvencia)
hTNF40 : WGQGTILTVSS (98. sz. szekvencia)

3/27



6. ábra hTNF40 egér VI szekvencia (99. számú szekvencia)

10	20	30	40	50
GAC ATT GTG ATG ACC CAG TCT CAA NAA 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				
D I V M T Q S Q K F M S T S V G D R>				
60	70	80	90	100
GTC AGC GTC ACC TGC AAG GCC AGT CAG AAT GTG GGT ACT AAT GTA GCC TGG TAT				
CAG TCG CAG TGG ACG TTC CCG TCA GTC TTA CAC CCA TGA TTA CAT CCG ACC ATA				
V S V T C K A S Q N V G T N V A W Y>				
110	120	130	140	150
CAA CAG AAA CCA GGA CAA TCT CCT AAA GCA CTG ATT TAC TCG GCA TCC TTC CTA				
GTT GTC TTT GGT CCT GTT AGA GGA TTT CGT GAC TAA ATG AGC CGT AGG AAG GAT				
Q Q K P G Q S P K A L I Y S A S F L>				
170	180	190	200	210
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 S G T D F T>				
220	230	240	250	260
CTC ACC ATC AGC ACT GTG CAG TCT GAA GAC TTG GCA GAG TAT TTC TGT CAG CAA				
GAG 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>				
280	290	300	310	320
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>				



7. ábra hTNF40 egér Vh szekvencia (100. számú szekvencia)

```

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 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 TGC 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 ATG AAT 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 CCT 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 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 CGT TCT CCA AAG 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>

```


8. ábra hTNF40 beültetett VI szekvencia (8. számú szekvencia)

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 GGT 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>

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

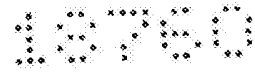
 110 120 130 140 150 160
 CAG CAA AAA CCA GGT AAA GCC CCA AAA GCC CTC ATC TAC AGT GCC TCT TTC CTC
 GTC GTT TTT GGT CCA TTT CGG GGT TTT CGG GAG TAG ATG TCA CCG AGA AAG GAG
 Q Q K P G K A P K A L I Y S A S F L>

 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 CCT AGG CCA TCA CCA TGA CTA AAG TGG
 Y S G V P Y R F S G 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 T F G Q G T K V E I K>





9. ábra hTNF40 beültetett VI szekvencia (9. számú szekvencia)

```

10          20          30          40          50
GAC AYT CAA ATG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT GTA GGA GAC CGG
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   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R>

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

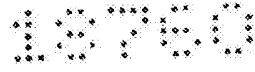
110         120         130         140         150         160
CAG CAA AAA CCA GGT AAA GCC CCA AAA CTC ATC TAC AGT GCC TCT TTC CTC
GTC GTT TTT GGT CCA TTT CCG GGT TTT GAG GAG TAG ATG TCA CCG AGA AAG GAG
Q   Q   K   P   G   K   A   P   K   L   L   I   Y   S   A   S   F   L>

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 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   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K>

```



10. ábra hTNF40 beültetett Vh szekvencia (10. számú szekvencia)

```

10      20      30      40      50
CAG GTG CAG CTG GTC CAG TCA GGA GCA GAG GTT AAG AAG CCT GGT GCT TCC GTC
GTC CAC GTC GAC CAG CAG GTC AGT CCT CGT 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 V>

60      70      80      90      100
AAA GTT TCG TGT AAG GCC TCA GGC TAC GTG TTC ACA GAC TAT GGT ATG AAT TGG
TTT CAA AGC ACA TTC CGG 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 TGG ATG GGT TGG ATT AAT ACT TAC
CAG TCT GTC CGG GGC CCT GTT CCG GAC CTT ACC TAC CCA ACC TAA TTA TGA ATG
V R Q A P G Q G L E W M G I N T Y>

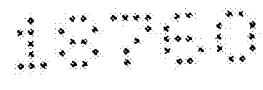
170     180     190     200     210
ATT GGA GAG CCT ATT TAT TAT GCT CAA AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACG TTC ACT CTA
TAA CCT CTC GGA TAA ATA CGA GAT TTC AAG GTC CCG TCT CAG TGC AAG TGA GAT
I G E P I Y A Q K F Q G R V T F T L>

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

```



11. ábra hTNF40.4 beültetett Vh szekvencia (11. számú szekvencia)

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 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 ATG CAG AAG TGT CTG ATA CCT TAC TTA ACC
 R L S C A A S G Y V F T D Y G M N W>

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

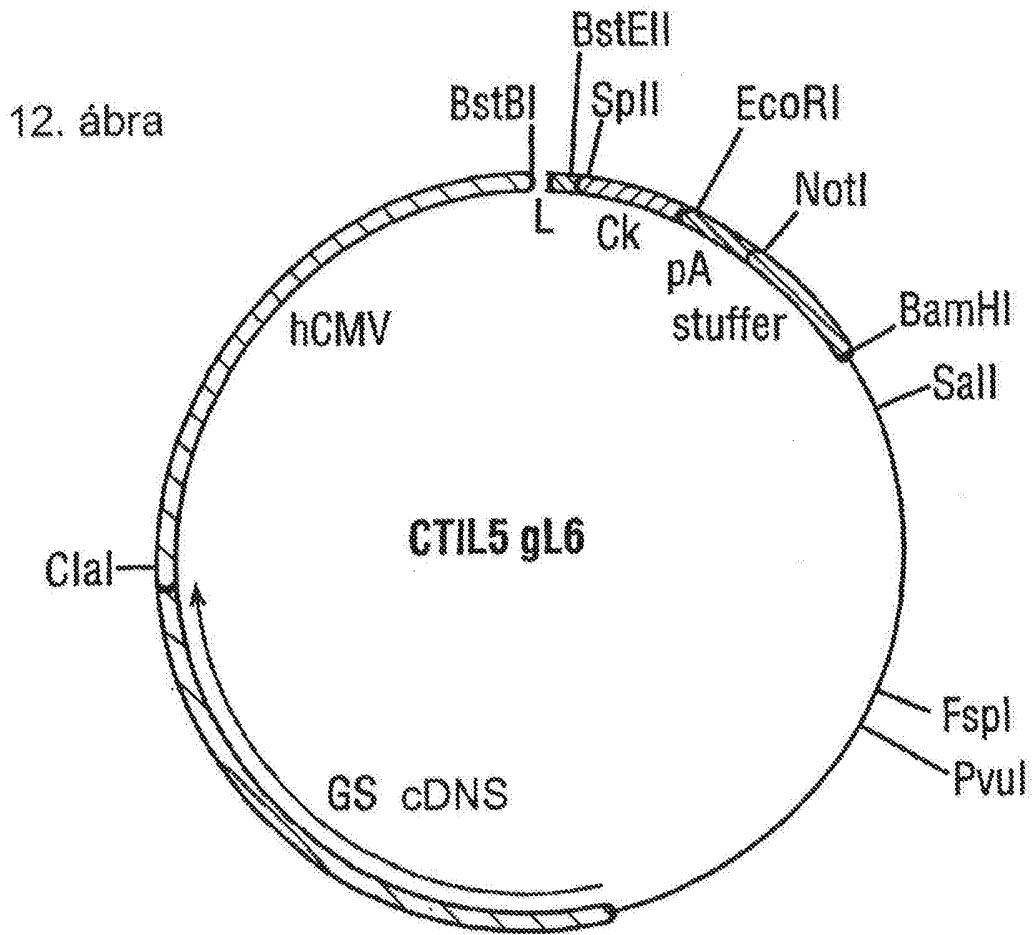
 170 180 190 200 210
 ATT GGA GAG CCT ATT TAT TAT GCT GAC AGC GTC AAG GGC AGA TTC ACG TTC TCT CTA
 TAA CCT CTC GGA TAA ATA CGA CTG TCG CAG TTC CCG TCT AAG TGC AAG AGA GAT
 I G E P I Y A D S V K G R F T F S L>

 220 230 240 250 260 270
 GAC ACA TCC AAG TCA ACA GCA TAC CTC CAA ATG AAT 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>

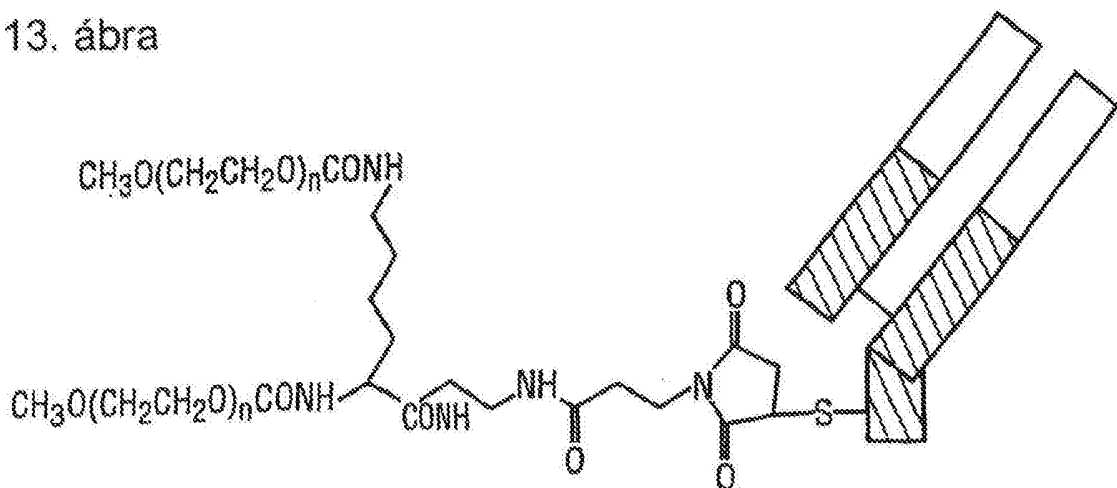
 280 290 300 310 320
 ACC GCA GTG TAC TAT TGT GCT AGA GGA TAC AGA TCT TAT GCC ATG GAC TAC TGG
 TGG CGT CAC ATG ATA ACA CGA TCT CCT ATG TCT AGA ATA CCG TAC CTG ATG ACC
 T A V Y Y C A R G Y R S Y A M D Y W>

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

10/27

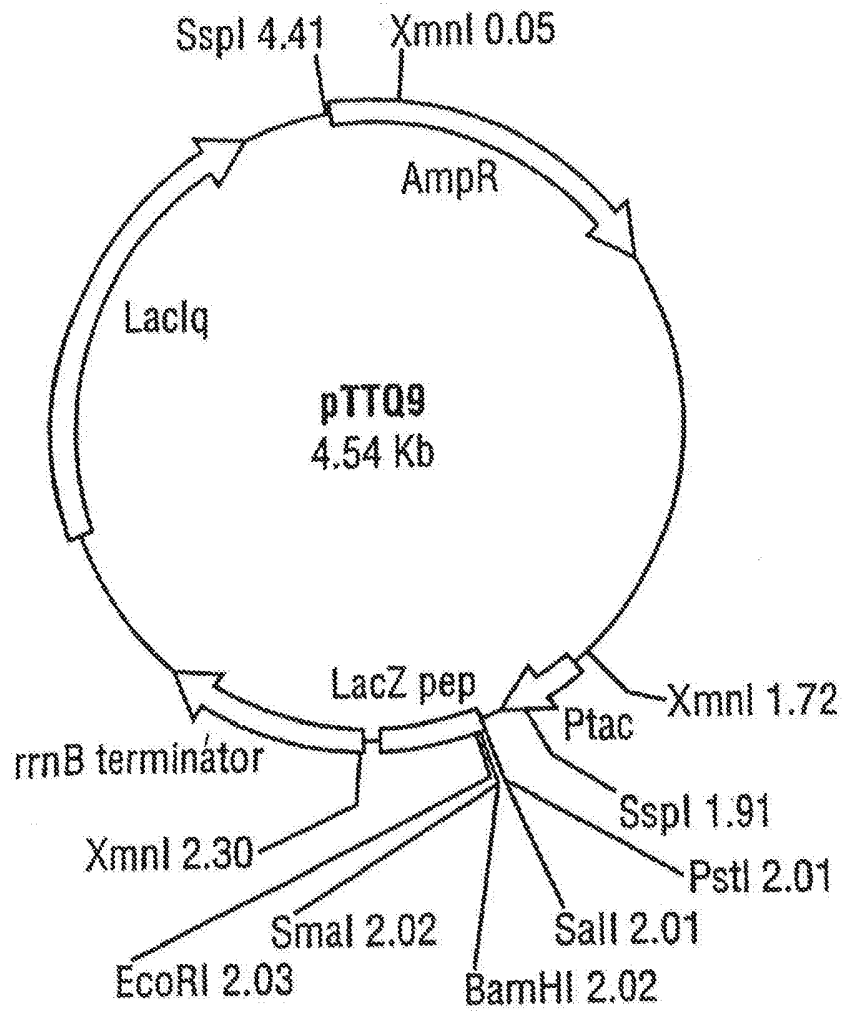


13. ábra

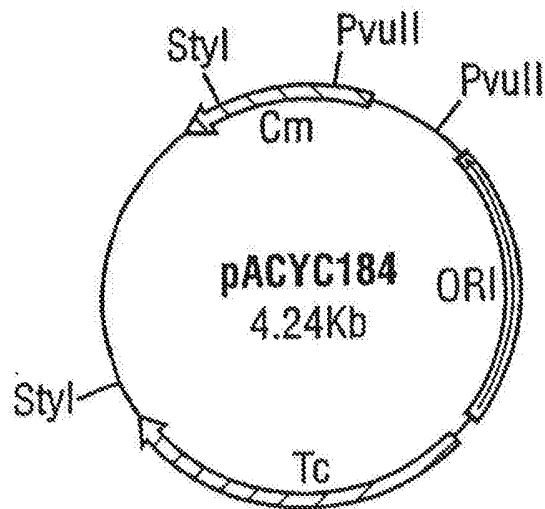


11/27

14. ábra



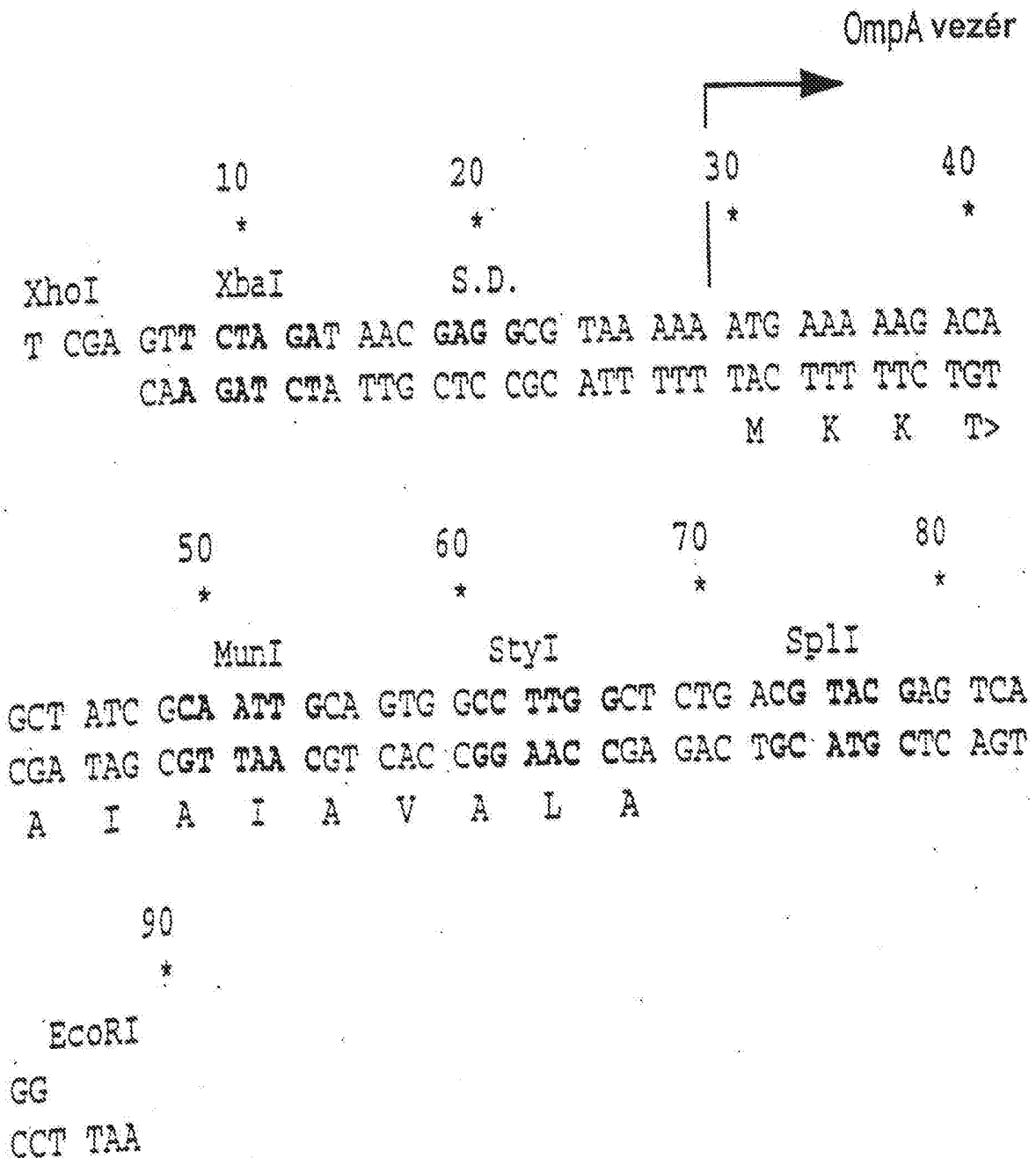
16. ábra



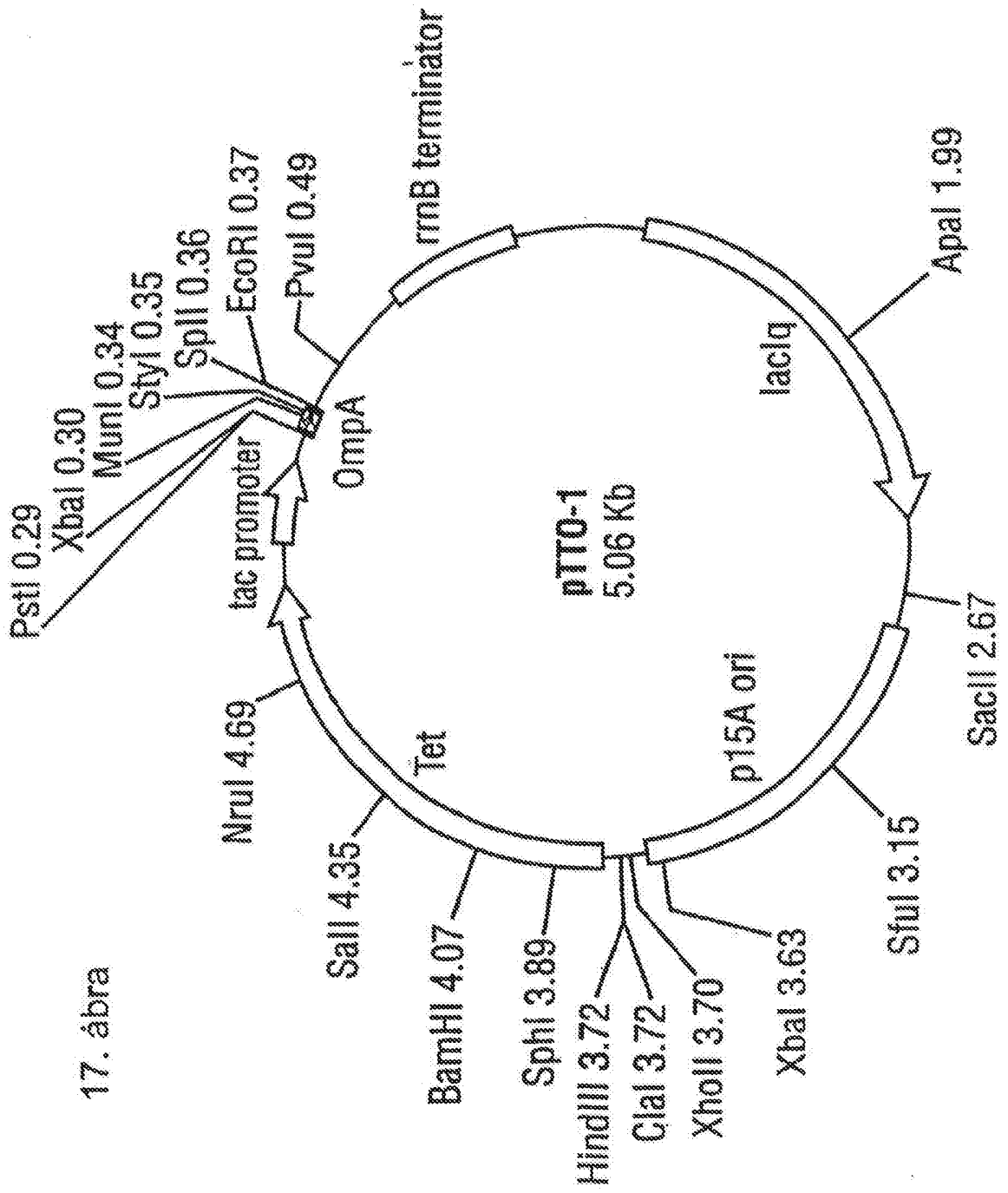
12/27

15. ábra

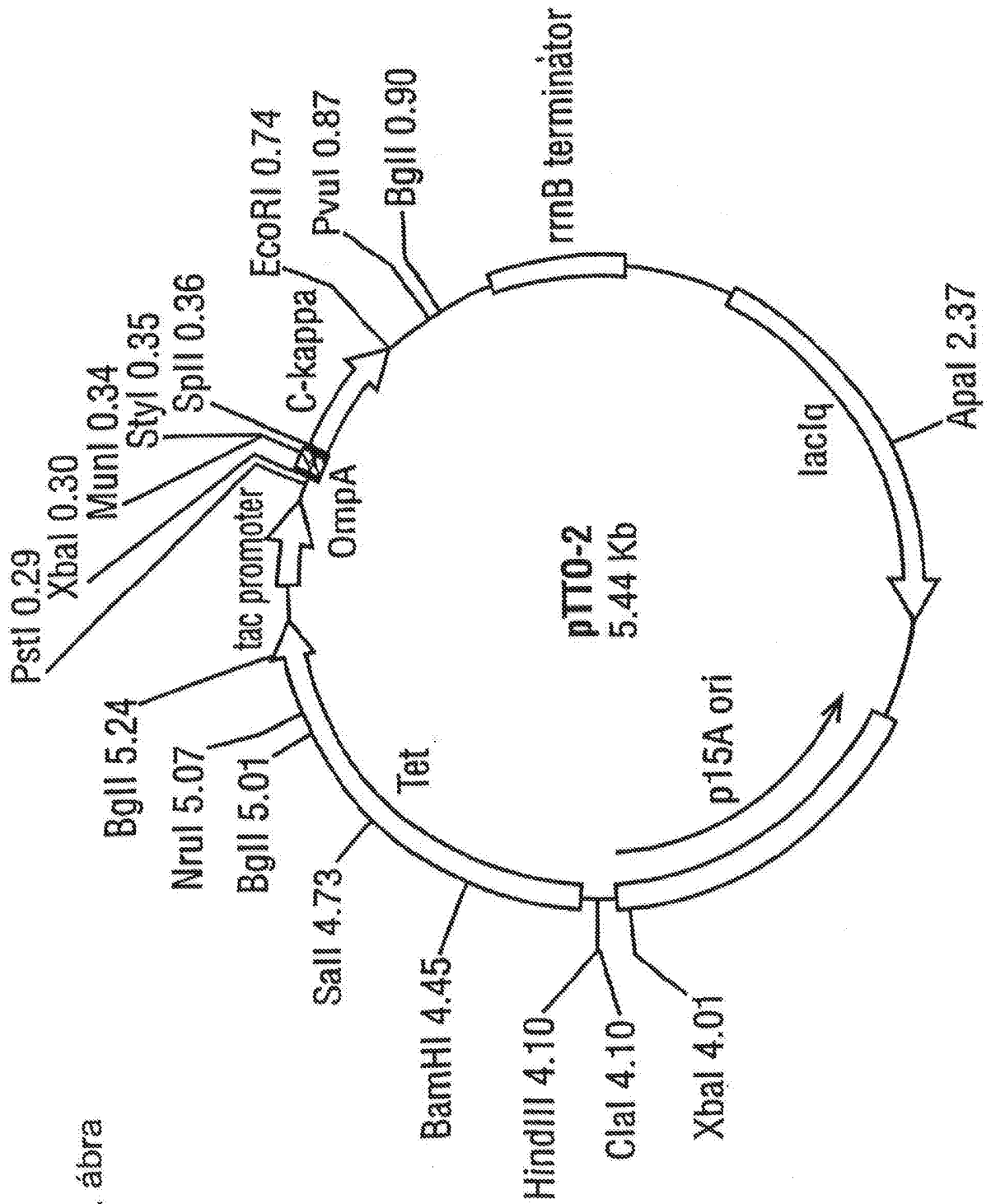
Az OmpA oligonukleotid adapter szekvenciája (101. sz. szekv.)



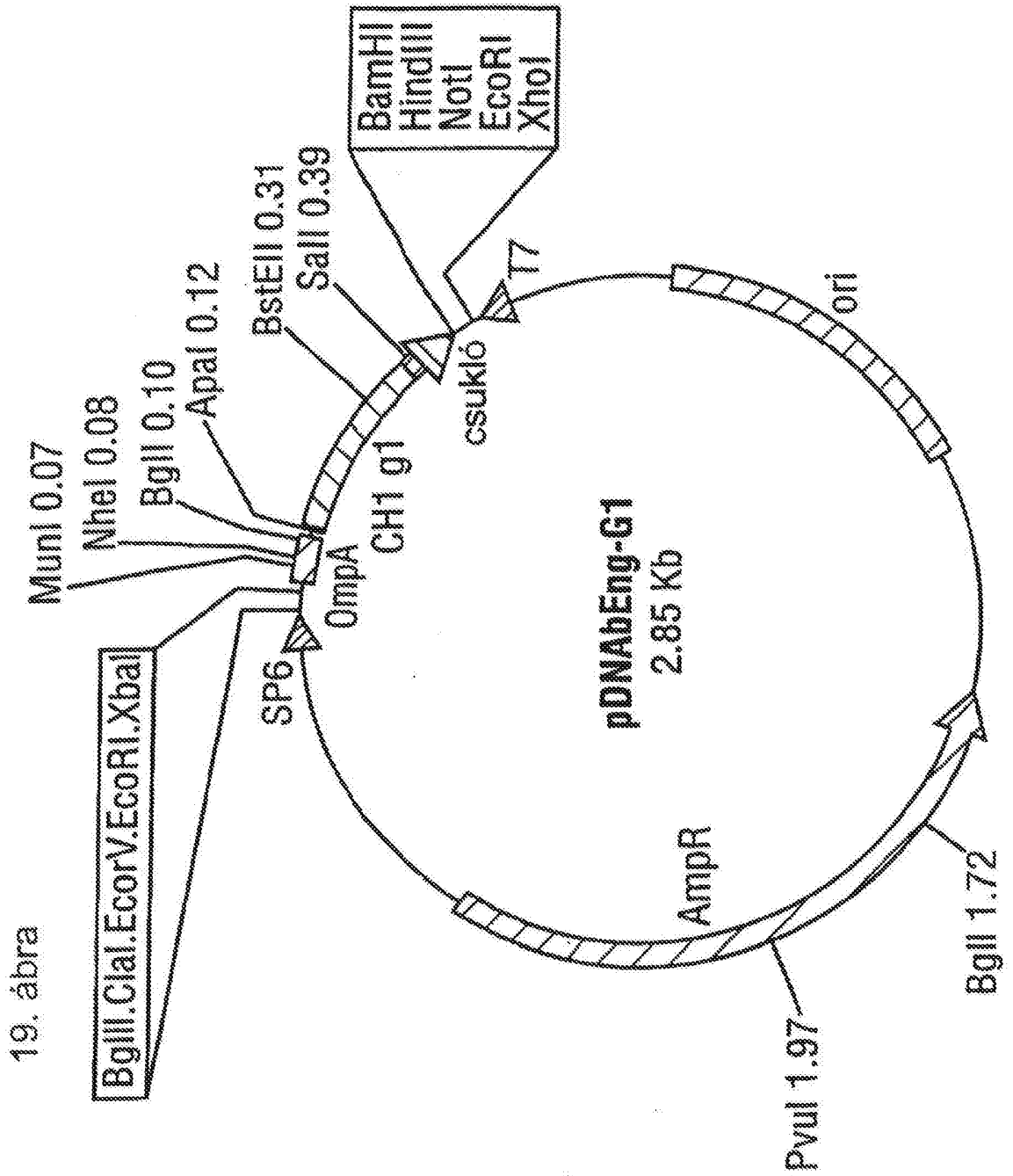
- A belső restrikciós helyeket vastag betűk mutatják
- Az 5' XhoI ragadós vég a vektor Sall helyébe ligálódik, blokkolva azt.
- S.D. az OmpA Shine Dalgarno szekvenciát jelenti



17. ábra



18. ábra



20. ábra Különböző intergenikus szekvenciákat kódoló oligonukleotid kazetták E.coli Fab' expresszióhoz

IGS kazetta - 1; Intergenikus köz = -1

G, AGC, TCA, CCA, GTA, ACA, AAA, AGT, TTT, AAT, AGA, GGA, GAG, TGT, TAAAG, MAG, MAG, ACT, GCT, ATA, GCA, ATT, G (102. sz. szekv.)

S S P V T K S F N R G E C * H K K T A I A I

A c-Kappa szekvencia vége → Az OmpA szekvencia kezdete →

IGS kazetta -2; Intergenikus köz = +1

G, AGC, TCA, CCA, GTA, ACA, AAA, AGT, TTT, AAT, AGA, GGG, GAG, TGT, TAA AATG, AAG, AAG, ACT, GCT, ATA, GCA, ATT, G (103. sz. szekv.)

S S P V T K S F N R G E C * H K K T A I A I

IGS kazetta - 3; Intergenikus köz = +13

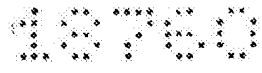
G, AGC, TCA, CCA, GTA, ACA, AAA, AGC, TTT, AAT, AGA, GGA, GAG, TGT, TCA GGAGGNNNNNNNANG, AAG, AAA, ACT, GCT, ATA, GCA, ATT, G (104. sz. szekv.)

S S P V T K S F N R G E C * M K K T A I A I

IGS kazetta - 4; Intergenikus köz = +13

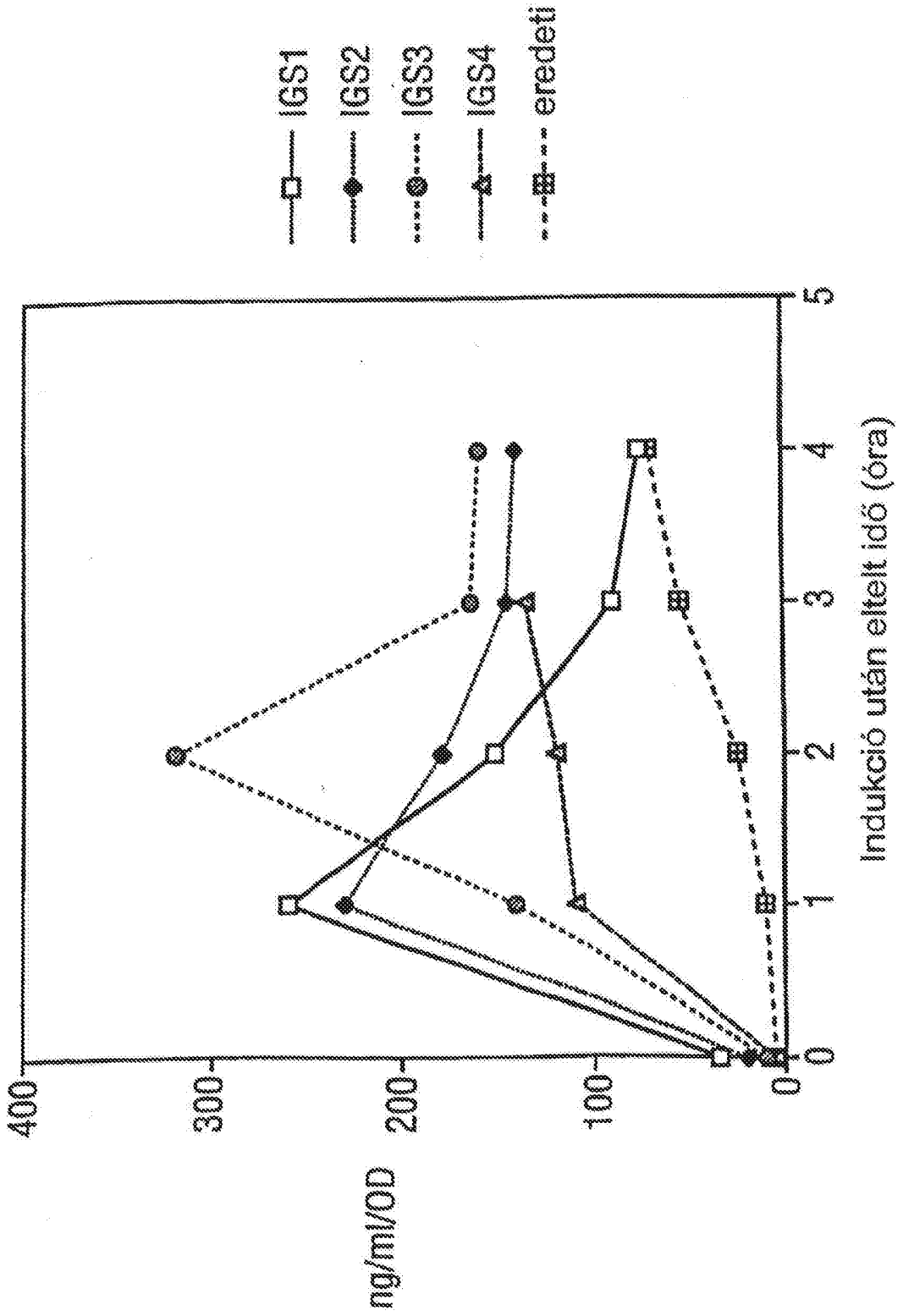
G, AGC, TCA, CCA, GTA, ACA, AAA, AGT, TTT, AAT, AGA, GGA, GAG, TGT, TCA CGAGGATTTATATATG, AAG, AAA, ACT, GCT, ATA, GCA, ATT, G (105. sz. szekv.)

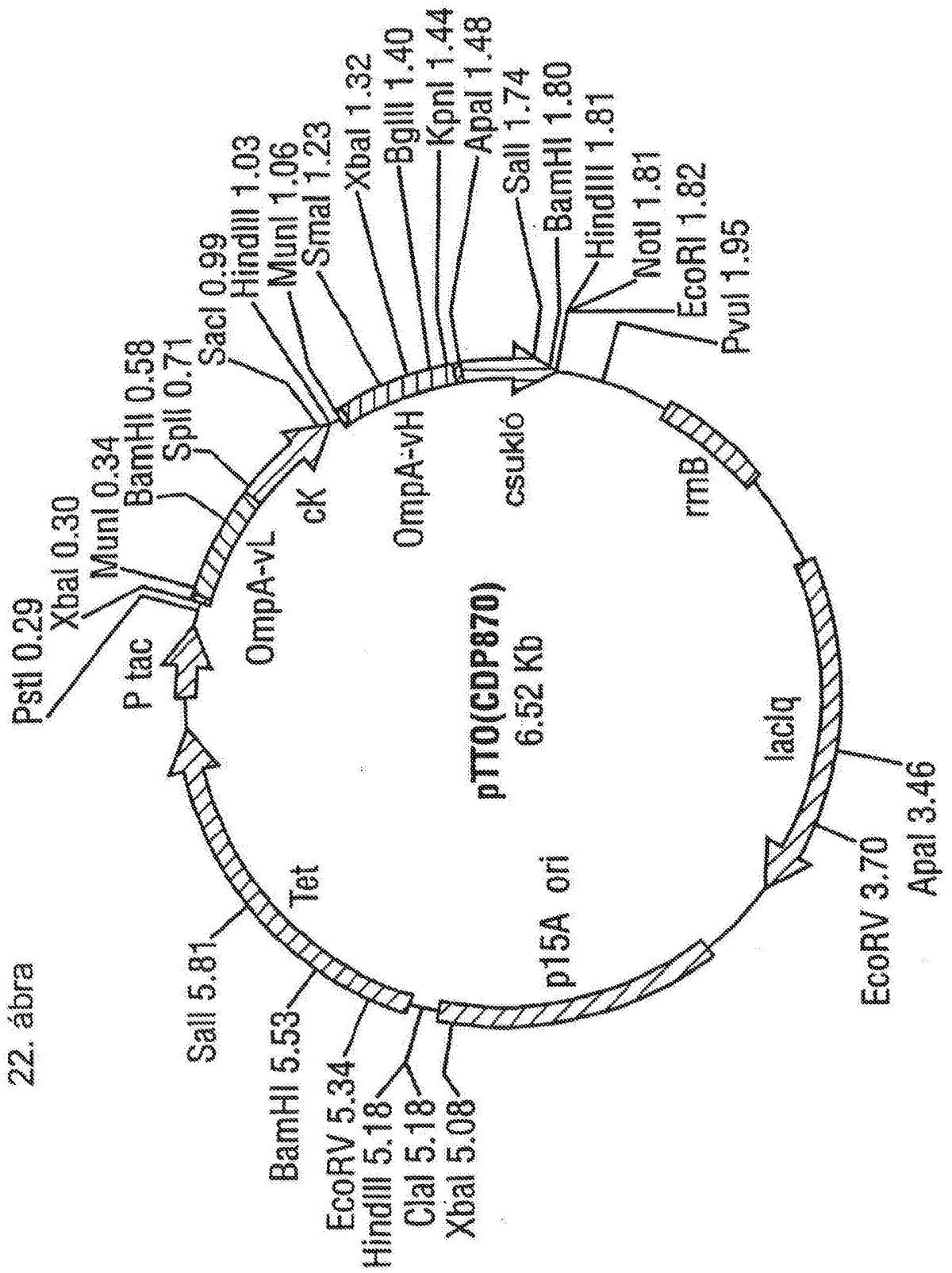
S S P V T K S F N R G E C * M K K T A I A I



21. ábra

Periplazmatikus Fab' akkumuláció - IGS variánsok

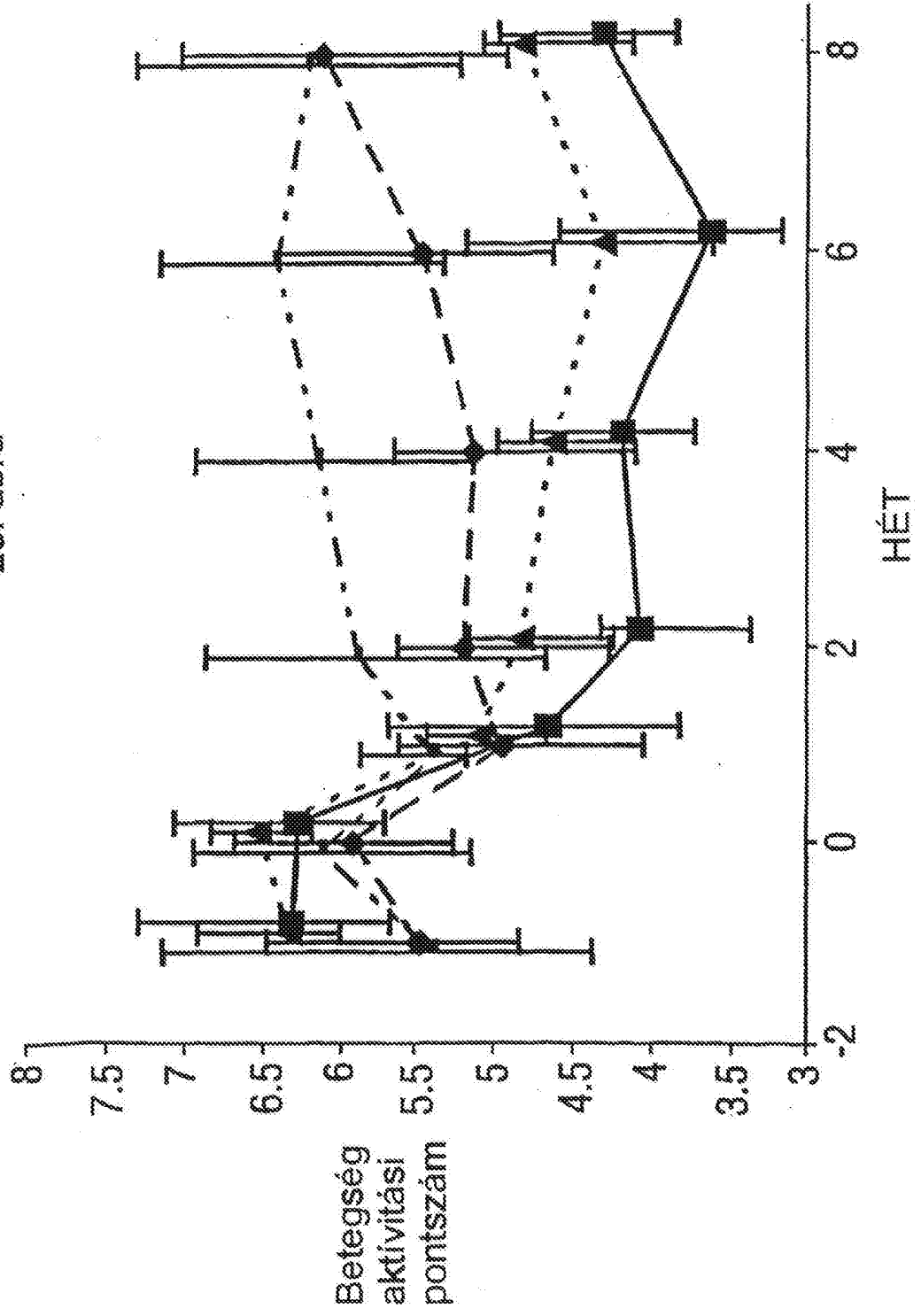




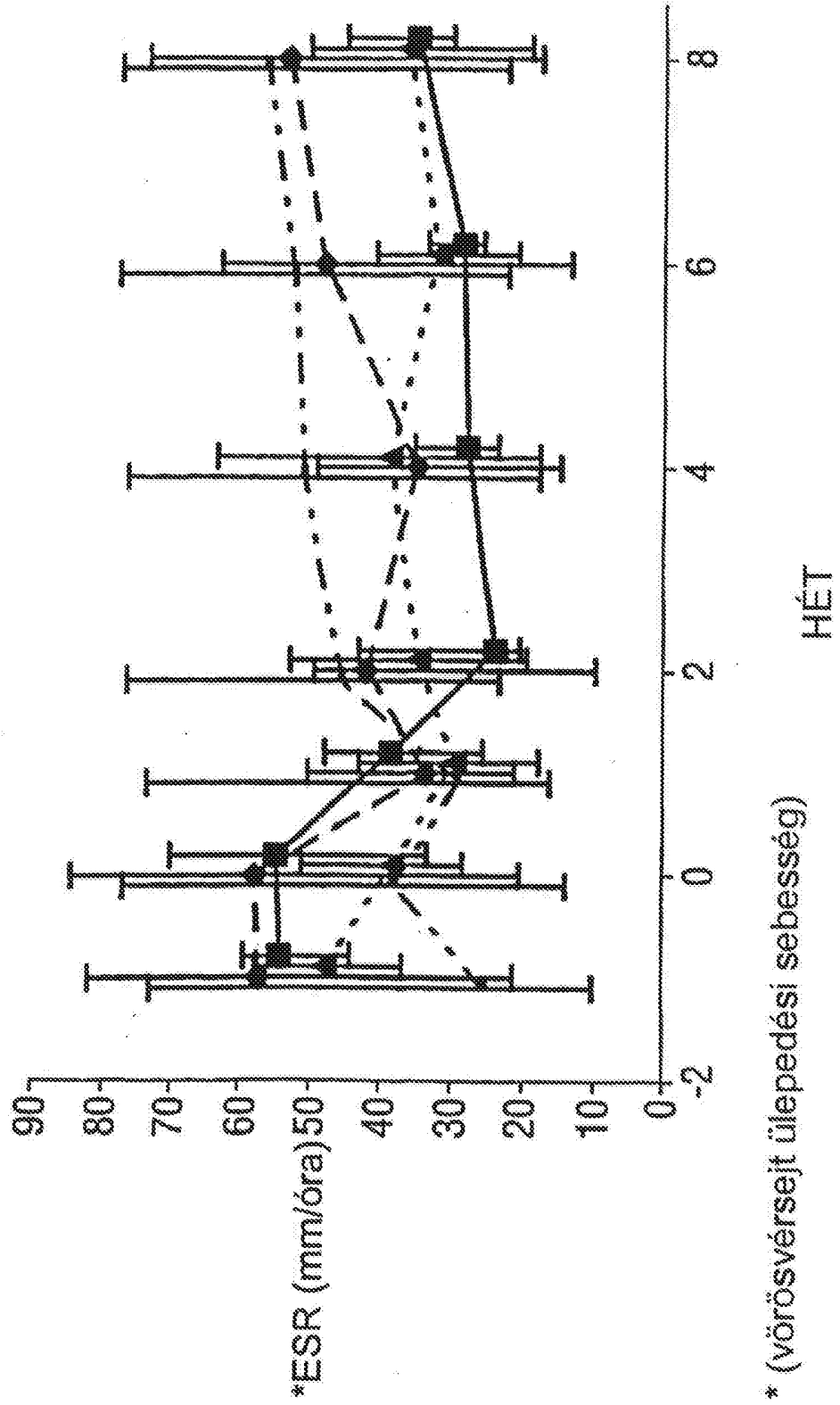
22. ábra

19/27

23. ábra

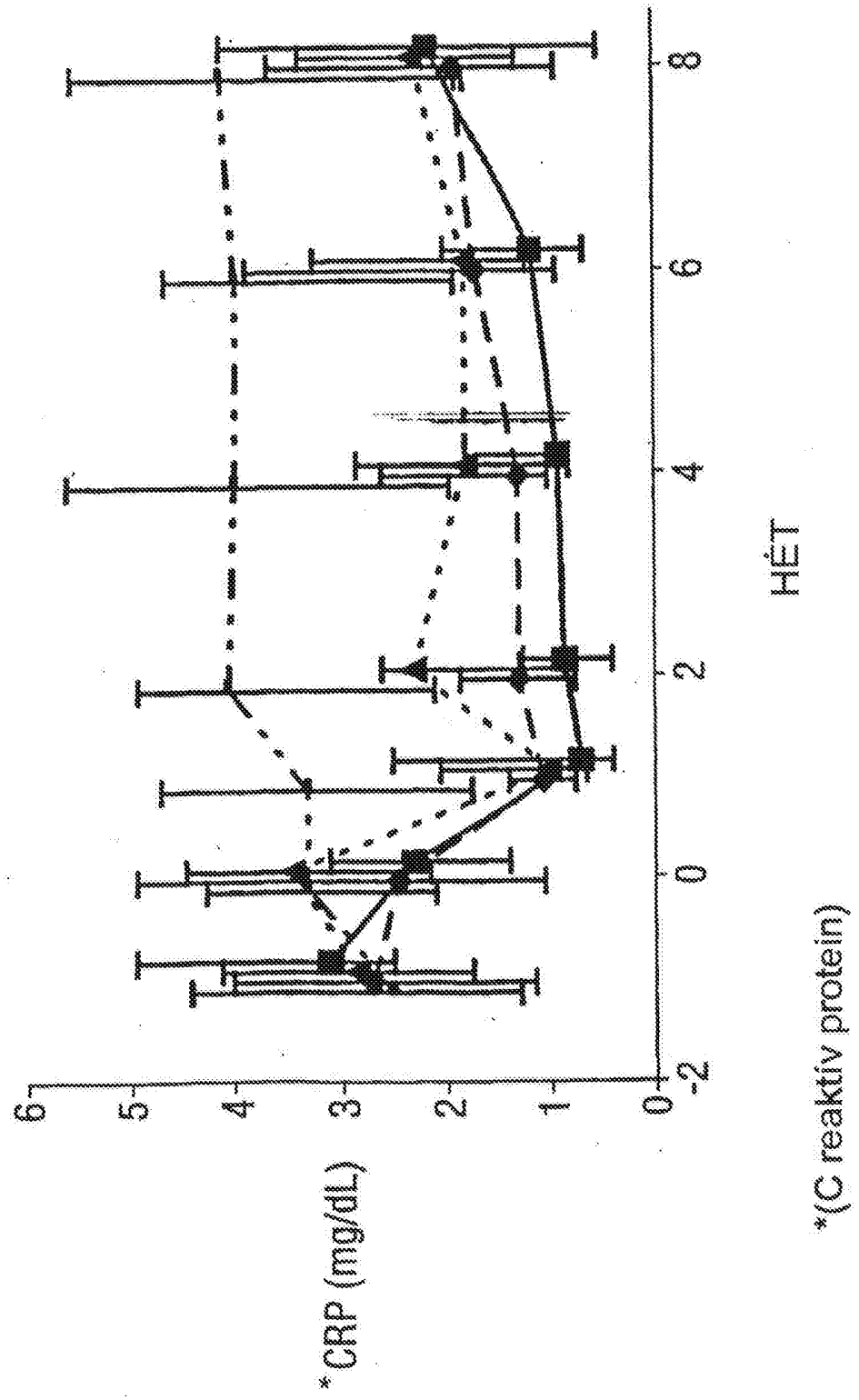


24. ábra



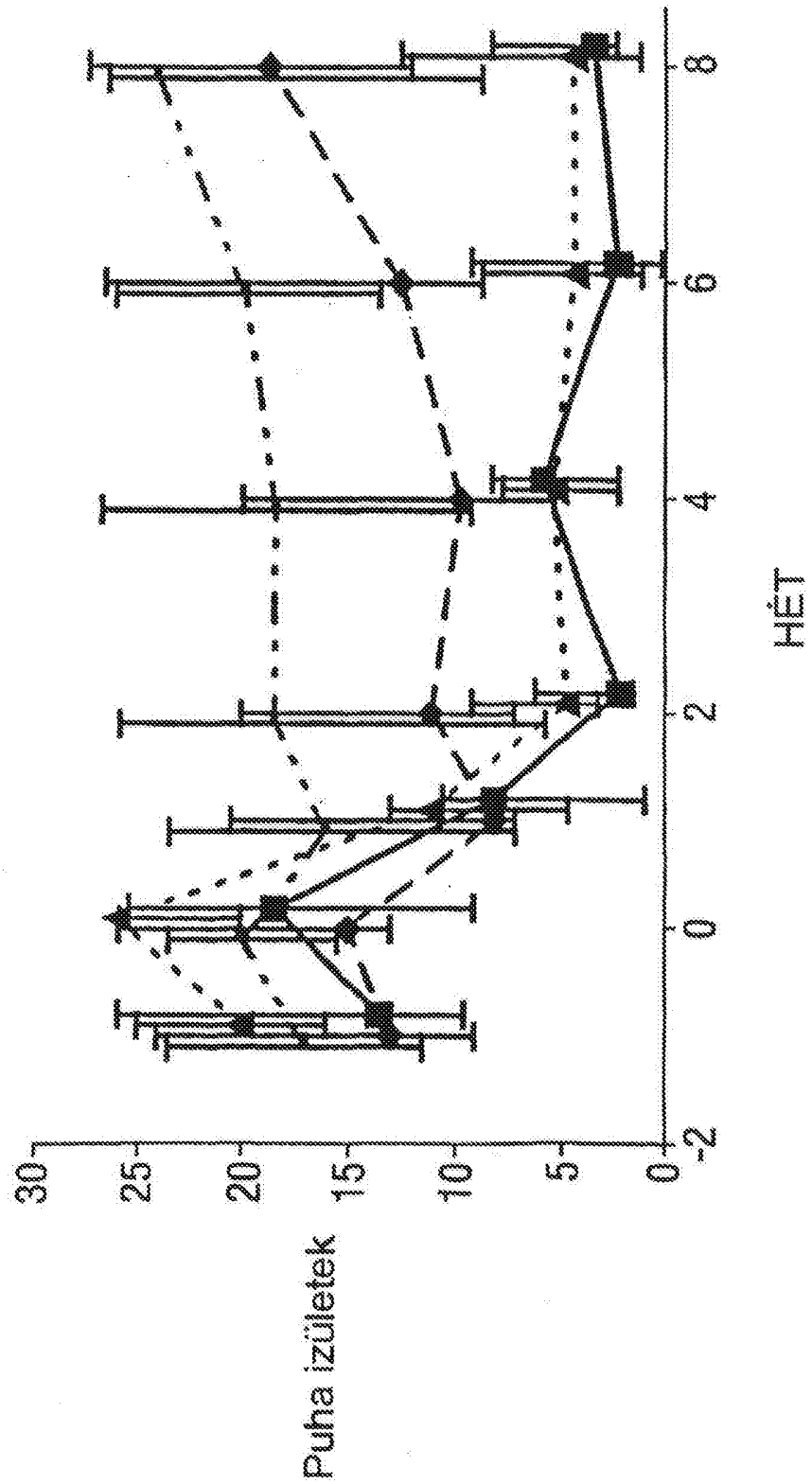
* (vörösvérsejt ülepedési sebesség)

24. ábra (folytatás)

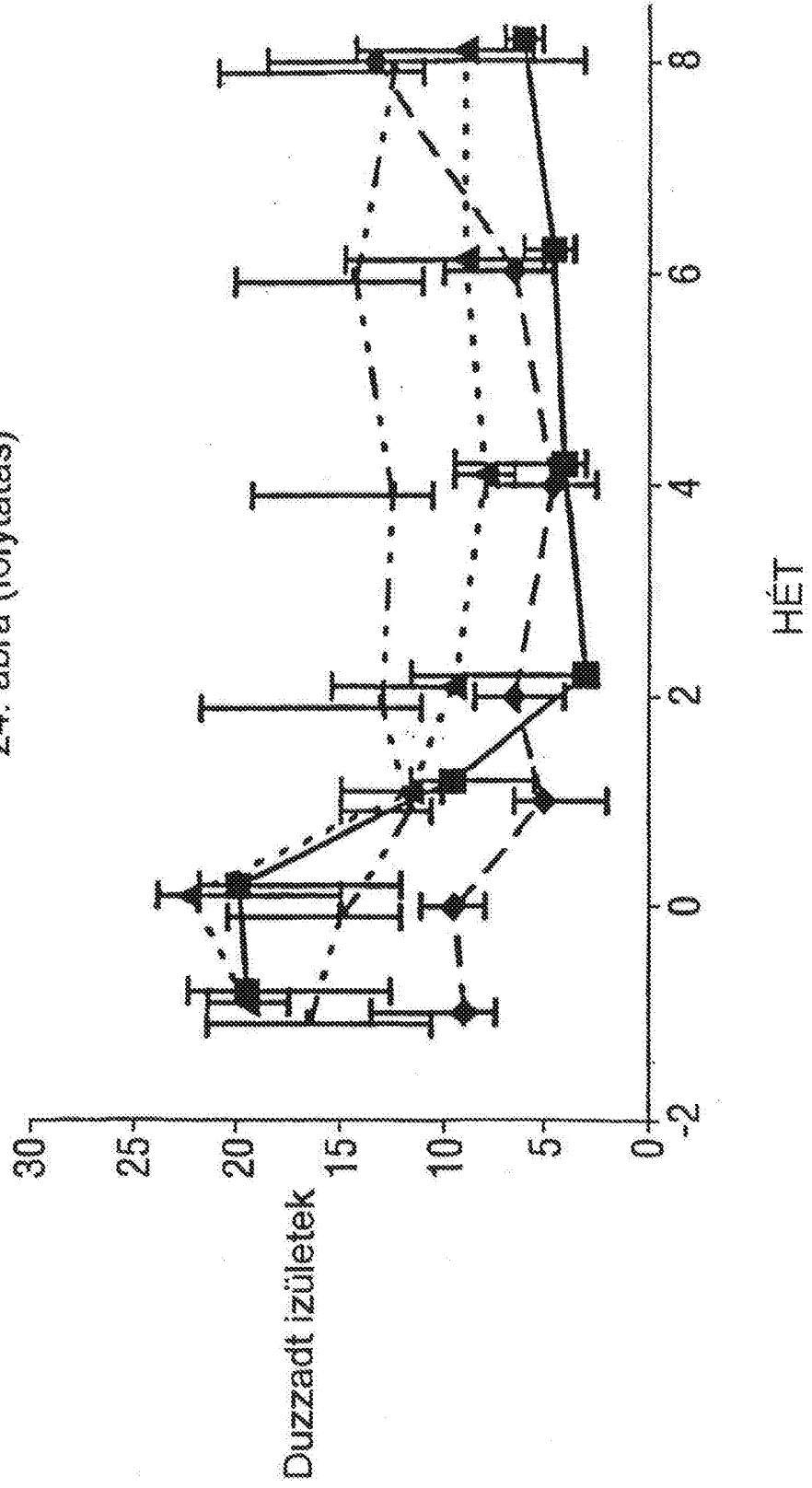


22/27

24. ábra (folytatás)

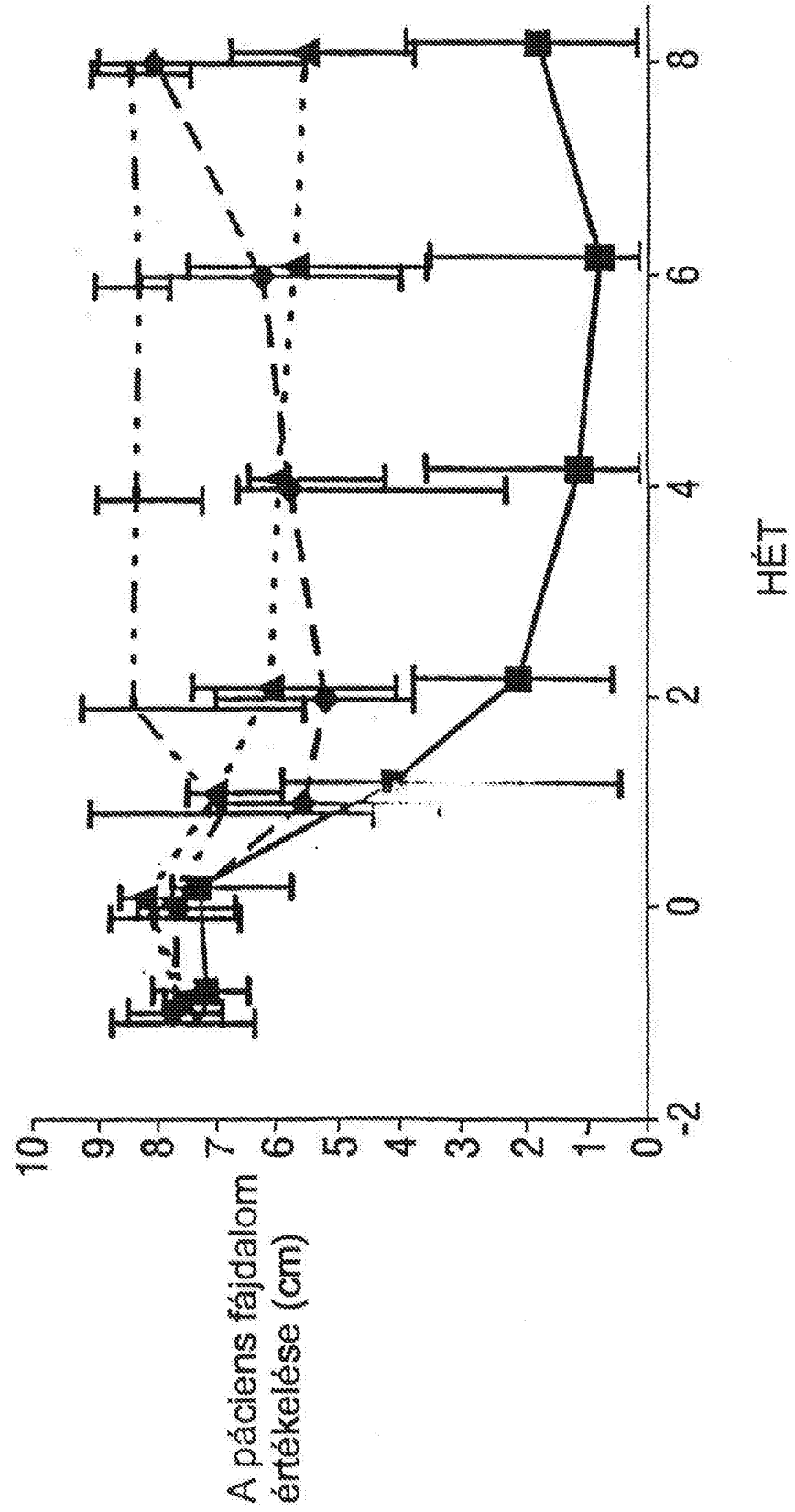


24. ábra (folytatás)

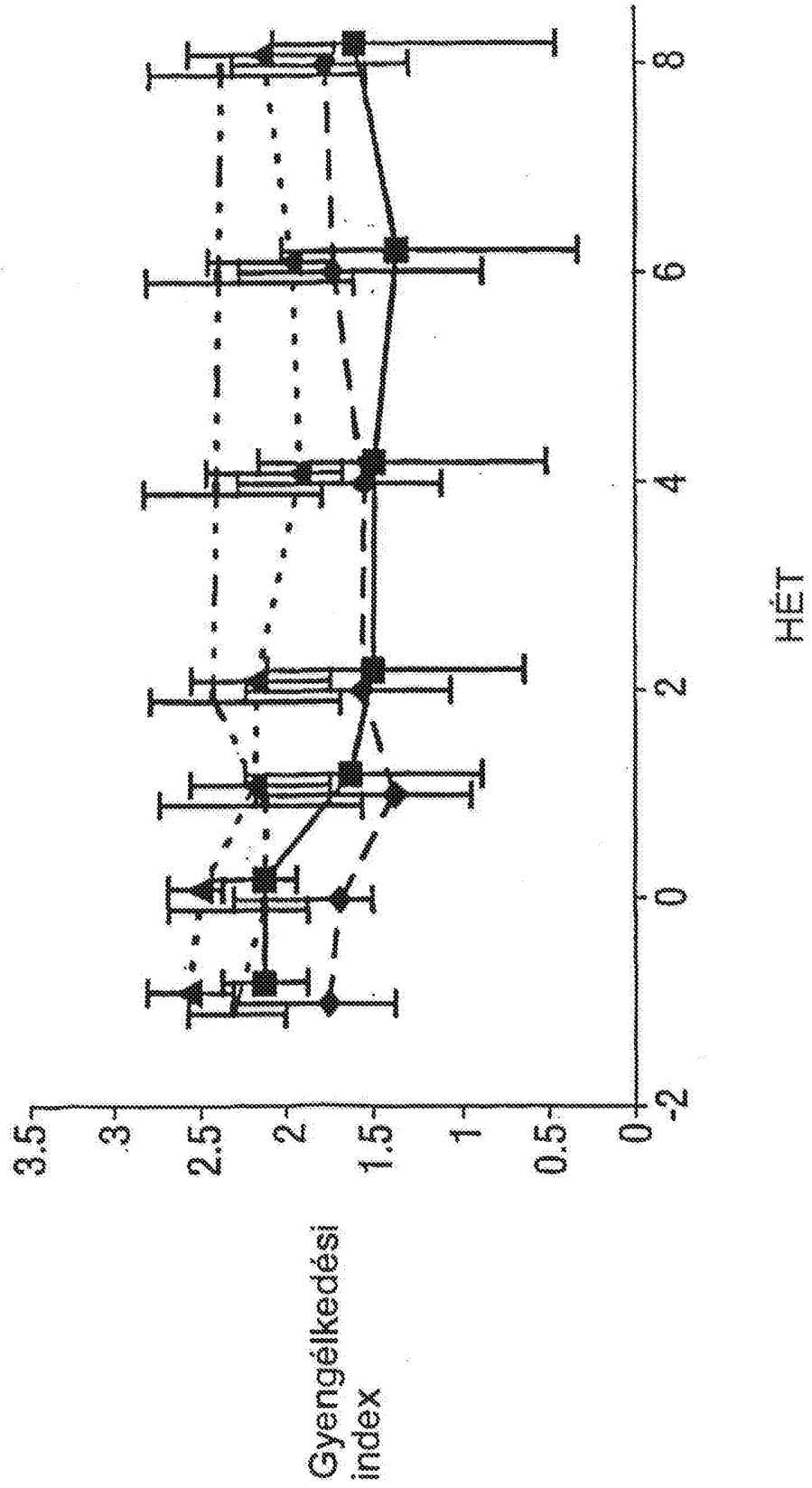


24/27

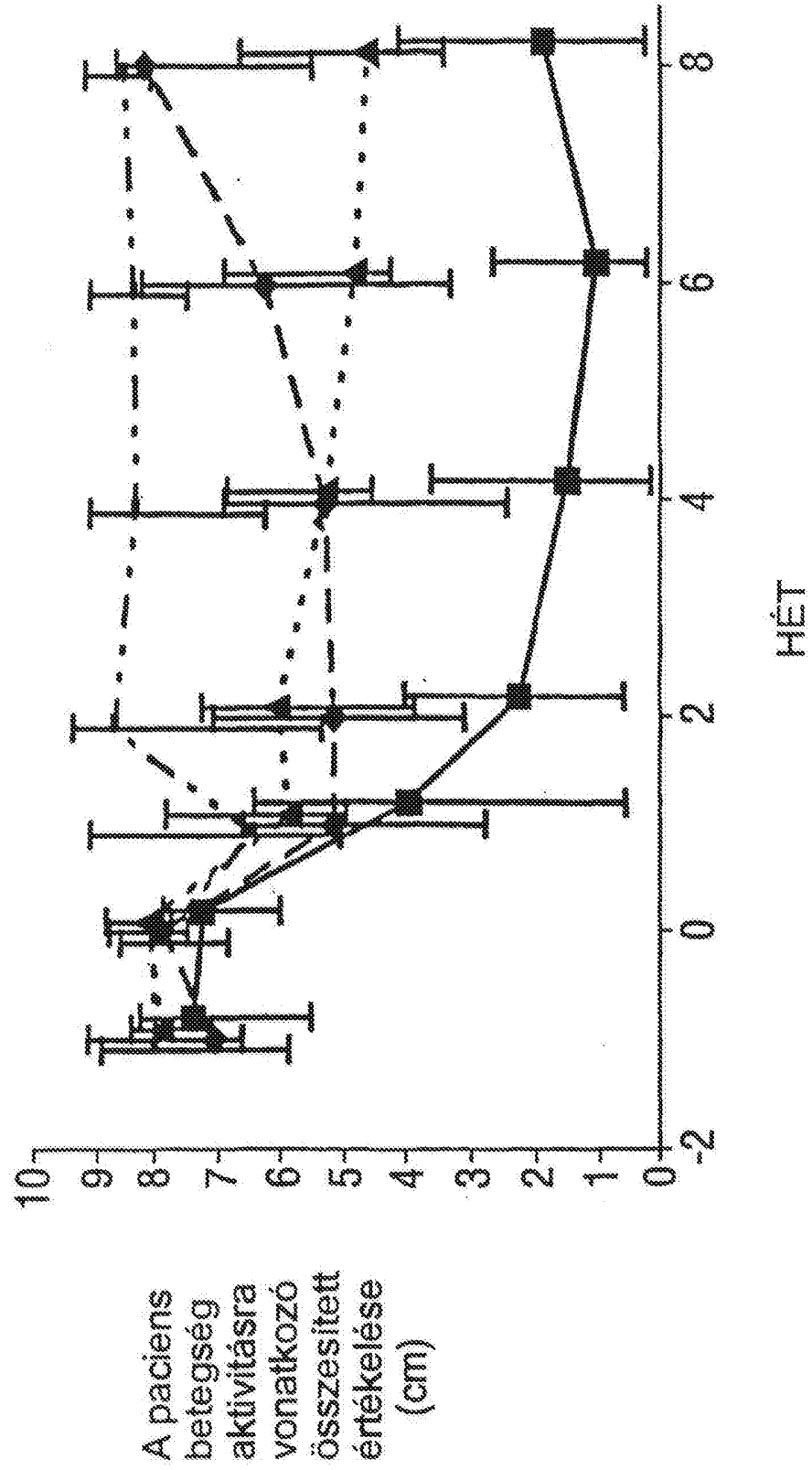
24. ábra (folytatás)



24. ábra (folytatás)



24. ábra (folytatás)



24. ábra (folytatás)

